

**Utvikling av en  
yttermembranvesikkelvaksine mot  
serogruppe A og W135  
meningokokksykdom i Afrika**

*Immunogenisitsstudier i mus*

**Marianne Arnemo**



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

# **Utvikling av en yttermembranvesikkelvaksine mot serogruppe A og W135 meningokokksykdom i Afrika**

*Immunogenisitetsstudier i mus*

**Marianne Arnemo**

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Utført ved:

**Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi**

**Folkehelseinstituttet**

Hovedveiledere ved Folkehelseinstituttet:

**Seniorforsker Einar Rosenqvist**

**Postdoc. Gro Tunheim**

Internveilder ved Farmasøytisk institutt:

**Professor Anne-Brit Kolstø**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

# Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi ved Folkehelseinstituttet.

Tusen takk til alle som har hjulpet meg med prosjektet mitt.

En spesiell takk rettes til hovedveileder Einar Rosenqvist for engasjert og god veiledning fra start til slutt og for å ha gitt meg muligheten til å ta del i prosjektet. En spesiell takk rettes også til veileder Gro Tunheim for verdifull opplæring i metoder og korrekturlesing underveis i skriveprosessen. Takk til Gunnstein Norheim og Lisbeth Meyer Næss for veiledning og svar på mine små og store spørsmål.

Takk til Lisa Nome og Audun Aase for hjelp med testing av musesera i henholdsvis serumbaktericid analyse og opsonofagocytose. Takk til Sverre-Henning Brorson for elektronmikroskopering av yttermembranvesikler. Takk til Vegard Bråthen for LPS-kvantitering av yttermembravesikkelløsninger.

Takk til alle i ”palmelaben” for alltid å ta dere tid til å svare på spørsmål. Gjennom latter og hygge har dere bidratt til et godt arbeidsmiljø.

Takk til mamma og pappa for korrekturlesing og oppmuntring underveis i skriveprosessen.

En stor takk går til min kjære Ole som har holdt ut med meg de siste månedene. Takk for all støtte, oppmuntring og kjærighet du har gitt meg.

Oslo, mai 2010

Marianne Arnemo

# Innholdsfortegnelse

<b>INNHALDSFORTEGNELSE .....</b>	<b>4</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY IN ENGLISH.....</b>	<b>7</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>10</b>
1.1 <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> .....	10
1.1.1 Oppbygging.....	10
1.1.2 Klassifisering av meningokokker.....	13
1.2 MENINGOKOKKSYKDOM .....	14
1.2.1 Sykdom og patogenese.....	14
1.2.2 Beskyttelse og immunitet.....	15
1.3 EPIDEMIOLOGI.....	17
1.3.1 Sykdomsforekomst og distribusjon av serogrupper .....	17
1.3.2 Meningittbeltet .....	17
1.4 VAKSINER MOT MENINGOKOKKSYKDOM .....	18
1.4.1 Polysakkaridvaksiner .....	18
1.4.2 Konjugatvaksiner .....	19
1.4.3 Yttermembranvesikkel (OMV)-vaksiner .....	19
1.4.4 Aluminium som adjuvans .....	21
1.5 A+W135 OMV-VAKSINE FOR AFRIKA .....	21
1.5.1 Rasjonale for å utvikle en OMV-vaksine for Afrika.....	21
1.5.2 Samarbeid mellom Norge og Cuba .....	22
1.5.3 Fremstilling av vaksinen .....	23
1.6 MÅL MED OPPGAVEN.....	23
<b>2. MATERIALER OG METODER.....</b>	<b>24</b>
2.1 SDS-PAGE .....	24
2.1.1 Prinsipp .....	24
2.1.2 Prosedyre.....	24
2.2 FARGING MED COOMASSIE BRILLIANT BLUE G250 .....	25
2.2.1 Prinsipp .....	25
2.2.2 Prosedyre.....	25
2.3 LPS-KVANTITERING MED SØLVFARGING.....	26
2.3.1 Prinsipp .....	26
2.3.2 Prosedyre.....	26
2.4 ELEKTRONMIKROSKOPI.....	27
2.5 IMMUNISERING AV MUS.....	27
2.5.1 Prinsipp .....	27
2.5.2 Prosedyre museforsøk 1: Immunogenisitetsstudier av A+W135 OMV-vaksine med og uten adjuvans i to musestammer .....	27
2.5.3 Prosedyre museforsøk 2: Sammenlignende studier av tre meningokokkvaksiner .....	29
2.5.4 Blodprøvetaking og behandling av blodprøver.....	31
2.6 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	31
2.6.1 Prinsipp .....	31

