

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 23 oktober 2019
KENMERK CGM/191023-02
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden poliovirussen

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een 2.8 verzoek IG 19-256_2.8-000 van Batavia Biosciences B.V. getiteld 'genetically-modified (GM) polioviruses', deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met zes verzwakte genetisch gemodificeerde (gg-) poliovirussen. Het betreft zes gg-poliovirussen die gebaseerd zijn op de verzwakte Sabin vaccinstam van poliovirus type 2. Polio is een ziekte die voornamelijk kinderen treft onder de vijf jaar. Poliovirus-infectie kan in ernstige gevallen leiden tot verlamming en zelfs een dodelijke afloop hebben. Van het poliovirus worden drie typen onderscheiden. Poliovirus type 2 is in 2015 officieel uitgeroeid verklaard; daarom is deze recent omhoog geschaald naar pathogeniteitsklasse 3. Als gevolg hiervan dienen werkzaamheden met gg-poliovirussen afgeleid van type 2 op inperkingsniveau 3 uitgevoerd te worden. Gezien het verzwakte karakter van de gg-poliovirussen verzoekt de vergunningaanvrager om de werkzaamheden op inperkingsniveau 2 uit te mogen voeren.

De gg-poliovirussen bezitten een verminderde capaciteit om te repliceren bij 37°C. Op basis van experimenten in muizen, apen en mensen, acht de COGEM de zes gg-poliovirussen geattenuëerd ten opzichte van de reeds verzwakte vaccinstam. De kans op reversie van de mutaties in de zes gg-poliovirussen waarbij virus gevormd zou worden met een hoger spreidend vermogen, acht de COGEM kleiner dan bij de Sabin vaccinstammen.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van oordeel dat werkzaamheden met de twee gg-poliovirussen en de vier daarvan afgeleide stammen uitgevoerd kunnen worden op ML-II. Op dit inperkingsniveau en met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden 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
Vorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde poliovirussen

COGEM advies CGM/191023-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van werkzaamheden met een zestal genetisch gemodificeerde (gg-) poliovirussen, ingediend door Batavia Biosciences B.V. (IG 19-256). Het betreft twee kandidaat vaccinstammen afgeleid van de Sabin type 2 vaccinstam (S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40), en 4 chimere virussen waarbij de P1 regio van S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 vervangen is door de - al dan niet codon gede-optimaliseerde - P1 regio van Sabin poliovirus type 1 of type 3. De COGEM heeft in 2017 de pathogeniteitsklasse van poliovirus type 2 omhoog geschaald van 2 naar 3.¹ In navolging op dit advies en het WHO global Action Plan (GAP-III)², is de pathogeniteitsklasse van poliovirus type 2 gewijzigd naar klasse 3 en dienen activiteiten met poliovirus type 2 vanaf 1 oktober 2017 plaats te vinden op inperkingsniveau III. Volgens het GAP III is omlaagschaling van werkzaamheden mogelijk, wanneer gebruik gemaakt wordt van verzwakte stammen die veiliger zijn dan het wildtype virus en de huidige vaccinstammen.² De aanvrager is van mening dat de (chimere) gg-poliovirussen in de onderhavige aanvraag geattenuerd zijn ten opzichte van de vaccinstam Sabin type 2, en verzoekt de werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

De WHO Containment Advisory Group (CAG) heeft in december 2018 aangegeven dat, op basis van de aangeleverde data, de productie en kwaliteitscontrole van de kandidaat vaccinstammen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40 plaats kan vinden op een lager inperkingsniveau.³

