

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

DATUM 3 februari 2020

KENMERK CGM/200203-01

ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met combinatievaccins gebaseerd op *Yellow fever virus* vaccinstam 17D

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Evaluatie van DNA-YFVax in nonhumane primaten' (IG 15-307_IIV-006), ingediend door het Biomedical Primate Research Centre in Rijswijk, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg)- combinatievaccins die gebaseerd zijn op de *Yellow fever virus* (YFV) vaccinstam YF-17D. In het genoom van de gg-virussen is de sequentie coderend voor het oppervlakte-eiwit van het *Rabies lyssa virus* (RABV) ingebracht, resulterend in het gg-virus YF-17D-RABV. Daarnaast zijn in twee vaccinstammen de genen coderend voor de oppervlakte-eiwitten van YF-17D uitgewisseld met die van het *Japanese encephalitis virus* (JEV) en *Zika virus* (ZIKV), resulterend in de gg-virussen YF-17D-JEV-RABV en YF-17D-ZIKV-RABV.

YFV, RABV, JEV en ZIKV kunnen bij zoogdieren ernstige ziektes veroorzaken en zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Vaccinstam YF-17D wordt al langere tijd toegepast voor vaccinatiedoelinden en is veilig en effectief gebleken bij mens en dier. Deze vaccinstam is eerder door de COGEM in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld.

Op basis van de door de aanvrager aangeleverde gegevens, en middels aanvullend literatuuronderzoek, is de COGEM van oordeel dat YF-17D-RABV, YF-17D-JEV-RABV en YF-17D-ZIKV-RABV tenminste zo verzwakt zijn als vaccinstam YF-17D. Zij adviseert daarom de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-II. Indien de werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, 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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Inschaling werkzaamheden met combinatievaccins gebaseerd op *Yellow fever virus* stam 17D

COGEM advies CGM/200203-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met recombinante virusvaccins die gebaseerd zijn op de *Yellow fever virus* vaccinstam YF-17D (IG 15-307). De aanvrager, het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) in Rijswijk, wil werkzaamheden met DNA-combinatievaccins gericht tegen het Rabies virus (RABV) en verschillende flavivirussen (*Yellow fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV) en *Zika virus* (ZIKV)) gaan uitvoeren. De vaccins zullen aan apen worden toegediend, maar alleen *in vitro* werkzaamheden, waarbij 'rescue' van genetisch gemodificeerde (gg-) virussen plaats zal vinden, liggen ter advisering aan de COGEM voor. De benodigde DNA-vaccinconstructen worden door een derde (Katholieke Universiteit van Leuven, België) aangeleverd.

2. Flavivirussen

Flavivirussen behoren tot de familie van de *Flaviviridae*.¹ Het zijn positief enkelstrengs RNA-virussen die omhuld worden door een membraan.² Het genomisch RNA codeert voor één enkel polyproteïne en wordt aan weerszijden geflankeerd door een 'non-coding region' ofwel 'non-translated region' (NTR). Door splitsing van het polyproteïne worden drie structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.² De structurele eiwitten (pr)M en E zijn oppervlakte-eiwitten, die betrokken zijn bij de binding van het virus aan een cel, de fusie van het virale membraan (de 'envelop') met het membraan van de gastheercel, en de immuniteit tegen het virus.³ De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij budding via het ER-membraan optreedt.⁴

Binnen het geslacht *Flavivirus* zijn 53 virussen ondergebracht, waaronder het JEV, YFV, ZKV en *West Nile virus* (WNV).¹ Deze vier virussen kunnen bij de mens ernstige ziektes veroorzaken.⁵

2.1 *Yellow fever virus* (YFV) en vaccinstam YF-17D

YFV veroorzaakt gele koorts, een tropische infectieziekte die voorkomt onder apen in Afrika en Zuid-Amerika. Het virus wordt via muggen overgebracht op de mens (arbovirus). Virusstam YF-17D is meer dan 80 jaar geleden als vaccin tegen gele koorts ontwikkeld.⁶ Het levend verzwakte virus is afgeleid van de hoog virulente wildtype YFV-Asibi stam, en verkregen door deze stam meer dan 175 keer te passeren op verschillende soorten cellen.⁷ Inmiddels zijn miljoenen mensen met YF-17D gevaccineerd.³

