

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 30 april 2025
KENMERK CGM/250430-01
ONDERWERP Advies aanscherping voorwaarde m.b.t. inserts in alfavirus-replicons

Geachte heer Jansen,

De COGEM scherpt haar eerdere generieke advies over de omlaagschaling van alfa- en flavivirusreplicons aan vanwege nieuwe wetenschappelijke inzichten over de vorming van infectieuze 'virus-like vesicles' (VLV's). De COGEM deelt u hierover het volgende mee.

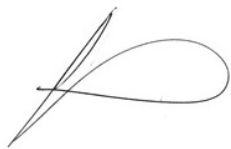
Samenvatting:

In 2022 heeft de COGEM geadviseerd dat laboratoriumwerkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfa- en flavivirussen onder voorwaarden generiek omlaaggeschaald kunnen worden. Bij virale replicons zijn bepaalde (structurele) genen verwijderd, zodat geen virusdeeltjes meer gevormd kunnen worden en in theorie verspreiding niet mogelijk is. Op de plaats van de verwijderde genen kunnen nieuwe genen ingevoegd worden. Eén van de voorwaarden voor omlaagschaling is dat de nieuw geïntroduceerde genen in het replicon de verwijderde functies niet mogen herstellen. Omdat bij alfavirus-replicons is gebleken dat het invoegen van specifieke genen van andere virussen kan leiden tot de vorming van verspreidende virusachtige deeltjes (VLV's), was het gebruik van de structurele genen uit drie virusfamilies uitgesloten.

Vanwege een groeiend aantal wetenschappelijke publicaties waarin de vorming van VLV's beschreven is bij gebruik van structurele genen van andere dan de eerder uitgesloten virusfamilies, heeft de COGEM in dit advies haar voorwaarde hierover verder aangescherpt. In plaats van het uitsluiten van structurele genen uit specifieke virusfamilies, adviseert zij om werkzaamheden met alfavirus-replicons met (combinaties van) genen die het replicon de capaciteit geven om te verspreiden, uit te sluiten van generieke omlaagschaling. De COGEM is van oordeel dat door het opnemen van dit bredere doelvoorschrift bij haar eerdere generieke advies over de inschaling van werkzaamheden met alfavirus-replicons, de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

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

Advies Aanscherping van te gebruiken transgenen in alfavirus-replicons die in aanmerking komen voor generieke omlaagschaling

COGEM advies CGM/250430-01

1. Inleiding

In 2022 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de omlaagschaling van werkzaamheden met 'naakte replicons' en 'viral replicon particles' (VRP's; replicondeeltjes) afgeleid van virussen uit de genera *Alphavirus* en *Orthoflavivirus* onder Ingeperkt Gebruik.¹ Daarin adviseert de COGEM dat omlaagschaling van werkzaamheden met alfa- en flavivirusreplicons mogelijk is indien aan een aantal voorwaarden wordt voldaan, waaronder de voorwaarde dat er geen transgenen mogen worden gebruikt die de verwijderde functies kunnen complementeren. Specifiek voor 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 'virus-like vesicles' (VLV's; afsnoeringen van het plasmamembraan waar een replicatiecomplex in terecht kan komen²), waardoor verdere verspreiding van het replicon mogelijk wordt.

Er is een groeiend aantal wetenschappelijke publicaties verschenen waarin de vorming van infectieuze VLV's beschreven staat bij het gebruik van verschillende transgenen in alfavirus-replicons. Daaruit blijkt dat infectieuze VLV's ook kunnen ontstaan bij gebruik van transgenen die afkomstig zijn van andere virussen dan uit de bovengenoemde virusfamilies. Ook is beschreven dat de infectieuze titer van de VLV's verder verhoogd kan worden door het passeren van de VLV's in cellen. Via infectieuze VLV's blijkt verspreiding van het replicon-RNA van cel naar cel mogelijk. Er zijn echter geen gegevens beschikbaar over de mogelijkheid van verspreiding tussen dieren of mensen.