2. Poliovirus

2.1 Poliomyelitis

Het poliovirus is de veroorzaker van de ziekte poliomyelitis, ook wel polio genoemd, die voornamelijk kinderen onder de vijf jaar treft. Polio is een zeer besmettelijke ziekte die het zenuwstelsel aan kan tasten en waar geen geneesmiddel voor is. De meeste mensen die geïnfecteerd raken (90%) ervaren geen, of slechts milde symptomen. De eerste symptomen die op kunnen treden zijn koorts, vermoeidheid, hoofdpijn, overgeven, stijve nek en pijn aan de ledematen. In één op de 100-200 infecties treedt er verlamming op, waarbij vijf tot tien procent van de patiënten waarbij verlamming optreedt, komt te overlijden door problemen met de ademhaling.⁴

Het poliovirus wordt primair verspreid via de fecale-orale route, bijvoorbeeld door het binnenkrijgen van met feces besmet water of voedsel. In het begin van een infectie is het virus in de bovenste luchtwegen aantoonbaar. Gedurende deze korte periode bestaat de kans dat het virus met druppeltjes wordt uitgehooft en is besmetting via de orale route mogelijk. Het virus infecteert het slijmvlies en is goed bestand tegen het zure milieu in de maag. Het poliovirus replicateert voornamelijk in het darmstelsel en kan de cervicale en mesenterische lymfklieren (i.e., in de hals en buikholte)

binnendringen en op deze manier in de bloedsomloop terechtkomen. In sommige gevallen kan het virus het centrale zenuwstelsel binnendringen en vermenigvuldigen in motorneuronen in het ruggenmerg, de hersenstam of de motor cortex, waardoor het verlamming kan veroorzaken.⁵

2.2 Genoomstructuur en attenuatie

Het poliovirus, waarvan drie verschillende serotypen worden onderscheiden, behoort tot de soort *Enterovirus C*, het genus *Enterovirus* en de familie *Picornaviridae*.⁶ Het virus heeft een enkelstrengs positief RNA genoom van ongeveer 7.500 nucleotiden. Op het RNA ligt één groot ‘open reading frame’ (ORF, geflankeerd door de 5’ en 3’ UTR) dat codeert voor één polyproteïne die wordt gesplitst in meer dan 15 (intermediaire) eiwitten.⁷ Het ORF is opgedeeld in drie secties, P1, P2 en P3. In P1 bevindt zich de sequentie die codeert voor de vier verschillende structurele virale eiwitten, VP1, VP2, VP3 en VP4. Secties P2 en P3 coderen onder andere voor eiwitten die betrokken zijn bij de klieving van het polyproteïne en de replicatie van het virale genoom. Sectie P2 bevat de sequenties voor productie van de eiwitten 2A, 2B en 2C, en sectie P3 codeert voor de eiwitten VPg (‘viral protein genome-linked’), 3A, 3C en 3D (RNA-afhankelijke RNA polymerase).⁸

Het poliovirus heeft een eiwitmantel die bestaat uit 60 kopieën van de vier structurele virale eiwitten. VP1, VP2, en VP3 liggen aan het oppervlak van de virusmantel en bevatten epitopen die verantwoordelijk zijn voor het induceren van antistoffen tegen het virus. VP4 bevindt zich binnenin de eiwitmantel en wekt geen serologische reactie op.

Om een gastheercel binnen te dringen, bindt het poliovirus aan de CD155 receptor (ook wel poliovirusreceptor genoemd), een transmembraan-glycoproteïne dat onderdeel is van de immunoglobuline superfamilie.⁵

De kandidaatvaccinstammen uit onderhavige studie zijn afgeleid van de Sabin poliovirus type 2 vaccinstam. De Sabin vaccinstammen van poliovirus type 1, 2 en 3 worden gebruikt als oraal poliovirus vaccin (OPV). Het geattenueerde fenotype van de Sabin vaccinstammen wordt veroorzaakt door mutaties in het zogenoemde V-domein in de 5’UTR en de P1 regio. De 5’UTR is een sterk gevouwen RNA structuur en vormt meerdere ‘stem loops’. De mutaties hebben tot gevolg dat de neurovirulentie en de thermostabiliteit (verminderde replicatie bij een temperatuur van 37°C) van de virusstammen verminderd zijn.⁹