---

2.6.2	Prosedyre .....	32
2.7	IMMUNBLOTT .....	35
2.7.1	Prinsipp .....	35
2.7.2	Prosedyre .....	36
2.8	SERUMBAKTERICID ANALYSE (SBA) .....	37
2.8.1	Prinsipp .....	37
2.8.2	Prosedyre .....	37
2.9	OPSONOFAGOCYTOSE (OPA) .....	39
2.9.1	Prinsipp .....	39
2.9.2	Prosedyre .....	40
2.10	STATISTISKE METODER .....	41
<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>42</b>
3.1	KARAKTERISERING AV A+W135 OMV-VAKSINE .....	42
3.1.1	Proteinkarakterisering .....	42
3.1.2	LPS-kvantitering .....	43
3.1.3	Elektronmikroskopi .....	44
3.2	IMMUNOGENISITETSSTUDIER AV A+W135 OMV-VAKSINE MED OG UTEN ADJUVANS I TO MUSESTAMMER .....	44
3.2.1	OMV-IgG ELISA .....	44
3.2.2	Immunblott .....	49
3.3	SAMMENLIGNENDE STUDIER AV TRE MENINGOKOKKVAKSINER .....	52
3.3.1	OMV IgG-ELISA .....	52
3.3.2	Polysakkarid IgG-ELISA .....	53
3.3.3	Serumbaktericid analyse (SBA) .....	54
3.3.4	Korrelasjon mellom respons i ELISA og SBA .....	55
3.3.5	Opsonofagocytose (OPA) .....	56
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>57</b>
4.1	KARAKTERISERING AV A+W135 OMV-VAKSINE .....	57
4.1.1	Proteinkarakterisering .....	57
4.1.2	LPS-innhold .....	58
4.1.3	Vesikkeldannelse .....	58
4.2	IMMUNOGENISITETSSTUDIER AV A+W135 OMV-VAKSINE MED OG UTEN ADJUVANS I TO MUSESTAMMER .....	59
4.2.1	IgG-respons mot OMV i ELISA .....	59
4.2.2	IgG-respons mot enkeltkomponenter i OMV i immunblot .....	60
4.3	SAMMENLIGNENDE STUDIER AV TRE MENINGOKOKKVAKSINER .....	61
4.3.1	IgG-respons mot OMV og polysakkrider i ELISA .....	61
4.3.2	Serumbaktericid analyse (SBA) .....	63
4.3.3	Opsonofagocytose (OPA) .....	64
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERANSELISTE</b> .....	<b>66</b>
	<b>VEDLEGG</b> .....	<b>72</b>

---

## Sammendrag

Bakterien *Neisseria meningitidis* er en av de viktigste årsakene til meningitt og sepsis i verden. Selv med tilgang på optimal behandling er dødeligheten høy. Den høyeste sykdomsinsidensen i verden ser man i Afrika, i et område som kalles meningittbeltet, hvor meningokokkstammer av serogruppe A, C, W135 og X er kjent for å kunne forårsake epidemier. Behovet for en effektiv og rimelig vaksine er stor. Det eksisterer meningokokkvaksiner som er basert på bakteriens kapselpolysakkarider (polysakkarid- og konjugatvaksiner), men det er flere ulemper med disse.

Yttermembranvesikkel (OMV)-vaksiner er basert på proteiner i yttermembranen til bakterien. Serogruppe B OMV-vaksiner er gitt i mange millioner doser og vist å være trygge og effektive. Folkehelseinstituttet i Norge og Finlay Institute på Cuba har erfaring med utvikling av serogruppe B OMV-vaksiner og holder nå på å utvikle en tilsvarende vaksine mot serogruppe A og W135 meningokokksykdom i Afrika. Vaksinen er laget av to meningokokkstammer representative for serogrupper, serotyper og serosubtyper utbredt under epidemier i meningittbeltet.

Antigeninnholdet i A+W135 OMV-vaksinen ble karakterisert ved SDS-PAGE og immunblott. Immunogenisiteten i to ulike musestammer etter 1, 2 og 3 doser av vaksinen med og uten aluminiumhydroksid ble studert i ELISA og immunblott. Immunogenisiteten av A+W135 OMV-vaksinen i mus ble også sammenlignet med to allerede eksisterende meningokokkvaksiner (en polysakkaridvaksine og en konjugatvaksine) og studert i ELISA, SBA og OPA.

A+W135 OMV-vaksinen inneholdt flere proteinantigener som man vet er viktige i dannelsen av beskyttende antistoffer. To doser A+W135 OMV-vaksine ga god immunrespons i mus. En tredje dose så viktigere ut for musene som fikk vaksine uten aluminiumhydroksid. Adsorpsjon til aluminiumhydroksid økte vaksinens immunrespons i mus. Valg av musestamme så ikke ut til å ha betydning i dette forsøket. Nivåer av funksjonelle antistoffer i mus immunisert med A+W135 OMV-vaksinen var signifikant høyere enn for konjugatvaksinen testet i dette forsøket. Polysakkaridvaksinen ga liten eller ingen respons.