Naar aanleiding van de laatste wetenschappelijke inzichten, is de COGEM van oordeel dat de reikwijdte van het generieke advies over omlaagschaling van werkzaamheden met replicons uit voorzorg verder ingeperkt moet worden met betrekking tot het gebruik van transgenen in alfavirus-replicons.

2. Alfavirussen: replicatie en assemblage van virusdeeltjes

Alfavirussen (genus *Alphavirus*, het enige genus binnen de familie *Togaviridae*) hebben een breed gastheerbereik en kunnen onder andere vogels, zoogdieren, vissen en insecten infecteren.^{3,4} Alfavirussen kunnen verspreid worden via bloedzuigende insecten, met name muggen.³ Het genus *Alphavirus* kent 32 species,⁴ waaronder verscheidene soorten die ziekten veroorzaken bij mens en/of dier. Een aantal daarvan zijn *Alphavirus chikungunya* (Chikungunya virus, CHIKV), *Alphavirus rossriver* (Ross River virus, RRV), *Alphavirus semliki* (Semliki Forest virus, SFV), *Alphavirus sindbis* (Sindbis virus, SINV) en *Alphavirus venezuelan* (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV).⁵

Alfavirusdeeltjes hebben een diameter van ongeveer 65-70 nm en bevatten een positief enkelstrengs RNA-genoom van 9,7 tot 11,8 kb.⁴ Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheer cel. 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 en vormen het replicatiecomplex.^{5,6} 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.^{3,6} 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.⁷ 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.⁸ De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.⁴ De assemblage en 'budding' van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats op het plasmamembraan van de gastheercel.⁹

3. Alfavirus replicons: naakte replicons en replicondeeltjes

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 virussen uit het genus *Alphavirus*. Deze replicons kunnen op verschillende manieren worden toegepast, bijvoorbeeld bij onderzoek naar virale genoomreplicatie, als vaccin, of als mogelijke immuuntherapie bij kanker- of gentherapie.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Bij de productie van replicons wordt onderscheid gemaakt tussen zogenaamde 'naakte' virale replicons en virale replicondeeltjes ('viral replicon particles', VRP's).

3.1 Naakte virale replicons

In naakte replicons afgeleid van alfavirussen, is het ORF dat codeert voor de structurele genen verwijderd. De niet-structurele genen en RNA-sequenties die noodzakelijk zijn voor genoomreplicatie, zoals bijvoorbeeld de 'noncoding regions', zijn nog wel aanwezig, wat maakt dat het replicon-RNA zelfstandig kan repliceren. Omdat de structurele genen verwijderd zijn, kan na infectie productie van nieuwe virusdeeltjes niet plaatsvinden. Een transgen kan op de positie van het structurele ORF geïnsereerd worden 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. Ook toevoeging van virale 2A peptidensequenties of virale 'internal ribosome entry sites' (IRES-)elementen kan expressie van meerdere transgenen bevorderen. Vooral VEEV, SFV en SINV worden gebruikt voor de constructie van repliconsystemen.^{18,19}

'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.¹⁹ 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 selectiegeen 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.

De 'self-amplifying' mRNA (samRNA)-vaccins waar de afgelopen jaren veel onderzoek naar gedaan wordt, zijn voorbeelden van dergelijke naakte alfavirus-replicons. Er zijn meerdere zelf-replicerende replicons die in klinische studies worden onderzocht als vaccin of in kankertherapie, meestal afgeleid van VEEV.^{15,16,17,19,20} Onlangs is het eerste samRNA-vaccin toegelaten tot de Europese markt: Kostaive.^{21,22} Dit vaccin tegen COVID-19 is afgeleid van vaccinstam VEEV-TC-83, en ingepakt in LNP's. Het voordeel van het gebruik van samRNA-vaccins ten opzichte van reguliere mRNA-vaccins is dat er met een lagere dosis kan worden gevaccineerd, omdat het mRNA zichzelf in de gastheercellen kan vermeerderen.