Het OPV kan een beperkte tijd repliceren in het darmstelsel, waardoor antilichamen geproduceerd kunnen worden. Gedurende deze periode kan het geattenueerde virus uitgescheiden worden en verspreiden in de directe omgeving.¹⁰ In zeldzame gevallen (ongeveer 1 op de 2,7 miljoen eerste doseringen) kan het OPV door enkele puntmutaties reverteren naar een virulente variant van het virus, ook wel ‘circulating vaccine-derived poliovirus’ (cVDPV) genoemd, dat ook verlammingverschijnselen kan veroorzaken.¹¹ Het grootste aandeel van de VDPV gevallen wordt veroorzaakt door poliovirus type 2 (>90%).¹²

3. Eerder COGEM advies

Gebaseerd op de ernst van de ziekte, de relatief lage wereldwijde vaccinatiegraad en de eradicatie van poliovirus type 2, heeft de COGEM in 2017 geadviseerd om de pathogeniteitsklasse van poliovirus

type 2 te herzien en omhoog te schalen naar pathogeniteitsklasse 3.¹ In navolging op dit advies en het WHO global Action Plan (GAP-III), is de pathogeniteitsklasse van poliovirus type 2 gewijzigd naar klasse 3 en dienen activiteiten met poliovirus type 2 vanaf 1 oktober 2017 plaats te vinden op inperkingsniveau III.

In december 2017 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de omlaagschaling van werkzaamheden met chimere gg-poliovirussen afgeleid van een verzwakte poliovirus type 3 vaccinstam waarbij, naast enkele mutaties, de P1 regio van poliovirus type 3 is vervangen door de P1 sequentie van poliovirus type 2 vaccinstammen.¹³ De COGEM achtte de kandidaat vaccinstammen meer geattenuerd dan de Sabin type 3 vaccinstam (OPV3), de kans op het ontstaan van een meer virulent gg-poliovirus tijdens de werkzaamheden verwaarloosbaar klein, en de kans op verspreiding naar het milieu verwaarloosbaar klein. De COGEM kon instemmen met omlaagschaling naar ML-II, onder navolging van de volgende aanvullende werkvoorschriften:

- Gastheermateriaal dient vrij te zijn van poliovirussen, of andere verwante virussen (type C enterovirussen);
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Laboratoriumpersoneel mag geen activiteiten verrichten wanneer zij niet gevaccineerd zijn tegen poliovirus typen 1, 2 en 3;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens productie en infectie werkzaamheden uit te voeren in animale cellen met de kandidaat gg-poliovaccinstammen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40, en vier afgeleide vectoren. Beide virussen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40 zijn afgeleid van het Sabin levend geattenuerd poliovirus type 2 vaccin (OPV2) en bevatten modificaties in de 5'UTR om de genetische stabiliteit te verbeteren. In S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 zijn daarnaast 2 modificaties aangebracht in de RNA polymerase (3D) coderende regio, en is een element dat belangrijk is voor replicatie uit de 2C-coderende regio verplaatst naar de 5'UTR om te voorkomen dat het gestabiliseerde V-domein door recombinatie verloren raakt. In S2/S15domV/CpG40 zijn synonieme (stille) mutaties aangebracht in de sequenties die coderen voor de manteleiwitten (VP1-4) om de fitness van het virus te verminderen en met als doel de stabiliteit van het geattenuerde fenotype te verbeteren en de kans op transmissie te verlagen. De exacte genetische modificaties zijn door de aanvrager als vertrouwelijke informatie bestempeld en worden derhalve niet beschreven in dit advies.

Van S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 zijn vier aanvullende kandidaat vaccinstammen verkregen door vervanging van de P1 sectie door de (al dan niet codon gede-optimaliseerde) P1 sectie van de Sabin type 1 vaccinstam (OPV1), of de Sabin type 3 vaccinstam (OPV3).

