

Repliconvaccins en milieurisico op de weegschaal

Tessy Hick, Gorben Pijlman

Samenvatting

Een nieuwe klasse van mRNA-vaccins gebaseerd op 'zelfvermeerderend mRNA' (replicon) kan snel worden ingezet bij ziekte-uitbraken en is inmiddels op de markt. Het zelfvermeerderende vermogen van deze mRNA-vaccins is vaak afgeleid van alfavirussen. Er bestaat een theoretisch risico van recombinatie tussen deze alfavirusafgeleide replicons en circulerende alfavirussen, hoewel het optreden hiervan nauwelijks is onderzocht. In dit onderzoek voeren we uitgebreide in vitro en in vivo experimenten uit om recombinatie tussen een repliconvaccin en een breed scala aan alfavirussen te onderzoeken. Allereerst bleken repliconvaccins effectief alfavirus-coreplicatie te beperken via het fenomeen 'superinfection exclusion', hoewel enige coreplicatie van het replicon en virale RNA nog steeds mogelijk was. Via een gevoelige, chimeerselectieve detectiemethode konden replicatie-competente alfaviruschimeren in gekweekte cellen aangetoond worden. De chimereen vertoonden echter geen verhoogde replicatiesnelheid ten opzichte van de beide oudervirussen. Chimereen werden daarnaast niet in vivo aangetroffen bij C57BL/6J, *Rag1*^{-/-} en *Ifnar*^{-/-} muizen, ondanks hoge RNA-niveaus van het repliconvaccin en het coreplicerende alfavirus in hetzelfde weefsel. Samenvattend stellen we dat hoewel het vermogen van repliconvaccins om te recombineren met alfavirussen als een milieurisico kan worden gezien, meerdere factoren ervoor zorgen dat chimere alfavirussen in vivo niet gemakkelijk zullen ontstaan. Ten slotte geven we richting aan de discussie of een replicon wel/of niet gezien zou moeten worden als een genetisch gemodificeerd organisme en wat eventuele consequenties daarvan kunnen zijn.

Summary

A next-generation of licensed mRNA vaccines based on alphavirus-based self-amplifying mRNA (replicon) can be rapidly deployed in the event of disease outbreaks. A theoretical safety concern is the potential

for recombination between replicons and circulating alphaviruses, but this has never been studied in detail. In this research, we undertake extensive in vitro and in vivo assessments to explore recombination between a replicon vaccine and a wide selection of alphaviruses. Replicon vaccines were found to effectively limit alphavirus co-infection through superinfection exclusion, although some co-replication was still possible. Using sensitive cell-based assays, replication-competent alphavirus chimeras were generated in vitro as a result of rare, but reproducible, RNA recombination events. The chimeras displayed no increased fitness in cell culture. Viable alphavirus chimeras were not detected in vivo in C57BL/6J, *Rag1*^{-/-} and *Ifnar*^{-/-} mice, in which high levels of replicon vaccine and alphavirus co-replicated in the same tissue. In conclusion we state that although the ability of replicon vaccines to recombine with alphaviruses might be viewed as an environmental safety concern, several key factors substantially mitigate against in vivo emergence of chimeric viruses. Finally, we give direction to the discussion whether or not replicons are genetically modified organisms, and possible implications thereof.

Introductie

Dé grote wetenschappelijke doorbraak tijdens de coronapandemie was ongetwijfeld de ontwikkeling en toepassing van mRNA-vaccins tegen het bèta-coronavirus SARS-CoV-2. Wereldwijd hebben honderden miljoenen mensen een of meer COVID-19 mRNA-vaccinaties ontvangen (bijvoorbeeld Pfizer-

Umeå University, Umeå, Sweden, Department of Medical and Translational Biology, dr. ir. T.A.H. Hick, postdoc.
Wageningen University and Research, Wageningen, the Netherlands, Laboratory of Virology,
prof. dr. ir. G.P. Pijlman, professor.
Correspondentieadres: G.P. Pijlman
(gorben.pijlman@wur.nl).

BioNTech, Comirnaty/BNT162b2; Moderna, Spikevax/mRNA-1273). Dit heeft het onderzoeksveld van de vaccinologie voorgoed veranderd. Het is dan ook zeer terecht dat in 2023 de Nobelprijs voor Geneeskunde is toegekend aan de wetenschappers die aan de basis van de mRNA-vaccintechnologie stonden [1]. De combinatie van RNA-modificatie en formulering van het mRNA in lipide nanodeeltjes (LNP's) bleek cruciaal voor de werkzaamheid. Vaccins gebaseerd op mRNA zijn veilig, effectief en snel aanpasbaar, wat zeer van belang is om een pandemisch virus het hoofd te bieden. Zoals verwacht werden ook bijwerkingen gemeld. Deze hadden deels te maken met de hoge initieel toegepaste mRNA dosering (Spikevax; 100 microgram), die onder meer een kortdurende interferonrespons opwekt. Het mRNA-boostervaccin dat momenteel in Nederland wordt gebruikt heeft een lagere dosis (Comirnaty; 30, 10 of 3 microgram, afhankelijk van de leeftijd).

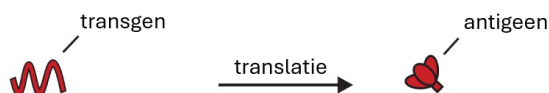
Om mRNA nog effectiever te maken en/of de dosering omlaag te brengen [2], is er de laatste jaren steeds meer aandacht gekomen voor doorontwikkeling van dit type vaccins in de vorm van zogeheten 'zelfvermeerderend mRNA' (ook wel: replicon) (zie *figuur 1*). Sommige repliconvaccins zijn al op de markt en andere bevinden zich in de klinisch testfase [2-6].