De attenuering van YF-17D wordt veroorzaakt door verschillende mutaties in de structurele en niet-structurele genen, waaronder de prM, E en RNA-polymerase coderende genen.^{7,8,9,10,11,12,13,14,15} Het virus is genetisch stabiel.^{7,8,9} De vaccinstam wordt al langere tijd als virale vector gebruikt om combinatievaccins tegen meerdere flavivirussen te ontwikkelen, onder meer door de prM en E coderende genen uit te wisselen met die van andere flavivirussen.^{16,17}

3. Rabies virus

Het *Rabies lyssavirus* (RABV, voorheen Rabies virus) behoort tot de familie *Rhabdoviridae*.¹ Het virus heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom dat codeert voor vijf eiwitten: het ‘nucleoprotein’ (N-eiwit), het ‘phosphoprotein’ (P-eiwit), het ‘matrixprotein’ (M-eiwit), het ‘glycoprotein’ (G-eiwit) en het RNA polymerase (L-eiwit).^{18,19}

Het G-eiwit is een oppervlakte eiwit en speelt een belangrijke rol in de pathogeniteit van het virus. Het eiwit is betrokken bij de binding van het virusdeeltje aan de cel, de fusie van het virale membraan met de membraan van de gastheercel, en de immuniteit tegen het virus.¹⁸ De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het cytoplasma, waarna het virus via budding aan het plasmamembraan uitgescheiden wordt. Hierbij worden de oppervlakte-eiwitten van het virus aan de buitenzijde van de gastheercel gepresenteerd.¹⁸

RABV is neurotroop en leidt in mensen en andere zoogdieren tot rabiës (hondsdolheid). Besmetting treedt meestal op in niet-neuronaal weefsel, waar het virus zich kan vermenigvuldigen. Na deze eerste ronde van replicatie verspreidt het zich naar de neuronen en naar de hersenen, wat tot hersenontsteking leidt. In het finale stadium treedt coma op, leidend tot de dood.¹⁸

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil een DNA-combinatievaccin tegen gele koorts en rabiës gaan ontwikkelen. Als basis voor het benodigde shuttle-plasmide, wil hij een bestaand cDNA-construct van vaccinstam YF-17D gaan gebruiken. In het genoom van YF-17D zullen de volgende mutaties worden aangebracht:

- Na de sequentie coderend voor de eerste 9 aminozuren van het NS1 eiwit van 17D (de signaalpeptidase-sequentie), wordt in het NS1-gen de coderende sequentie voor het RABV G-proteïne (RABV-G) geïnsereerd. Het aan de N-terminaal gelegen signaalpeptide is uit deze RABV-G sequentie verwijderd. De aanvrager geeft aan dat de signaalpeptidase-sequentie van NS1 intact is gelaten om ervoor te zorgen dat de YFV-E en -NS1 sequenties op de juiste wijze in de cel worden verwerkt. In het endoplasmatisch reticulum (ER) wordt het rabiës G-eiwit uit het resulterende polyproteïne geknipt, maar blijft het wel geassocieerd met het ER-membraan;
- aan de C-terminus van het G-eiwit is het tweede transmembraandomein van het WNV gefuseerd. De coderende sequentie van dit membraandomein is aangepast. De aanvrager geeft aan dat deze aangepaste sequentie nauw verwant is aan die van de verzwakte WNV-stam B956, en dat deze is ingebracht om homologe recombinatie tijdens virale replicatie te voorkomen en daarmee de stabiliteit van het insert te verbeteren.

Met het resulterende DNA-construct, genaamd YF-17D-RABV, wil de aanvrager primaire apencellen infecteren en apen (resusaap en gewoon penseelaapje) vaccineren. Na vaccinatie zullen cellen en weefsels van de apen onderzocht worden. De aangevraagde vergunning betreft alleen *in vitro* analyses van cellen en weefsels. De werkzaamheden met de apen (vaccinatie, de isolatie van cellen en weefsels) vallen niet onder de voorliggende vergunningaanvraag.