5. Overweging en advies

Omdat poliovirus type 2 ingedeeld is in pathogeniteitsklasse 3, dienen de werkzaamheden volgens de Regeling ggo¹⁴ in principe plaats te vinden op inperkingsniveau ML-III. In het GAP-III van de WHO wordt de mogelijkheid gegeven om werkzaamheden op een lager inperkingsniveau uit te voeren, wanneer er gebruik gemaakt wordt van verzwakte stammen die veiliger zijn dan het wildtype virus en

de huidige vaccinstammen. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren, en heeft hiervoor een risicoanalyse aangeleverd.

5.1 Attenuatie

De aanvrager is voornemens om gg-kandidaat poliovaccins te gebruiken die afgeleid zijn van OPV2. De gg-kandidaat poliovaccins bevatten verschillende modificaties in de 5' UTR met als doel om de stabiliteit te verbeteren. Ook is de mogelijkheid tot replicatie bij een temperatuur van 37°C hierdoor belemmerd. De uitvoerder heeft de temperatuurgevoeligheid van de zes kandidaat vaccinstammen vergeleken met die van hun Sabin type 1, 2 of 3 tegenhangers. De testen toonden aan dat de temperatuurgevoeligheid vergelijkbaar of gevoeliger was dan hun OPV1, 2 of 3 tegenhanger.

Uit experimenten naar neurovirulentie met muizen en Java-aperen concludeert de aanvrager dat de zes kandidaat vaccinstammen minstens net zo geattenuëerd zijn als hun Sabin vaccinstam tegenhanger (OPV1, OPV2 of OPV3). De dosering waarbij 50% van de muizen verlamd raakt, was voor alle zes de kandidaat vaccinstammen hoger dan voor hun Sabin vaccinstam tegenhangers. De neurovirulentie test in apen is alleen uitgevoerd met kandidaat vaccinstammen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40, en hierbij is geen verlamming waargenomen in 24 dieren geïnoculeerd met één van beide kandidaat vaccinstammen.

Ook is na herhaalde (10x) passage in Vero cellen de neurovirulentie van de zes kandidaat vaccinstammen bepaald in muizen en geeft de aanvrager aan dat de zes stammen meer geattenuëerd zijn dan hun OPV1, 2 of 3 tegenhanger en geen reversie naar neurovirulentie heeft plaatsgevonden.

De twee kandidaat vaccinstammen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40 zijn daarnaast ook getest op veiligheid en immunogeniciteit in een fase 1 klinische studie, waarbij 30 vrijwilligers gevaccineerd zijn met één van beide kandidaat vaccinstammen (15 personen per kandidaat vaccin).¹⁵ Beide vaccins waren immunogeen en werden over het algemeen goed getolereerd. Op verschillende momenten zijn monsters afgenomen (feces, bloed en nasofaryngeaal). Bij 6 vrijwilligers die S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 toegediend kregen en bij negen vrijwilligers die S2/S15domV/CpG40 hebben ontvangen, werd een verhoogd bloed creatine-fosfokinase gedetecteerd, zonder dat er klinische symptomen zichtbaar waren. Vaccinivirus werd door vrijwel alle vrijwilligers uitgescheiden in feces. Zogenaamde 'exploratory endpoint samples' (EES) geïsoleerd uit de feces van de alle (S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3) of een deel (S2/S15domV/CpG40) van de gevaccineerde vrijwilligers zijn gebruikt in een neurovirulentietest bij muizen. Voor S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 bleek 2% van de muizen verlamd te raken na toediening van uitgescheiden kandidaat vaccinivirus, en voor S2/S15domV/CpG40 was dit 6.9%. De aanvrager stelt dat in vergelijking met de Sabin type 2 vaccinstam, waarbij in een eerdere klinische studie 70-90% van de muizen verlamd raakten na inoculatie van uitgescheiden OPV2, de mate van reversie naar neurovirulentie in beide kandidaat vaccinstammen laag is.