Replicons bestaan in het wetenschappelijke onderzoek al vele tientallen jaren en maken (meestal) gebruik van de replicatiemachinerie van een alfavirus [7,8]. Een belangrijke eigenschap van een replicon is dat deze zich niet kan verspreiden naar naburige cellen terwijl een alfavirus dat wel kan.

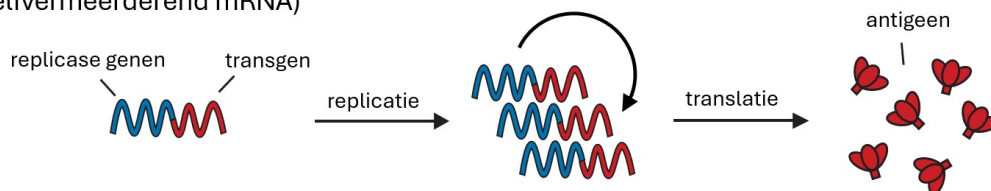
Het van alfavirus-afgeleide replicon dat tegenwoordig het meest wordt toegepast, is gebaseerd op een levend-verzwakte stam van het Venezolaanse equine-encefalitisvirus (VEEV-TC83) [9]. Door de genen coderend voor de structurele eiwitten (capside, envelop) te verwijderen uit het VEEV-TC83-genoom, ontstaat een replicon dat in cellen het eigen RNA kan vermeerderen, maar de cel niet meer kan verlaten omdat de capside- en envelopeiwitten ontbreken. De vermeerdering van het replicon-RNA in cellen komt tot stand door de enzymatische activiteit van vier zogeheten niet-structurele alfaviruseiwitten, nsP1-4 [10]. Tezamen vormen deze eiwitten het alfavirusreplicase, een eiwitcomplex dat zowel nieuw replicon-RNA als een korter 'subgenomisch' (sg)RNA-molecuul maakt. Normaliter codeert het sgRNA voor structurele genen, maar in een replicon is dit vervangen voor een gen naar keuze door middel van genetische modificatie. Op die manier zorgt een replicon ervoor dat in cellen een specifiek antigeen (bijvoorbeeld een spike-eiwit van SARS-CoV-2) wordt aangemaakt, dat

Figuur 1. De huidige mRNA-vaccinplatformen. Het traditionele mRNA-vaccin bevat een transgen dat codeert voor een antigeen, terwijl het repliconvaccin tevens 'replicase'-genen bevat die zorgen voor vermeerdering van het replicon-RNA. Met een replicon kan bij dezelfde initiële mRNA-dosis een grotere hoeveelheid antigeen worden geproduceerd, danwel een lagere dosis worden gebruikt om dezelfde hoeveelheid antigeen aan te maken.

mRNA vaccin



Replicon vaccin (zelfvermeerderend mRNA)



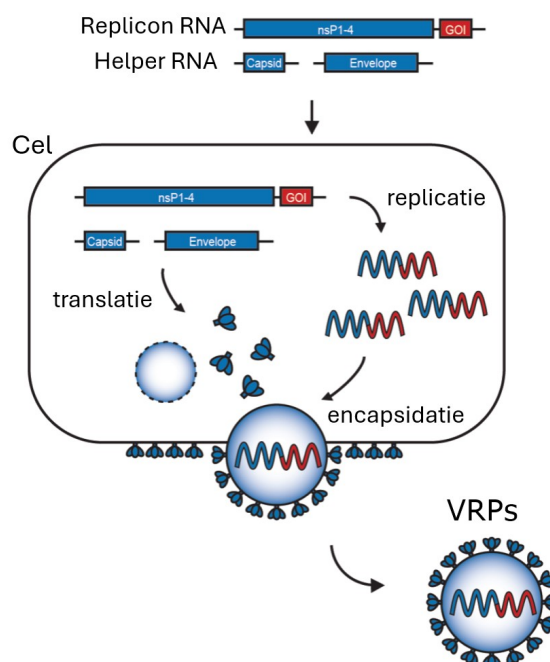
vervolgens herkend wordt door immuuncellen die antistoffen gaan produceren en immunologisch geheugen aanleggen (vaccinatie) [6].

Een repliconvaccin tegen het porcine epidemische diarreevirus (iPED+, Harrisvaccines Inc.) kreeg in 2012 in de Verenigde Staten een vergunning voor markttoelating, waarna meer dan 2 miljoen doses voorgeschreven werden door dierenartsen voor gebruik bij varkens [11]. De technologie werd in 2015 overgenomen door MSD Animal Health en staat nu bekend als het Sequivity-vaccinplatform, dat gebaseerd is op VEEV-TC83 replicon-RNA verpakt in virusachtige replicondeeltjes (VRP's) [12]. Recentelijk hebben de USDA en het EMA een nieuw vaccin tegen kattenleukemie (feline leukemievirus) toegelaten dat VRP's bevat, Nobivac NXT FeLV (MSD Animal Health). Het humane COVID-19-repliconvaccin Kostaive/ARCT-154 (CSL/Arcturus Therapeutics) verkreeg in 2023 goedkeuring in Japan [13] en in 2024 in Europa. In tegenstelling tot de Sequivity-replicons die als VRP's zijn verpakt, is ARCT-154 geformuleerd in LNP's.

Om VRP's te maken, is het nodig om naast het replicon-RNA ook een zogeheten 'helper-RNA' mee te transfecteren in de productiecel. Het helper-RNA wordt daarbij niet ingepakt in de VRP's maar zorgt wel voor de tijdelijke productie van capside- en envelop-eiwitten. Het is bekend dat er bij productiesystemen met een enkel helper-RNA, soms recombinatie kan optreden, waardoor de capside- en envelopgenen geïntroduceerd worden in het replicon. Dat krijgt dan de mogelijkheid terug om zich als virus te verspreiden. Dit is ongewenst, en daarom worden tegenwoordig bij VRP-productie altijd twee afzonderlijke helper-RNA's gebruikt (één coderend voor capside, de ander voor envelop-eiwitten) om zo de productie van een infectieus virus door middel van recombinatie te voorkomen [14,15] (zie *figuur 2*).