De aanvrager wil ook twee andere DNA-combinatievaccins genereren. Voor deze gg-virussen zal als basis het hierboven beschreven YF-17D-RABV construct gebruikt worden. In dit construct zullen de

prM en E-coderende genen van YF-17D worden uitgewisseld met die van JEV of ZIKV, resulterend in respectievelijk YF-17D-JEV-RABV en YF-17D-ZIKV-RABV.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft de virussen JEV, WNV, ZIKV en RABV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3, en de geattenueerde vaccinstam YF-17D ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁰ Daarnaast heeft de COGEM verschillende malen geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met gg-YF-17D. In de gg-virussen waren de prM en E-coderende genen uitgewisseld met die van andere flavivirussen. In 2007 heeft de COGEM geadviseerd over een gg-YF-17D virus waarin de prM en E-coderende genen waren uitgewisseld met die van WNV.²¹ Op basis van de aangeleverde informatie was de COGEM van oordeel dat het gg-YF-17D-WNV slecht replicateert in zoogdieren, vogels en bepaalde muggen die als vector zouden kunnen optreden, en dat het gg-vaccin niet via aerosolen overgedragen kan worden. Zij achtte YF-17D-WNV net zo geattenuerd als YF-17D, en adviseerde de voorgenomen werkzaamheden met het gg-virus uit te voeren op ML-II niveau, onder in achtneming van een aantal aanvullende voorschriften.

In 2009 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met YF-17D waarin de prM en E-coderende genen waren uitgewisseld met die van de zogenaamde 'no-known vector flavivirussen' Cell fusing agent virus (CFAV) en *Yokose virus* (YokV).²² Deze virussen waren op dat moment ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Gezien de geringe hoeveelheid literatuur over de herkomst, overdracht en verspreiding van deze no-known vector flavivirussen, en de verwantschap van deze virussen met enkele ernstige humane en dierlijke pathogenen in het genus *Flavivirus*, adviseerde de COGEM de voorgestelde werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-III.

In 2017 heeft de COGEM de classificatie van het CFAV heroverwogen en het virus als insect-specifiek flavivirus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²³ De COGEM is na 2009 niet opnieuw gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met gg-CFAV en gg-YokV.

6. Overwegingen

6.1 Virulentie van YF-17D-RABV

De aanvrager stelt dat YF-17D-RABV verzwakt is ten opzichte van YF-17D en onderbouwt dit met gegevens uit drie verschillende experimenten. Het eerste experiment betreft een 'plaque assay' die laat zien dat YF-17D-RABV kleinere plaques vormt dan YF-17D. In het tweede experiment zijn 'baby hamster kidney' (BHK-21) cellen geïnfecteerd met YF-17D-RABV en YF-17D. Na één dag is er een factor 100 minder YF-17D-RABV virusdeeltjes aanwezig ten opzichte van het aantal YF-17D deeltjes. Bovendien is de virustiter van YF-17D-RABV bij het bereiken van de plateauwaarde op dag 6, een factor 10 lager.

Als derde experiment heeft de aanvrager de virulentie van YF-17D-RABV en YF-17D in BALB/c babymuizen gemeten. Hiertoe zijn muizen gevaccineerd met gelijke hoeveelheden van het YF-17D-RABV- of het YF-17D DNA-construct. Daarnaast zijn aan muizen rechtstreeks YF-17D-RABV of YF-17D virus toegediend. Daarbij was de toegediende hoeveelheid YF-17D-RABV ten opzichte van YF-

17D een factor 100 hoger. In de loop van de tijd werden bij de muizen verandering in het lichaamsgewicht, en het optreden van ziekteverschijnselen en mortaliteit gemeten.

In de experimenten waarbij virusdeeltjes werden geïnjecteerd, bleek dat bij de 100x hogere hoeveelheid van YF-17D-RABV de muizen een gewichtstoename vertoonden ten opzichte van de muizen geïnjecteerd met YF-17D. Bovendien traden ziekteverschijnselen en sterfte drie dagen later op dan bij YF-17D. Bij de dieren die met de DNA-constructen waren gevaccineerd, leidde dit in beide gevallen niet tot gewichtsafname, ziekteverschijnselen of mortaliteit.