Gebaseerd op deze gegevens, is de COGEM van oordeel dat de kandidaat gg-poliovirusvaccins S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3, de vier daarvan afgeleide chimere kandidaatvaccins, en

S2/S15domV/CpG40, geattenuerd zijn ten opzichte van de OPV1, 2 of 3 vaccinstammen, die geattenuerd zijn ten opzichte van wildtype poliovirus type 1, 2 en 3.

5.2 Genetische stabiliteit

Het is bekend dat de Sabin poliovirus vaccins kunnen reverteren naar een fenotype met een hogere fitness (spreidend vermogen). In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van kandidaat vaccinstammen waarin verschillende mutaties zijn aangebracht met als doel de stabiliteit te waarborgen en daarmee de kans op reversie naar een virus met een hogere fitness te verminderen. De aanvrager heeft de zes kandidaat vaccinstammen 10 keer gepasseerd in Vero cellen bij 37°C en door middel van ‘deep sequencing’ de genetische stabiliteit van het eindproduct bepaald. In tegenstelling tot de Sabin vaccinstammen is er geen reversie van de gemodificeerde regio’s waargenomen (geen veranderingen in het V-domein) van de zes vaccinstammen. Wel is er enige variatie in de sequentie gedetecteerd in het protease 2A gen, dat volgens de aanvrager een bekend fenomeen is bij gebruik van Vero cellen, en geen invloed heeft op de attenuatie.¹⁶ In één van de passage series is bij S2/S15domV/CpG40 ook variatie ontdekt in het 3C gen, dat volgens de aanvrager een vergelijkbaar fenomeen is.

Ook is de sequentie van uitgescheiden virus (kandidaat stammen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40) afkomstig van deelnemers aan de klinische studie geanalyseerd door de aanvrager. De aanvrager stelt dat er in beide kandidaat vaccinstammen na uitscheiding geen verlies van attenuerende mutaties in het V-domein van de 5’ UTR is waargenomen.

De COGEM is van oordeel dat de resultaten van de *in vitro* en *in vivo* testen afdoende aantonen dat er geen reversie heeft plaatsgevonden naar een virus met een hogere fitness, en dat de aangebrachte mutaties bij de zes kandidaat vaccinstammen de genetische stabiliteit verbeteren ten opzichte van de Sabin vaccinstammen (OPV1, 2, en 3).

5.3 Blootstelling aan het milieu

Poliovirus wordt primair verspreid via de fecale-orale route, maar kan aan het begin van een infectie via druppeltjes worden uitgehoest. Het OPV is een levend geattenuerd vaccin en kan een beperkte tijd repliceren in het darmstelsel. Kandidaat vaccinstammen S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 en S2/S15domV/CpG40 werden in een klinische studie uitgescheiden in feces, waarbij uitscheiding van S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3 langer duurde (mediaan 23 dagen, interkwartielafstand (IQR) 15-36 dagen) dan van S2/S15domV/CpG40 (mediaan 12 dagen, IQR 1-23 dagen).

Bij laboratoriumwerkzaamheden bestaat de mogelijkheid dat een medewerker geïnfecteerd raakt met de kandidaat vaccinstammen. Om infectie van medewerkers te voorkomen, is de aanvrager voornemens om aanvullende werkvoorschriften te hanteren: dragen van handschoenen, open handelingen uitvoeren in een VK-II kabinet, en het laboratoriumpersoneel vaccineren tegen poliovirus typen 1, 2 en 3.

Een punt van aandacht is dat er gedurende de productie en infectie werkzaamheden met animale cellen recombinatie of complementatie met andere poliovirussen of type C enterovirussen kan optreden,

waardoor een virulent gg-poliovirus zou kunnen ontstaan.¹⁷ Om dit te voorkomen, adviseert de COGEM dat het gastheermateriaal vrij dient te zijn van poliovirussen, of andere verwante virussen (type C enterovirussen).