Replicontechnologie is veelbelovend; het is innovatief, effectief en ook veilig, mede doordat replicons zich niet kunnen verspreiden in het milieu. Dit is dan ook de reden dat er gepleit wordt voor versoepeling van de regels voor het gebruik van deze technologie, bijvoorbeeld via een generieke omlaagsschaling van replicons die aan bepaalde voorwaarden voldoen (COGEM-adviezen CGM/221223-01 en CGM/250430-01). Een voorwaarde is bijvoorbeeld dat het transgen (= een gen afkomstig uit een ander organisme/virus) er niet voor mag zorgen dat het replicon zich weer kan gaan verspreiden.

Figuur 2. Productie van virus-like replicon particles (VRP's). Een productiecel wordt getransfecteerd of geëlectroporeerd met replicon-RNA en twee afzonderlijke helper-RNA's die coderen voor de capside- en envelop-eiwitten. De helper-RNA's worden niet ingepakt in de VRP's vanwege het ontbreken van een 'packaging signal' dat alleen aanwezig is op het replicon-RNA. De VRP's worden geoogst en geformuleerd als vaccin. VRP's kunnen replicon-RNA afgeven aan cellen van de gevaccineerde, maar daarna spreidt het replicon niet verder naar andere cellen. GOI: gene-of-interest = transgen



Het vermogen van het alfavirus-RNA-genoom om te recombineren in cellen vormt een ander, voornamelijk theoretisch, risico voor repliconvaccins [6,16], waarover niet veel bekend is vanuit de literatuur. Wildtype (WT)-circulerende alfavirussen kunnen in theorie een recente ontvanger van een repliconvaccin infecteren, waardoor de mogelijkheid ontstaat voor recombinatie leidend tot het genereren van een nieuw chimeer alfavirus. Zo'n chimeer zou dan kunnen bestaan uit de structurele genen van het WT-alfavirus en enkele (of alle) replicasegenen van het repliconvaccin. Omdat alfavirussen zich via muggen verder verspreiden en ernstige ziekteklachten kunnen veroorzaken, variërend van encefalitis tot artritis, zou

een chimeer alfavirus een ernstig gezondheidsrisico en/of milieurisico kunnen vormen [17]. In ons onderzoek hebben we daarom de mogelijkheid tot recombinatie tussen een repliconvaccin en een brede selectie van WT-alfavirussen onderzocht, zowel in cellijnen (in vitro) als in muizen (in vivo). Het doel van ons onderzoek was om inzicht te verkrijgen in de waarschijnlijkheid en gevolgen van een eventuele recombinatie, om zo een betere risicoschatting te maken.

Resultaten

Gelijktijdige RNA-replicatie van een repliconvaccin en een wildtype-alfavirus in vitro

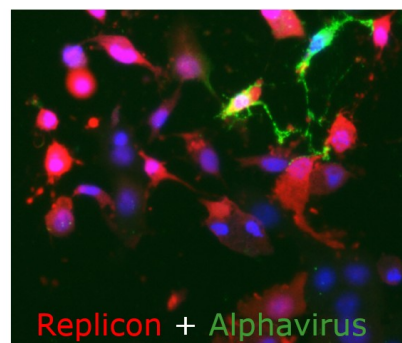
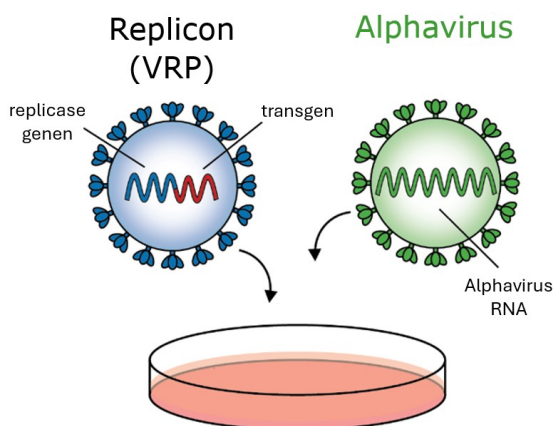
Voor recombinatie tussen een repliconvaccin en een WT-alfavirus is het vereist dat beide RNA-moleculen zich in dezelfde cel vermeerderen. Een virologisch fenomeen dat bekendstaat als 'superinfection exclusion', waarbij een eerdere virusinfectie de daaropvolgende infectie met een vergelijkbaar virus blokkeert, treedt echter ook op bij alfavirussen [18,19]. Toch waren wij in staat om co-expressie van replicon- en WT-alfaviruseiwitten waar te nemen in een klein percentage Verocellen (circa 7 procent) met behulp van fluorescentiemicroscopie (zie *figuur 3*). We

concludeerden daaruit dat 'superinfection exclusion' slechts ten dele optreedt [20] en niet geheel kan voorkomen dat replicon- en WT-alfavirus-RNA samen in een cel repliceren.