3.2 Virale replicondeeltjes (VRP's)

Men spreekt van VRP's als het replicon-RNA ingepakt wordt door virale structurele eiwitten. Bij de productie van VRP's worden de ontbrekende structurele genen *in trans* aangeboden. 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.

Voor de productie van alfavirus VRP's, vindt meestal 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.^{23,24} 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.²⁵

Ook VRP's worden onderzocht in het kader van de vaccinontwikkeling of voor oncolytische toepassingen.¹⁶

4. Vorming van infectieuze 'virus-like vesicles' (VLV's)

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 in de structurele genen dus gelimiteerd is tot het

C-gen, kunnen bij werkzaamheden met dergelijke replicons VLV's gevormd worden. Dit zijn afsnoeringen van het plasmamembraan van de geïnfecteerde cel, waar een replicatiecomplex in aanwezig is.² Dit resulteert erin dat het replicon-RNA omgeven wordt door een membraan waarin de envelopeiwitten verankerd zijn. Door de afwezigheid van de capside-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 beperkte mate in staat om andere cellen te infecteren.^{26,27}

Ook wanneer in alfavirus-replicons transgenen worden geïntroduceerd die coderen voor virale envelopeiwitten afkomstig van andere virusfamilies, bijvoorbeeld in het kader van de vaccinontwikkeling tegen verschillende infectieziekten, kunnen infectieuze VLV's^a gevormd worden. Op dit moment zijn infectieuze VLV's beschreven bij alfavirus-replicons met envelopeiwitten van rhabdovirussen,^{2,28,29,30,31,32} retrovirussen,^{33,34} filovirussen,³⁵ en coronavirussen³⁶. VLV's kunnen herhaaldelijk gepasseerd worden op cellijnen,^{2,29,30,36} waarbij mutaties in de niet-structurele genen kunnen ontstaan die leiden tot een efficiëntere productie en hogere titers van de VLV's.^{2,30}

VLV's worden niet enkel gezien als (ongewenst) bijproduct bij de productie van replicons. Er wordt ook onderzoek gedaan naar de toepassing van infectieuze VLV's als vaccins tegen verschillende infectieziekten^{28,30,31,32,35,37} of als potentiële immuuntherapie tegen kanker.³⁸ Een hoge titer is hierbij gewenst en kan zoals eerder vermeld bereikt worden door het herhaaldelijk passeren van de infectieuze VLV's in celculturen.^{2,29,30,36} Ook kunnen doelbewust verdere aanpassingen worden gemaakt aan het replicon om de titer van de infectieuze VLV's te verhogen of kan de introductie van meerdere transgenen de productie van VLV's efficiënter laten verlopen. Zo is door Zhang *et al.* (2024) de productie van een VLV-vaccin tegen Ebola beschreven, waarbij een alfavirus-replicon is gebruikt gebaseerd op VEEV.³⁵ Door het vervangen van de alfavirus structurele eiwitten door het glycoproteïne (GP) van het Ebolavirus werden in beperkte mate VLV's gevormd. Wanneer echter ook het VP40 matrix-eiwit van het Ebolavirus werd toegevoegd, konden op efficiëntere wijze infectieuze VLV's worden gevormd. Door het herhaaldelijk passeren van de GP/VP40-VLV's in cellen kon de titer sterk worden verhoogd.³⁵