De COGEM is van oordeel dat de getoonde experimenten laten zien dat YF-17D-RABV geattenuëerd is ten opzichte van YFV-17D omdat het gg-virus zich *in vitro* minder goed verspreidt (plaque assay) en minder goed replicateert (infectie BHK-21 cellen), en *in vivo* minder virulent is (muizenexperimenten). Zij merkt echter op dat de aanvrager geen informatie geeft over hoe vaak de plaque assay of replicatie-assay is uitgevoerd, of hoeveel muizen er in de virulentie-assay zijn getest. Bij de virulentie-assay worden bovendien niet alle afkortingen toegelicht, waardoor in eerste instantie niet duidelijk is welke lijnen in de figuur corresponderen met de DNA-constructen. Ook wordt bij de virulentie-assay niet toegelicht wat de aard van de ziekteverschijnselen is waaruit de verminderde pathogeniteit is afgeleid.

Samengevat concludeert de COGEM dat de door de aanvrager aangeleverde gegevens er op wijzen dat YF-17D-RABV minder pathogeen is en geattenuëerd is ten opzichte van YF-17D. Zij is echter van oordeel dat de informatie over de opzet en uitvoering van de experimenten summier is.

6.2 Pseudotypering YF-17D-RABV

Eventuele 'pseudotypering'* van de YF-17D-RABV-deeltjes met het G-eiwit van RABV, zou er toe kunnen leiden dat het celtropisme van de gg-virusdeeltjes uitgebreid is ten opzichte van vaccinstam YFV-17D doordat deze deeltjes ook aan Rabies virus celreceptoren kunnen binden. Hierdoor zouden er meer celtypes geïnfecteerd kunnen worden.

De aanvrager geeft aan dat pseudotypering met oppervlakte-eiwitten van virussen die behoren tot de familie van de *Flaviviridae*, maar niet tot het genus *Flavivirus*, niet mogelijk is en ook nooit gemeld is. Hij verwijst hiervoor naar verschillende publicaties in de wetenschappelijke literatuur.^{24,25} Pseudotypering met E-eiwitten van het *Hepacivirus C* (familie *Flaviviridae*, genus *Hepacivirus*) blijkt bijvoorbeeld niet mogelijk te zijn.²⁶ Ook geeft de aanvrager aan dat door het ontwerp van het YF-17D-RABV construct, het G-eiwit uit het flavivirus polyproteïne geknipt zal worden.

Om aan te tonen dat YF-17D-RABV daadwerkelijk niet met het RABV-G eiwit gespseudotyperd wordt, heeft de aanvrager plaque-reductie-neutralisatietesten (PRNT's) laten uitvoeren. Hiervoor werden konijnen, muizen of mensen gevaccineerd met een commercieel verkrijgbaar rabiësvaccin. Ook werden hamsters en non-humane primaten gevaccineerd met een commercieel verkrijgbaar YF-17D

* In dit geval wordt met pseudotypering bedoeld dat het gen, coderend voor een niet-eigen virus envelopeiwit, in het genoom is ingebracht. Normaliter wordt de term pseudotypering gebruikt voor de situatie waarbij het eiwit aangeboden wordt aan het virusdeeltje, zonder dat het coderende gen in het genoom is geïnsereerd.

vaccin. Van deze dieren werd eveneens serum afgenomen. In beide gevallen werd gecontroleerd of er neutraliserende antilichamen in het serum aanwezig waren, en zijn de sera vervolgens gebruikt in de PRNT's. De aanvrager geeft aan dat de PRNT's laten zien dat YF-17D en YF-17D-RABV virusdeeltjes niet geneutraliseerd werden door de antisera van de rabiësvaccin geïmuneerde mensen en dieren, maar wel werden geneutraliseerd door de antisera van de YF-17D geïmuneerde dieren. Volgens de aanvrager bevestigt dit de aanname dat YF-17D-RABV virusdeeltjes niet met het RABV G-eiwit zijn gepseudotyperd.

De COGEM merkt op dat de gegevens waarop de conclusie van de aanvrager over de uitkomsten van de PRNT's berust, niet zijn aangeleverd. Zij kan daarom de conclusie dat er geen pseudotypering met het RABV G-eiwit optreedt, niet verifiëren. De COGEM is van oordeel dat de vergunningaanvraag op dit punt tekort schiet.