Recombinatie tussen een repliconvaccin en een wildtype-alfavirus in vitro

Het ontstaan van chimere alfavirussen werd vervolgens onderzocht door supernatanten van ge-coïnfekteerde/getransduceerde Verocellen, waarin mogelijk recombinatie had opgetreden, naar selectieve HelaΔG3BP-cellen (of naar gewone Helacellen als controle) over te brengen. HelaΔG3BP-cellen zijn humane Helacellen waarin de genen coderend voor G3BP (Ras GTPase-activating protein-binding protein) zijn verwijderd door middel van CRISPR-Cas. Replicatie van de meeste alfavirussen wordt niet ondersteund in HelaΔG3BP-cellen omdat G3BP nodig is voor virale RNA-replicatie. Maar VEEV-TC83 behoort tot een andere fylogenetische groep alfavirussen en kan zich in HelaΔG3BP wel vermenigvuldigen. Een levensvatbaar chimeer alfavirus (bestaande uit het replicase van VEEV-TC83 en de structurele genen van een WT-alfavirus) kan zich daarom vermeerderen en gedetecteerd worden in HelaΔG3BP-cellen (zie *figuur 4A*). In het laboratorium kunnen we op die manier onderscheid maken tussen

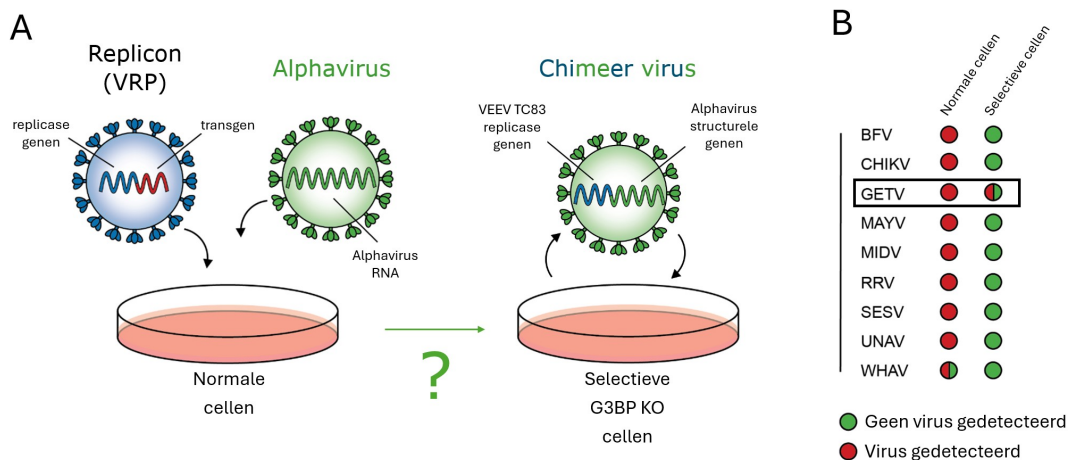
Figuur 3. Co-replicatie van replicon- en alfavirus-RNA. Experimentele aanpak waarbij Vero- (*Cercopithecus aethiops*) cellen werden getransduceerd met VRP's (VEEV TC83-replicon dat mCherry produceert) en geïnfecteerd met een wildtype-alfavirus (chikungunyavirus). Fluorescentiemicroscopie van ge-cotransduceerde/geïnfecteerde Verocellen. Celkernen gekleurd met Hoechst (blauw), replicon (rood) en chikungunyavirus aangekleurd met E2-antiserum (groen).



Figuur 4. In vitro-recombinatie tussen een repliconvaccin en wildtype-alfavirussen.

A. Experimentele aanpak waarbij Verocellen werden geïnfecteerd met wildtype-alfavirussen en getransduceerd met replicon in de vorm van VRP's. Na 72 uur werden supernatanten in totaal vier keer (elke drie tot vier dagen) gepasseerd op normale Hela- (Homo sapiens) en selectieve HelaΔG3BP-cellen, waarbij cytopatisch effect (CPE) werd gescoord met lichtmicroscopie.

B. Alfavirussen induceerden CPE in normale Helacellen, maar niet in HelaΔG3BP-cellen. Barmah Forestvirus (BFV), chikungunyavirus (CHIKV), getahvirus (GETV), Mayaravirus (MAYV), Middelburgvirus (MIDV), Ross Rivervirus (RRV), southern elephant sealvirus (SESV), Unavirus (UNAV), Whatarovirus (WHAV). CPE in selectieve HelaΔG3BP-cellen wijst op de aanwezigheid van een chimeer alfavirus, dat alleen werd waargenomen in de combinatie met GETV (gekaderd).



een WT-alfavirus en een chimeer alfavirus. Infecties met negen verschillende, G3BP-afhankelijke, alphavirussen, te weten Barmah Forest (BFV), chikungunya (CHIKV), Una (UNAV), getah (GETV), Mayaro (MAYV), Middelburg (MIDV), Ross River (RRV), southern elephant seal (SESV) en Whataroa (WHAV), werden gevolgd door transductie met VRP's die een VEEV-TC83-replicon met een mCherry reporter gen bevatten (VEEVrep-mCherry). Het optreden van recombinatie (leidend tot chimere virussen) werd onderzocht door het supernatant meerdere malen te passeren op selectieve HelaΔG3BP-cellen (zie *figuur 4B*).

Geen enkele combinatie, op één na, slaagde er in een chimeer alfavirus te genereren dat een cytopatisch effect (CPE; celdood als gevolg van virusinfectie) in HelaΔG3BP-cellen liet zien. Echter, CPE werd waargenomen in 1 van de welletjes van een 24-wellsplaat met HelaΔG3BP-cellen. Dit welletje had het supernatant ontvangen van Verocellen die geïnfecteerd waren met GETV en tevens getransduceerd waren met VEEVrep-mCherry. Het experiment werd

vervolgens herhaald met GETV, ditmaal in 96-wellsplaten, in combinatie met VEEVrep-mCherry en met een additioneel replicon dat een nanoluciferase reporter gen bevat (VEEVrep-nLuc). In dit experiment werd er in geen van de 96 welletjes met de combinatie GETV en VEEVrep-mCherry CPE gezien, terwijl 1 van de 96 welletjes met de combinatie GETV en VEEVrep-nLuc CPE liet zien. Dit betekent dat recombinatie zeldzaam is en tevens niet afhankelijk is van het reporter gen dat aanwezig is in het replicon.