De COGEM is van oordeel dat de zes vaccinstammen geattenuëerd zijn ten opzichte van de Sabin vaccinstammen, en acht de kans op reversie van de geïnduceerde mutaties (met als gevolg een verhoogde fitness) kleiner dan bij gebruik van de Sabin vaccinstammen. De COGEM onderschrijft de onderbouwing van de aanvrager dat werkzaamheden met deze kandidaat gg-poliovaccins in aanmerking komen voor omlaagschaling.

6. Conclusie

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de werkzaamheden met de zes kandidaat gg-poliovirusvaccins (S2/cre5/S15domV/rec1/hifi3, de vier daarvan afgeleide kandidaat vaccins, en S2/S15domV/CpG40) plaats kunnen vinden op ML-II inperkingsniveau, waarbij de COGEM instemt met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende werkvoorschriften:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Laboratoriumpersoneel mag geen activiteiten verrichten wanneer zij niet gevaccineerd zijn tegen poliovirus typen 1, 2 en 3;
- Open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet.

Daarnaast adviseert de COGEM bij de werkzaamheden het volgende aanvullende werkvoorschrift in acht te nemen:

- Gastheermateriaal dient vrij te zijn van poliovirussen, of andere verwante virussen (type C enterovirussen).

Op dit inperkingsniveau en met inachtneming van de aanvullende werkvoorschriften is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. COGEM (2017). Herziening pathogeniteitsclassificatie poliovirus. COGEM advies CGM/170511-01
2. World Health Organization (2015). WHO Global Action Plan to minimize poliovirus facility-associated risk after type-specific eradication of wild polioviruses and sequential cessation of oral polio vaccine use (GAP III). WHO/POLIO/15.05
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208872/WHO_POLIO_15.05_eng.pdf;jsessionid=448D8C598C274DF74AF50909E9006FEA?sequence=1 (bezoekt: 14 oktober 2019)
3. Addendum to the Report of the Teleconference of the Containment Advisory Group (CAG TC3) on nOPV2 candidate vaccines and S19 – poliovirus type 2 strains (2018). <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/08/Addendum-CAG-TC3-Dec-2018-EN-1.pdf> (bezoekt: 14 oktober 2019)
4. World Health Organisation (WHO) (2017). Poliomyelitis fact sheet. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis> (bezoekt: 14 oktober 2019)

5. Racaniello VR (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 344: 9-16
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2018b). *Virus Taxonomy: 2018b Release*
7. L  v  que N & Semler BL (2015). A 21st century perspective of poliovirus replication. *PLoS Pathog* 11: e1004825
8. Agol VI (2006). Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. In: Domingo E. (eds) *Quasispecies: Concept and implications for virology. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 299. Springer, Berlin, Heidelberg
9. Minor PD (2012). The polio-eradication programme and issues of the end game. *J. Gen. Virol.* 93: 457-474
10. Bandyopadhyay AS *et al.* (2015). Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol.* 10:791-808
11. Global Polio Eradication Initiative (GPEI) (2017). <http://polioeradication.org/> (bezocht: 15 oktober 2019)
12. World Health Organisation (WHO) (2017). What is vaccine-derived polio? <http://www.who.int/features/qa/64/en/> (bezocht: 15 oktober 2019)
13. COGEM (2017). Activities with chimeric genetically-modified polioviruses. COGEM advice CGM/171220-01
14. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gomodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-07-01> (bezocht: 17 oktober 2019)
15. Van Damme P *et al.* (2019). Humoral and intestinal immunity induced by new schedules of bivalent oral poliovirus vaccine and one or two doses of inactivated poliovirus vaccine in Latin American infants: an open-label randomised controlled trial. *Lancet* 394: 148–58
16. Rowe A *et al.* (2000). Coding changes in the poliovirus protease 2A compensate for 5' NCR domain V disruptions in a cell-specific manner. *Virology* 269: 284–293
17. Stern A *et al.* (2017). The evolutionary pathway to virulence of an RNA virus. *Cell* 169: 35-46