De COGEM merkt op dat de aanvrager aan de hand van figuren de opbouw van de constructen inzichtelijk heeft gemaakt. In de recente literatuur is beschreven dat, binnen het genus *Flavivirus*, pseudotypering niet voor elk virus mogelijk is.²⁷ Daarnaast zijn er bij de COGEM geen publicaties bekend waarin beschreven wordt dat pseudotypering van flavivirussen, met oppervlakte-eiwitten van virussen buiten het genus *Flavivirus*, mogelijk is. Op basis van de gegevens uit de literatuur, en de door de aanvrager aangeleverde figuur en PRNT-resultaten, acht de COGEM pseudotypering van YFV-17D met RABV-G niet aannemelijk. Zij is daarom van oordeel dat de kans dat het celtropisme van YF-17D-RABV niet verbreed is ten opzichte van YF-17D, verwaarloosbaar klein is.

6.3 Virulentie en pseudotypering van YF-17D-JEV-RABV en YF-17D-ZIKV-RABV

De aanvrager wil ook werkzaamheden gaan uitvoeren met gg-virussen die gebaseerd zijn op het hierboven beschreven YFV-17D-RABV virus, en daarnaast 'gepseudotyperd' met de prM en E-eiwitten van JEV of ZIKV. Hij stelt dat het in de lijn der verwachting ligt dat de chimere gepseudotyperde virussen ten minste zo geattenuerd zullen zijn als YFV-17D-RABV, omdat zowel YFV-17D-RABV, als de chimere virussen YF-17D-JEV en YF-17D-ZIKV ten opzichte van YF-17D geattenuerd zijn. De aanvrager geeft aan dat werkzaamheden met YF-17D-JEV en YF-17D-ZIKV al vergund zijn op inperkingsniveau II.

De COGEM merkt op dat er tegenwoordig YF-17D vaccinconstructen commercieel verkrijgbaar zijn die gepseudotyperd zijn met de prM en E-eiwitten van onder meer JEV of ZIKV. Deze vaccins zijn gebaseerd op een platform dat vergelijkbaar is met de constructen van de voorliggende vergunningaanvraag.^{28,29} De voor dit platform gebruikte technologie bestaat al langere tijd, en is onder meer bekend onder de naam ChimeriVax.¹⁷ De COGEM wijst erop dat deze vaccins in het kader van hun markttoelating als veilig voor mens en milieu beoordeeld zijn.

De COGEM merkt op dat de attenuatie van Chimerivax constructen mede bepaald wordt door mutaties in de genen die coderen voor de niet-structurele eiwitten, waaronder het RNA-polymerase. Vanwege de aanwezigheid van een 'high-fidelity replication complex', zijn deze Chimerivax constructen genetisch stabiel.⁷

De COGEM wijst erop dat chimere flavivirussen gebaseerd op YF-17D, die gepseudotypeerd zijn met prM en E eiwitten van andere virussen binnen het genus *Flavivirus*, geattenuerd zijn ten opzichte van YF-17D en genetisch stabiel zijn, zoals onder meer is aangetoond voor YF-17D-ZIKV.^{7,8,9,30} De COGEM is mede daarom van oordeel dat combinatievaccins YF-17D-JEV-RABV en YF-17D-ZIKV-RABV tenminste zo geattenuerd zullen zijn als YF-17D, YF-17D-JEV, YF-17D-ZIKV en YF-17D-RABV, en, gezien de gegevens uit de experimenten met YF-17D-RABV (zie 6.1), hoogst waarschijnlijk nog meer geattenuerd.

7. Conclusie en advies

YF-17D is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Alle bovenstaande overwegingen in ogenschouw nemende, is de COGEM van oordeel dat combinatievaccins YF17D-RABV, YF-17D-JEV-RABV en YF-17D-ZIKV-RABV tenminste zo geattenuerd zijn als YF-17D. Zij adviseert daarom de voorgenoemde werkzaamheden met de combinatievaccins uit te voeren op ML-II niveau. Indien de werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau worden uitgevoerd, acht zij de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