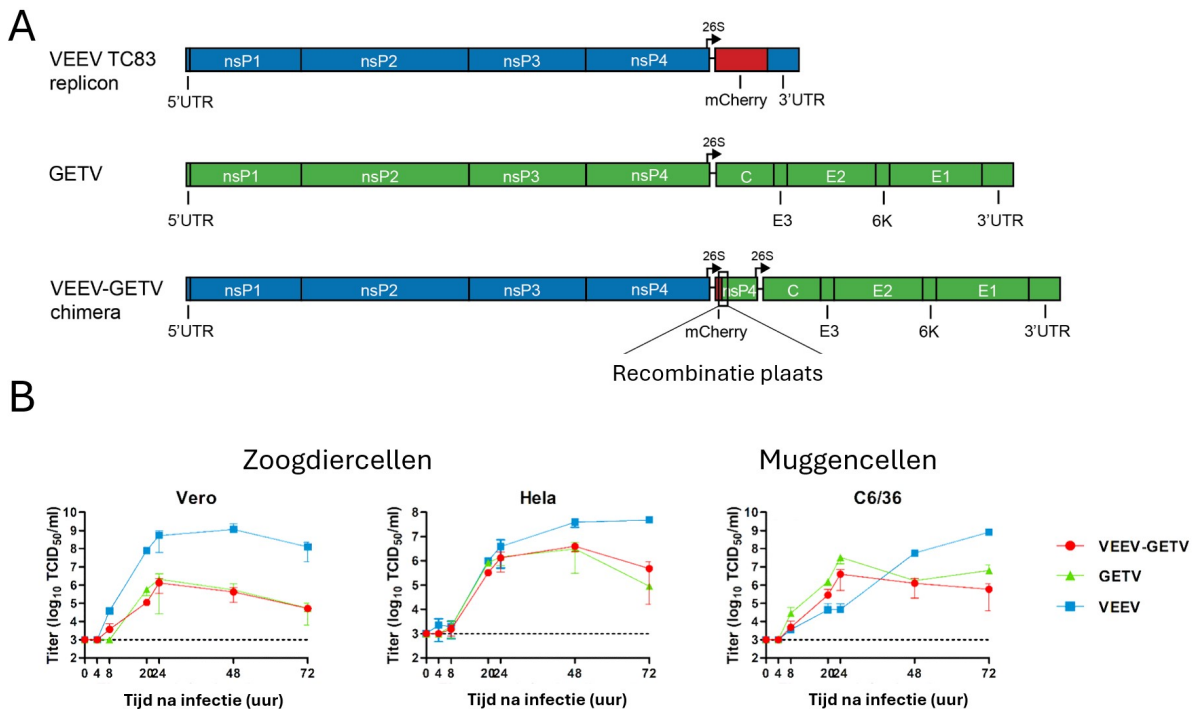
Fitness van de VEEV-GETV chimeer in vitro

Het ontstaan van twee soortgelijke VEEV-GETV-chimeren in twee onafhankelijke experimenten werd bevestigd met RT-PCR en RNA-sequencing. De analyse liet zien dat beide chimere recombinatieplaatsen bevatten binnen het reporter gen (mCherry of nLuc) van het replicon en binnen het nsP4-gen van GETV (zie *figuur 5A*).

Om de fitness van de VEEV-GETV-chimeer te beoordelen, werd de groei vergeleken met de oudervirussen VEEV-TC83 en GETV in zoogdiercellen

Figuur 5. A. Karakterisering van de VEEV-GETV-chimeer. Genoomorganisatie van de VEEV-GETV-chimeer. UTR: untranslated region, 26S: subgenomische promotor. De recombinatieplaats tussen VEEV-TC83-replicon en GETV is aangegeven.

B. Karakterisering van de alfavirus-chimeer. Replicatiekinetiek van VEEV-GETV-chimeer vergeleken met VEEV-TC83 en GETV in Vero- (*Cercopithecus aethiops*), Hela- (*Homo sapiens*) en C6/36- (*Aedes albopictus*) cellen. Virustiters werden bepaald door seriële verdunningsassays (detectielimiet aangegeven met stippellijn).



(Vero, Hela) en in muggencellen (C6/36, *Aedes albopictus*). In alle zoogdiercellen en de muggencellen was de titer van de chimeer 48 tot 72 uur na infectie meer dan 1 log lager dan VEEV-TC83 (zie *figuur 5B*). De chimeer groeide ook nooit tot significant hogere titers dan GETV. Deze experimenten laten zien dat een VEEV-GETV-chimeer weliswaar gemaakt kan worden in vitro onder optimale condities en met een selectieve cellijn gedetecteerd kan worden, maar dat de fitness van deze chimeer niet verhoogd was ten opzichte van de oudervirussen.

Geen bewijs voor het ontstaan van chimere alfavirussen in vivo

Om te onderzoeken of recombinatie tussen een repliconvaccin en een WT-alfavirus mogelijk zou zijn

in vivo, werden VEEVrep-mCherry VRP's gemengd met GETV en samen subcutaan geïnjecteerd in de achterpoten van volwassen wildtype-C57BL/6J-muizen, recombinatie-activerend gen 1 deficiënte (*Rag1*^{-/-}) muizen, en type I interferon (IFN) receptordeficiënte (*Ifnar*^{-/-}) muizen. C57BL/6J-muizen vormen een standaardmodel voor alfavirusarthritis [21,22] met korte viremie. *Rag1*^{-/-} muizen, die geen functionele B- en T-cellen hebben, laten aanhoudende viremie zien [22,23] terwijl *Ifnar*^{-/-} muizen hoge viremie laten zien [24,25].