Daarnaast wordt onderzoek gedaan naar insertie van immuunmodulerende transgenen in replicons, met als doel de interferonrespons tegen het replicon te verzwakken. Door replicatie van het replicon-RNA wordt een sterkere immuunrespons (i.e., de productie van cytokines, waaronder interferonen) in gang gezet dan bij de toepassing van niet-replicerend mRNA. Een te sterke immuunrespons zorgt voor degradatie van het RNA, waardoor de expressie van het transgen verminderd wordt. Immuunmodulerende transgenen in het replicon, vaak van virale oorsprong, remmen de interferonrespons.^{39,40} Daarnaast kunnen ook modificaties aangebracht worden aan de nucleotiden van het mRNA, zoals het gebruik van (N1-methyl)pseudouridine of 5-(hydroxy)methylcytosine in plaats van ongemodificeerd uracil of cytosine, om herkenning door het immuunsysteem te omzeilen.¹⁹

a. In de wetenschappelijke literatuur worden soms verschillende termen gebruikt voor infectieuze VLV's. Zo worden ze ook wel aangeduid als 'pseudovirussen', 'infectious microvesicles', 'self-propagating membrane-enveloped vesicles', 'self-propagating hybrid replicon particle' (PRP), of 'live attenuated vaccines'.

De toepassing van immuunmodulerende transgenen in VLV's is recent onder meer onderzocht in het kader van potentiële oncolytische toepassing, waarbij als basis SFV-VSV-G replicons zijn gebruikt.³⁸

5. Eerder COGEM advies

In 2022 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de omlaagschaling van werkzaamheden met naakte replicons en VRP's afgeleid van virussen uit de genera *Alphavirus* en *Ortho flavivirus*.¹ De COGEM was van oordeel dat een generieke omlaagschaling van deze replicons mogelijk was onder bepaalde voorwaarden.

De voorwaarden zijn opgesteld om het risico op verspreiding van het replicon of het ontstaan van replicatie-competent virus in te perken. Zo dienen de gebruikte cellen vrij te zijn van verwante virussen om herstel van verwijderde functies door complementatie of recombinatie te voorkomen. Ook zijn er voorwaarden aan de minimale deleties van de structurele genen uit het replicon, en dienen alfavirus VRP's geproduceerd te worden met een split-helper systeem, waarbij de C- en envelop-coderende sequenties strikt gescheiden zijn. Aan de te gebruiken transgenen is de voorwaarde gesteld dat deze niet in staat mogen zijn om de verwijderde functies te herstellen of complementeren. Vanwege de mogelijkheid tot vorming van infectieuze VLV's bij alfavirus-replicons werd hieronder ook verstaan: sequenties die coderen voor de envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae*.

6. Overweging

Naakte replicons en replicondeeltjes worden als biologisch ingeperkt beschouwd, omdat de structurele genen van het gebruikte alfavirus verwijderd zijn en daardoor verdere verspreiding niet mogelijk zou zijn. Er zijn echter verschillende wetenschappelijke publicaties verschenen waarin de vorming van infectieuze VLV's bij replicons afgeleid van alfavirussen beschreven staat. Daarbij zijn de coderende sequenties van envelopeiwitten van virussen uit verschillende families als transgen gebruikt. Dergelijke infectieuze VLV's die (bedoeld of onbedoeld) ontstaan tijdens werkzaamheden met replicons afgeleid van alfavirussen, kunnen leiden tot verdere verspreiding van het replicon-RNA tussen cellen. Omdat het C-eiwit ontbreekt, worden VLV's minder efficiënt geproduceerd dan de oorspronkelijke virusdeeltjes, en wordt aangenomen dat VLV's minder stabiel zijn. In meerdere publicaties is echter aangetoond dat de infectieuze titer van VLV's verhoogd kan worden door adaptatie tijdens passeren in celcultures, en ook kunnen combinaties van verschillende transgenen leiden tot efficiëntere VLV-vorming. Of infectieuze VLV's kunnen worden uitgescheiden door dieren of mensen, is niet bekend. Eveneens is de COGEM niet bekend met gegevens over verspreiding van infectieuze VLV's tussen dieren en/of mensen.