8. Additionele opmerking

De COGEM merkt op dat de aangeleverde informatie in het te beoordelen dossier op verschillende punten zeer summier is en daardoor de vergunningaanvraag op deze punten te kort schiet. Zo is de beschrijving van de voorgenoemde experimenten summier, en is het niet duidelijk hoe vaak de experimenten, die de argumentatie van de aanvrager betreffende de milieurisicobeoordeling onderbouwen, uitgevoerd zijn. Ook doet de aanvrager verschillende beweringen zonder de ondersteunende gegevens inzichtelijk te maken. Ondanks het onvolledige dossier heeft de COGEM middels uitgebreid aanvullend literatuuronderzoek en eigen expertise de mogelijke risico's voor mens en milieu van de voorgenoemde werkzaamheden kunnen beoordelen.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 28 januari 2020)
2. Simmonds P *et al.* (2017). ICTV Virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. J. Gen. Virol. 98: 2-3
3. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: Fields Virology. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. Flaviviridae. In: Fields Virology. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
5. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae
6. Monath TP & Barrett AD (2003). Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. Adv. Virus. Res. 60: 343-395
7. Davis EH *et al.* (2019). Attenuation of live-attenuated yellow fever 17D vaccine virus is localized to a high-fidelity replication complex. mBio 10: e02294-19
8. Tangy F & Despres P (2014). Yellow fever vaccine attenuation revealed: loss of diversity. J. Infect. Dis. 209: 318-320

9. Collins ND *et al.* (2018). Structural and nonstructural genes contribute to the genetic diversity of RNA viruses. *mBio* 9: e01871-18
10. Arya SC (2002). Yellow fever vaccine safety: a reality or a myth? *Vaccine* 20: 3627-3628
11. Monath T.P. (2001). Yellow fever: an update. *Lancet Inf. Dis.* 1: 11-20
12. dos Santos CN *et al.* (1995). Complete nucleotide sequence of *Yellow fever virus* vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res.* 35: 35-41
13. Lee E & Lobigs M (2008). E protein domain III determinants of *Yellow Fever virus* 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J. Virol.* 82: 6024–6033
14. Charlier N *et al.* (2004). Exchanging the *Yellow fever virus* envelope proteins with *Modoc virus* prM and E proteins results in a chimeric virus that is neuroinvasive in SCID mice. *J. Vir.* 78: 7418-7426
15. McElroy KL *et al.* (2008). Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct *Yellow fever virus* variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8: 675-687
16. Guy B *et al.* (2010). Preclinical and clinical development of YFV-17D-based chimeric vaccines against Dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28: 632-649
17. Bonaldo MC *et al.* (2014). The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10: 1256-1265
18. Lyles DS *et al.* (2013). Ch. 31. *Rhabdoviridae*. In: *Fields Virology*. Eds Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
19. Wickersham IR *et al.* (2010). Production of glycoprotein-deleted rabies viruses for monosynaptic tracing and high-level gene expression in neurons. *Nat. Protoc.* 5: 595-605
20. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
21. COGEM (2007). Evaluatie van een recombinant *Yellow Fever virus* vaccin. COGEM advies CGM/070724-01
22. COGEM (2009). Inschaling werkzaamheden met flavivirussen CFA en YokV. COGEM advies CGM/090119-04
23. COGEM (2017). Advies herziening classificatie Cell fusing agent virus. COGEM advies CGM/170510-01
24. Zavada J (1982). The pseudotypic paradox. *J. Gen. Virol.* 63: 15-24
25. King B *et al.* (2016). Technical considerations for the generation of novel pseudotyped viruses. *Future Virol.* 11: 47-59
26. Molenkamp R *et al.* (2003). Yellow fever virus replicons as an expression system for Hepatitis C virus structural proteins. *J. Virol.* 77: 1644-1648
27. Hobson Peters J *et al.* (2019). A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. *Sc. Translat. Med.* 11: doi:10.1126/scitranslmed.aax7888
<https://stm.sciencemag.org/content/11/522/eaax7888>
28. Hallstead SB & Thomas SJ (2010). New vaccines for Japanese encephalitis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12: 174-180

29. Chokephaibulkit K *et al.* (2016). Safety and immunogenicity of a live attenuated Japanese encephalitis chimeric virus vaccine (IMOJEV®) in children. *Exp. Rev. Vaccines* 15: 153-166
30. Kum DB *et al.* (2018). A yellow fever–Zika chimeric virus vaccine candidate protects against Zika infection and congenital malformations in mice. *Npj Vaccines* 56. [Doi.org/10.1038/s41541-018-0092-2](https://doi.org/10.1038/s41541-018-0092-2)