Serum- en weefselmonsters werden verzameld op de aangegeven dagen na injectie (zie *figuur 6A*). De viremie ontwikkelde zich zoals verwacht (zie *figuur 6B*). Het ontstaan van chimere alfavirussen in muizen werd allereerst onderzocht door RNA te sequencen, wat de gelijktijdige aanwezigheid van replicon en GETV in

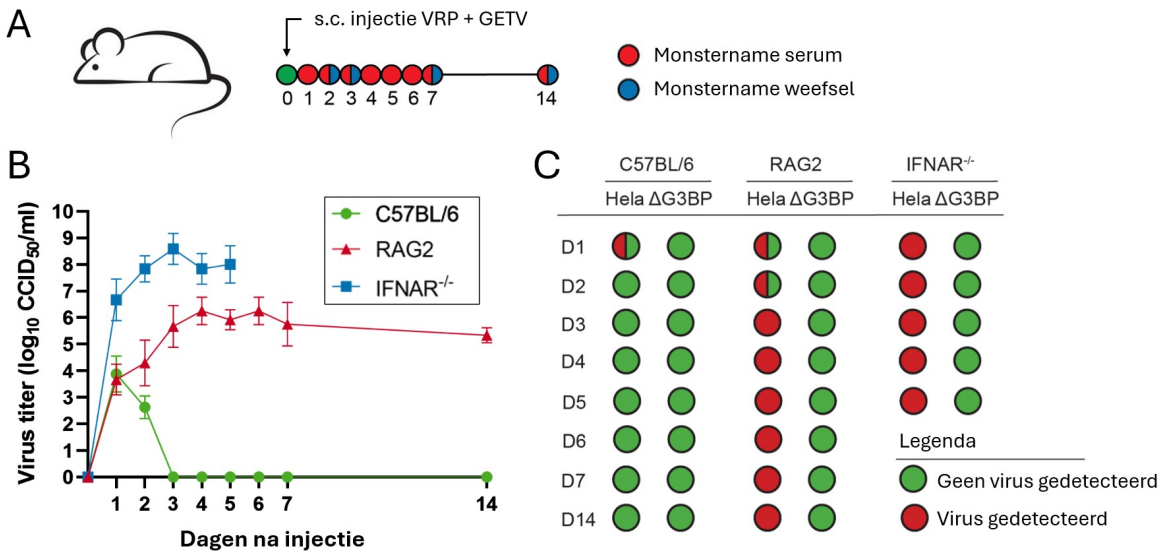
voetweefsels bevestigde. Er werd echter in geen enkel weefselmonster bewijs voor recombinatie gevonden. Serummonsters werden onderzocht op de aanwezigheid van chimere door passage op HelaΔG3BP-cellen zoals eerder beschreven. Er werd echter voor geen enkel serummonster CPE waargenomen in HelaΔG3BP-cellen, wat betekent dat er geen recombinatie heeft plaatsgevonden die resulteerde in een infectieuze VEEV-GETV-chimeer (zie figuur 6C).

Discussie

In dit onderzoek, dat elders meer uitvoerig beschreven is [26], vonden we het eerste bewijs voor het optreden van recombinatie tussen een repliconvaccin en GETV, resulterend in een VEEV-GETV-chimeer. We zagen echter dat dit verschijnsel zeldzaam is en alleen optrad in vitro onder sterk geoptimaliseerde omstandigheden en alleen in combinatie met een GETV-infectie. Recombinatie werd niet waargenomen bij de andere acht alfavirussen onder identieke omstandigheden, wat suggereert dat levensvatbare chimere niet gemakkelijk kunnen worden gegenereerd met VEEVrep in combinatie met BFV, CHIKV, MAYV, MIDV,

RRV, SESV of WHAV. Ondanks optimalisatie van de in vivo omstandigheden waaronder recombinatie zou kunnen optreden, waren we niet in staat om replicatiecompetente chimere te detecteren in drie verschillende muismodellen, zelfs niet in *Ifnar*^{-/-} muizen, waarbij hoge niveaus van replicon en GETV samen tot expressie kwamen in hetzelfde weefsel. Hoewel het vermogen van repliconvaccins om te recombineren met een wildtype-alfavirus als een milieurisico kan worden gezien, voorkomt een reeks factoren het ontstaan van dergelijke chimere. Ten eerste vermindert 'superinfection exclusion' de kans op replicatie van replicon en alfavirus in dezelfde cel [20]. Daarnaast zorgt een replicon voor CPE in zoogdiercellen [27], dus het aantal getransduceerde cellen neemt gestaag af na vaccinatie. Vaccinatie met replicon gevolgd door een natuurlijke alfavirusinfectie zou dus binnen een kort tijdbestek moeten plaatsvinden om co-replicatie in hetzelfde weefsel en in dezelfde cel mogelijk te maken. Bovendien veroorzaakt infectie met een alfavirus in vivo doorgaans een snelle inductie van beschermende neutraliserende antilichamen [23,28]. Zodra een chimeer alfavirus zou verschijnen in een tegelijk geïnfecteerd en gevaccineerd individu, zou de chimeer

Figuur 6. In vivo repliconvaccin en GETV-co-injectie. **A.** Muizen werden subcutaan geïnjecteerd met replicon en GETV in de achterpoten. Serum- en weefselmonsters werden verzameld op de aangegeven dagen na de injectie. **B.** GETV-viremie in muizen (n = 12 of 9 op dag 1 en dalend tot n = 3 op dag 5 voor *Ifnar*^{-/-} muizen, en n = 3 op dag 14 voor C57BL/6J en *Rag1*^{-/-} muizen). **C.** Serummonsters werden in totaal vier keer gepasseerd op Hela- en selectieve HelaΔG3BP-cellen. CPE werd gescoord met lichtmicroscopie.



dezelfde structurele eiwitten bevatten als het wildtype-alfavirus en zou het daardoor worden geneutraliseerd door dezelfde antilichamen. Tot slot zijn alfavirusuitbraken veelal sporadisch, meestal van korte duur of beperkt tot specifieke geografische regio's [17,29], waardoor de kans op infectie bij ontvangers van een repliconvaccin wordt beperkt.