Tevens is beschreven dat insertie van immuunmodulerende sequenties in alfavirus-replicons, vaak van virale oorsprong, zorgt voor efficiëntere replicatie van het replicon doordat de interferonrespons wordt onderdrukt. Dit leidt tot een gewenste verbeterde expressie van transgenen, maar kan mogelijk ook bijdragen aan een efficiëntere verspreiding van VLV's. Hierover zijn echter nog geen gegevens bekend.

Vanwege bovenstaande beschreven ontwikkelingen en de onzekerheden over uitscheiding en verspreiding van infectieuze VLV's, is de COGEM van oordeel dat uit voorzorg werkzaamheden met replicons waarbij vorming van infectieuze VLV's kan optreden, niet generiek omlaag geschaald kunnen worden.

In het eerder uitgebrachte advies over werkzaamheden met replicons heeft de COGEM het gebruik van envelopeiwitten van bepaalde virusfamilies uitgesloten van de generieke milieurisicobeoordeling voor omlaagschaling van alfavirus-replicons.¹ Deze lijst blijkt echter niet limitatief te zijn, nadat er recentelijk meerdere publicaties verschenen zijn waarin VLV's beschreven of geproduceerd zijn door gebruik te maken van andere virale envelopeiwitten. Op dit moment is de vorming van infectieuze VLV's beschreven voor replicons die envelopeiwitten tot expressie brengen van rhabdovirussen,^{2,28,29,30,31} retrovirussen,^{33,34} filovirussen,³⁵ en coronavirussen³⁶. De COGEM sluit echter niet uit dat ook andere eiwitten met fusogene eigenschappen (i.e., eiwitten die de fusie van celmembranen kunnen faciliteren) in staat zijn tot het infectieus maken van VLV's. Ook kunnen combinaties van genen leiden tot efficiënte productie van infectieuze VLV's (zoals beschreven voor het VLV-vaccin tegen Ebolavirus), met daaraan gekoppeld een hogere kans op uitscheiding en verspreiding.

7. Advies

Eerder heeft de COGEM als algemene voorwaarden voor omlaagschaling van werkzaamheden met alfavirus-replicons gesteld dat¹:

- De gebruikte cellen vrij zijn van verwante alfavirussen;
- De gebruikte transgenen de verwijderde functies niet mogen complementeren (daaronder vallen ook sequenties die coderen voor de envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae*).

Omdat envelopeiwitten van andere virusfamilies mogelijk ook 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, adviseert de COGEM om haar eerder geadviseerde voorwaarde om sequenties die coderen voor de envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae* uit te sluiten, te vervangen door het nieuwe doelvoorschrift:

- Werkzaamheden met alfavirus-replicons met (combinaties van) transgenen die het replicon de capaciteit geven om te verspreiden, zijn uitgesloten van generieke omlaagschaling.

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^b), en combinaties van potentieel fusogene en immuunmodulerende eiwitten.

b. Een ERV is een (meestal incomplete) geïntegreerde retrovirale sequentie dat gezien wordt als evolutionair overblijfsel van een retrovirale infectie die miljoenen jaren geleden heeft plaatsgevonden.

De COGEM is van oordeel dat door het opnemen van dit bredere doelvoorschrift bij haar eerdere generieke advies over de inschaling van werkzaamheden met alfavirus-replicons,¹ de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is.

Referenties

1. COGEM (2022). Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM-advies CGM/221223-01
2. 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
3. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: *Fields Virology*, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Togaviridae*. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezocht: 15 april 2025)
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. Firth AE *et al.* (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol J.* 5:108. doi: 10.1186/1743-422X-5-108
8. Jose J *et al.* (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4: 837–856
9. Elmasri Z *et al.* (2021). Alphavirus-induced membrane rearrangements during replication, assembly, and budding. *Pathogens* 10: 984. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080984>
10. Yingzhong L *et al.* (2019). In vitro evolution of enhanced RNA replicons for immunotherapy. *Sci. Rep.* 9: 6932
11. Lundstrom K (2021). Self-replicating RNA viruses for vaccine development against infectious diseases and cancer. *Vaccines* 9: 1187
12. Hannemann H (2020). Viral replicons as valuable tools for drug discovery. *Drug Discov. Today.* 25: 1026–1033
13. Lundstrom K (2024). Self-Replicating Alphaviruses: From Pathogens to Therapeutic Agents. *Viruses.* 16: 1762
14. Lundstrom K (2023). Alphaviruses in cancer immunotherapy. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 379: 143–168
15. Silva-Pilipich N (2024). Self-Amplifying RNA: A Second Revolution of mRNA Vaccines against COVID-19. *Vaccines* 12: 318
16. Aliahmad P *et al.* (2023). Next generation self-replicating RNA vectors for vaccines and immunotherapies. *Cancer Gene Ther.* 30: 785–793
17. 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: 446–45
18. Lundstrom K (2020). Self-amplifying RNA viruses as RNA vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 5130
19. Casmil *et al.* (2025, in press). The advent of clinical self-amplifying RNA vaccines, *Molecular Therapy* (2025), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.03.060>
20. Schmidt C & Schnierle BS (2023). Self-Amplifying RNA Vaccine Candidates: Alternative Platforms for mRNA Vaccine Development. *Pathogens*, 12: 138
21. Arcturus Therapeutics, Inc. (2025). European Commission approves CSL and Arcturus Therapeutics' KOSTAIVE®, the first self-amplifying mRNA COVID-19 vaccine. <https://ir.arcturusrx.com/news-releases/news-release-details/european-commission-approves-csl-and-arcturus-therapeutics> (bezocht 15 april 2025)
22. European Medicines Agency (EMA). Kostaive. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kostaive> (bezocht 15 april 2025)
23. 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
24. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J. Virol.* 73: 1092–1098
25. 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
26. Ruiz-Guillen, M *et al.* (2016). Capsid-deficient alphaviruses generate propagative infectious microvesicles at the plasma membrane. *Cell Mol. Life Sci.* 73: 3897–3916
27. Jia, F *et al.* (2017). Pseudo-typed Semliki Forest virus delivers EGFP into neurons. *J. Neurovirol.* 23: 205–215

28. 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
29. 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
30. 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
31. Zhang YN *et al.* (2020). A novel rabies vaccine based on infectious propagating particles derived from hybrid VEEV-Rabies replicon. *EBioMedicine* 56: 102819
32. Chiale C *et al.* (2020). Modified Alphavirus-Vesiculovirus hybrid vaccine vectors for homologous prime-boost immunotherapy of chronic hepatitis B. *Vaccines* 8: 279
33. Lebedeva I *et al.* (1997). Infectious particles derived from Semliki Forest virus vectors encoding murine leukemia virus envelopes. *J. Virol.* 71: 7061–7067
34. COGEM (2023). Inschaling werkzaamheden met VEEV-replicondeeltjes met structurele genen van retrovirussen BLV en FeLV. COGEM advies CGM/231019-01
35. Zhang HQ *et al.* (2024). Rational design of self-amplifying virus-like vesicles with Ebola virus glycoprotein as vaccines. *Mol Ther.* 32: 3695-3711
36. 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
37. 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
38. Chen J *et al.* (2023). Cancer immunotherapy with enveloped self-amplifying mRNA CARG-2020 that modulates IL-12, IL-17 and PD-L1 pathways to prevent tumor recurrence. *Acta. Pharm. Sin. B.* 14: 335–349
39. Blakney AK *et al.* (2021). Innate Inhibiting Proteins Enhance Expression and Immunogenicity of Self-Amplifying RNA. *Mol. Ther.* 29: 1174-1185
40. Beissert T *et al.* (2017). Improvement of In Vivo Expression of Genes Delivered by Self-Amplifying RNA Using Vaccinia Virus Immune Evasion Proteins. *Hum. Gen. Ther.* 28: 1138-1146