Nu we hebben laten zien dat het risico op recombinatie tussen replicon en alfavirus in vivo heel erg klein is, blijft de vraag of replicontechnologie in brede zin haar beloftes ook waar kan maken. In ieder geval gaat het replicononderzoek onverminderd door, gesteund door de eerste markttoelatingen die de weg geplaveid hebben voor toekomstige replicontoepassingen. Toch zijn er nog wel enkele hobbels te nemen. Enerzijds vraagt het veld om minder (omslachtige) regelgeving om replicononderzoek sneller naar de kliniek te kunnen brengen, anderzijds blijven er zorgen over de technologie, met name in toepassingen waarbij de eigenschap van een replicon om zich niet te verspreiden (gedeeltelijk) teniet wordt gedaan. Voorbeelden zijn replicons waarin het transgen bestaat uit een viraal envelopeiwit dat kan fuseren met andere cellen. Ook al bevat zo'n replicon meestal geen alfavirus-capsidegen, toch wordt soms verspreiding van het replicon in vitro en in vivo waargenomen, wat verklaard wordt door het ontstaan van zogeheten virus-like vesicles (VLV's), die waarschijnlijk bestaan uit afsnoeringen van replicon-positieve cellen waarin een actief alfavirusreplicase aanwezig is [30]. VLV's staan in de belangstelling omdat ze een hogere efficiëntie kunnen bereiken dan een zich niet-verspreidend replicon. Hoe VLV's precies geclassificeerd moeten worden is niet geheel duidelijk: VLV's zijn geen virussen in klassieke zin (immers, een gen voor capside-eiwit ontbreekt); toch is het niet vol te houden dat het hier strikt zich niet-verspreidende mRNA-moleculen betreft.

In dit kader is het interessant om te vermelden dat de Europese Commissie recentelijk heeft gecommuniceerd dat replicons niet langer aangemerkt worden als GGO, aangezien een replicon zich niet kan verspreiden van cel naar cel en daarom niet onder de definitie van een organisme valt. Deze redenering lag aan de basis van het niet uitvoeren van een milieuriscobeoordeling bij de recente markttoelating van het repliconvaccin Kostaive in Europa (open brief COGEM en ZKBS aan de EC, CGM/250514-01). Deze vaststelling staat haaks op de huidige regelgeving in

Nederland (besluit/regeling GGO, <https://www.ggo-vergunningverlening.nl/algemeen>), waarin replicons worden gezien als viraal systeem (als het ware een uitgekleed virus) en waarvoor een GGO-vergunning nodig is. Deze discrepantie heeft geleid tot een verdere briefwisseling over waarborging van de veiligheid voor mens en milieu bij markttoelating van geneesmiddelen die replicons bevatten (CGM/260122-01).

De uitkomst van deze discussie is onzeker omdat de zienswijzen en wetenschappelijke opinies verdeeld zijn. Maar er zijn wel belangrijke vragen te beantwoorden, zoals: "Is een replicon een organisme of niet? Zo niet, is replicontechnologie daarmee vrijgesteld van GGO-regelgeving en/of een milieuriscobeoordeling bij markttoelating? Is in dat geval de veiligheid voor mens en milieu nog steeds gewaarborgd? Hoe gaat replicontechnologie zich verder ontwikkelen en is de huidige regelgeving nog wel passend?". Hoe deze discussie ook zal verlopen, het feit dat Kostaive zonder milieuriscobeoordeling is toegelaten door het EMA tot de Europese markt, kan een precedent scheppen voor toekomstige replicontoepassingen.

Een laatste ontwikkeling die aandacht verdient is het 'opvoeren' van replicons met immuunonderdrukkende genen, vaak afkomstig van andere virussen [31]. Deze strategie is enerzijds aantrekkelijk omdat het de transgenexpressie in het replicon kan verhogen en/or verlengen, wat uiteindelijk het klinisch effect van een behandeling met replicons kan verbeteren. Anderzijds, een potentieel risico van deze ontwikkeling is dat het ook de deur openzet naar onverstandig gebruik van replicons. Immers, een partij kan het zinvol achten om 'opgevoerde' replicons te gebruiken om virale envelopeiwitten (vaak met fusogene eigenschappen) te produceren, bijvoorbeeld om een effectiever vaccin te ontwikkelen. Afhankelijk van het specifieke transgen kan het replicon zich hiermee (eventueel onbedoeld) gaan verspreiden. Omdat er nu extra immuunonderdrukkende eigenschappen aanwezig zijn in het replicon kan het eindresultaat een zichzelf verspreidende VLV of zelfs een virus zijn met een *gain of function*. De kans dat dit een keer misgaat zal een stuk groter zijn als replicons buiten de GGO-regelgeving komen te vallen en/of als er geen milieuriscobeoordeling meer wordt uitgevoerd bij een aanvraag voor markttoelating.

Dankbetuigingen

Het project RepliSAFE (TTW 15791) werd gefinancierd door het onderzoeksprogramma 'Towards Modernization of Biotechnology and Safety' van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (Domein Toegepaste en Technische Wetenschappen), in opdracht van het Nederlandse Ministerie van Infrastructuur en Waterbeheer (I&W).

Referenties

1. Offord C, Cohen J. Award honors pair for mRNA work key to COVID-19 vaccines. *Science*. 2023;382:22.
2. Rappaport AR, Hong SJ, Scallan CD, et al. Low-dose self-amplifying mRNA COVID-19 vaccine drives strong protective immunity in non-human primates against SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2022;13:3289.
3. Szubert AJ, Pollock KM, Cheeseman HM, et al. COVAC1 phase 2a expanded safety and immunogenicity study of a self-amplifying RNA vaccine against SARS-CoV-2. *EClinicalMedicine*. 2023;56:101823.
4. Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther*. 2021;28:117-29.
5. Schmidt C, Schnierle BS. Self-amplifying RNA vaccine candidates: alternative platforms for mRNA vaccine development. *Pathogens*. 2023;12.
6. Comes JDG, Pijlman GP, Hick TAH. Rise of the RNA machines – self-amplification in mRNA vaccine design. *Trends in Biotechnology*. 2023;41:11. doi:10.1016/j.tibtech.2023.05.007.
7. Bredenbeek PJ, Frolov I, Rice CM, Schlesinger S. Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J Virol*. 1993;67:6439-46.
8. Liljestrom P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* 1991;9:1356-61.
9. Pittman PR, Makuch RS, Mangiafico JA, Cannon TL, Gibbs PH, Peters CJ. Long-term duration of detectable neutralizing antibodies after administration of live-attenuated VEE vaccine and following booster vaccination with inactivated VEE vaccine. *Vaccine*. 1996;14:337-43.
10. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*. 1994;58:491-562.
11. Sawattrakool K, Stott CJ, Bandalaria-Marca RD, Srijangwad A, Palabrica DJ, Nilubol D. Field trials evaluating the efficacy of porcine epidemic diarrhea vaccine, RNA (Harrisvaccine) in the Philippines. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52:2743-7.
12. United States Department of Agriculture. Veterinary biologics. 2021;165A-9PP000.
<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/veterinary-biologics/product-summaries/vet-label-data/98af0915-c6c9-481c-9e03-e11a6d52daff>. Accessed ###.
13. Ho NT, Smolenov I, Thi Le Tran L, et al. Safety profile of self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine ARCT-154 in adults: a pooled phase 1/2/3 randomized clinical study. *Expert Rev Vaccines*. 2025;24:299-312.
14. Smerdou C, Liljestrom P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J Virol*. 1999;73:1092-8.
15. Hick TAH, Geertsema C, Nijland R, Pijlman GP. Packaging of alphavirus-based self-amplifying mRNA yields replication-competent virus through a mechanism of aberrant homologous RNA recombination. *mBio*. 2024;15:e0249424.
16. Condit RC, Williamson AL, Sheets R, et al. Unique safety issues associated with virus-vectored vaccines: Potential for and theoretical consequences of recombination with wild type virus strains. *Vaccine*. 2016;34:6610-6.
17. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses -an overview. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:420-9.
18. Singer ZS, Ambrose PM, Danino T, Rice CM. Quantitative measurements of early alphaviral replication dynamics in single cells reveals the basis for superinfection exclusion. *Cell Syst*. 2021;12:210-9 e3.
19. Boussier J, Levi L, Weger-Lucarelli J, Poirier EZ, Vignuzzi M, Albert ML. Chikungunya virus superinfection exclusion is mediated by a block in viral replication and does not rely on non-structural protein 2. *PLoS One*. 2020;15:e0241592.
20. Hick TAH, Zotter T, Bosveld D, Geertsema C, van Oers MM, Pijlman GP. Venezuelan equine encephalitis virus non-structural protein 3 dictates superinfection exclusion in mammalian cells. *Npj Viruses*. 2024;2:43.
21. Bishop CR, Caten FT, Nakaya HI, Suhrbier A. Chikungunya patient transcriptional signatures faithfully recapitulated in a C57BL/6J mouse model. *Front Immunol*. 2022;13:1092370.
22. Nguyen W, Nakayama E, Yan K, et al. Arthritogenic alphavirus vaccines: Serogrouping versus cross-protection in mouse models. *Vaccines (Basel)*. 2020;8:209.
23. Poo YS, Rudd PA, Gardner J, et al. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3354.
24. Rudd PA, Wilson J, Gardner J, et al. Interferon response factors 3 and 7 protect against Chikungunya virus hemorrhagic fever and shock. *J Virol*. 2012;86:9888-98.
25. Gardner J, Rudd PA, Prow NA, et al. Infectious chikungunya virus in the saliva of mice, monkeys and humans. *PLoS One*. 2015;10:e0139481.
26. Hick TAH, Geertsema C, Nguyen W, et al. Safety concern of recombination between self-amplifying mRNA vaccines and viruses is mitigated in vivo. *Mol Ther*. 2024;32:2519-34.
27. Pijlman GP, Suhrbier A, Khromykh AA. Kunjin virus replicons: an RNA-based, non-cytopathic viral vector system for protein production, vaccine and gene therapy applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6:135-45.
28. Kumar R, Shrivastava T, Samal S, Ahmed S, Parray HA. Antibody-based therapeutic interventions: possible strategy to counter chikungunya viral infection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020. 104:3209-28.
29. Suhrbier A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15:597-611.
30. Rolls MM, Webster P, Balba NH, Rose JK. Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell*. 1994;79:497-506.
31. Lim TKY, Ritoux A, Paine LW, et al. Cap-independent co-expression of dsRNA-sensing and NF-kappaB pathway inhibitors enables controllable self-amplifying RNA expression with reduced immunotoxicity. *Elife*. 2025;14.