En A+W135 OMV-vaksine kan være et bra alternativ til polysakkarid- og konjugatvaksiner i Afrika.

## Summary in english

The bacterium *Neisseria meningitidis* is one of the leading causes of meningitis and sepsis throughout the world. Mortality rate of meningococcal disease is high, even with access to optimal treatment. The highest incidence of disease occurs in Africa, in the area called the meningitis belt, where the meningococcal serogroups A, C, W135 and X are known to cause epidemics. Existing meningococcal vaccines are based on capsular polysaccharides of the bacterium (polysaccharide and conjugate vaccines), of which there are several drawbacks.

Outer membrane vesicle (OMV) vaccines are based on outer membrane proteins of the bacterium. Millions of people have received serogroup B OMV vaccines and the safety and efficacy have been documented. The Norwegian Institute of Public Health and Finlay Institute in Cuba, experienced in developing serogroup B OMV vaccines, are in the process of developing this kind of vaccine against serogroup A and W135 meningococcal disease in Africa. The vaccine is made of two meningococcal strains, representative for serogroups, serotypes and serosubtypes common during epidemics in the meningitis belt.

The antigen content of the A+W135 OMV vaccine was characterized by SDS-PAGE and immunoblot. The immunogenicity of the vaccine was determined by ELISA and immunoblot in two different mouse strains after 1, 2 and 3 doses of the vaccine with and without aluminum hydroxide. The immunogenicity of the A+W135 OMV vaccine was compared with two existing meningococcal vaccines, a polysaccharide vaccine and a conjugate vaccine, and determined by ELISA, SBA and OPA.

The A+W135 OMV vaccine contained protein antigens known to be important in developing protective antibodies against the bacterium. Two doses of A+W135 OMV vaccine induced good immune responses in mice. A third dose was important in mice immunized with the vaccine without aluminum hydroxide. Adsorption to aluminum hydroxide increased the immune response of the vaccine. Choice of mice strain did not seem to affect the immune response. Levels of functional antibodies were significant higher after immunization with A+W135 OMV vaccine compared to the conjugate vaccine. The polysaccharide vaccine was not very immunogenic in mice.

The A+W135 OMV vaccine may be a good alternative to conjugate and polysaccharide vaccines for Africa.

---

## Forkortelser

ADFD	Avdeling for dyreforsøk
AEC	3-amino-9-etylcarbazol
ALP	Alkalisk fosfatase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovint serumalbumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CFU	Colony forming units
DHR	Dihydrorhodamin
DOC	Deoksyholat
E/ml	Enheter/ml
EF-Tu	Elongation factor Tu
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
fHbp	Faktor H bindende protein
FHI	Folkehelseinstituttet
GLOBVAC	Global Health and Vaccination Research
GLP	God laboratoriepraksis
GMP	God tilvirkningspraksis
HBSS	Hanks balanced salt solution
HRP	Pepperrot peroksidase (horse raddish peroxidase)
IgG/M/E	Immunoglobulin G/M/E
IgG1/2	Immunoglobulin G subklasse 1/2
LAL-test	Limulus amoebocyte lysate
LAF-benk	“Laminar air flow”-benk



LPS	Lipopolysakkarid
MLST	Multilocus sequence type
NadA	<i>Neisseria</i> adhesin A
NC-membran	Nitrocellulosemembran
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NspA	<i>Neisseria</i> surface protein A
OD	Optical density
OMV	Yttermembranvesikkel (outer membrane vesicle)
OPA	Opsonofagocytose
PBS	Fosfatbuffersaltvann
PS	Polysakkarid
RB	Respiratorisk burst
RmpM	Reduction modifiable protein M
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SBA	Serumbaktericid analyse
SMAN	Avdeling for næringsmiddelbårne infeksjoner
SMBI	Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi
ST	Sekvenstype
TEMED	Tetra-metyl-etylendiamin
Th1/2	T-hjelpecelle 1/2
UiO	Universitetet i Oslo

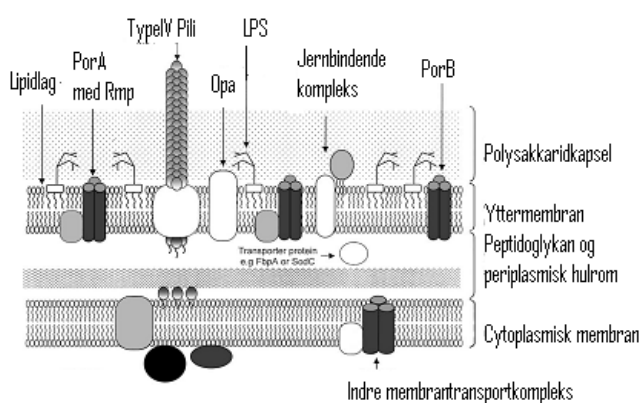
# 1. Innledning

## 1.1 *Neisseria meningitidis*

Bakterien *Neisseria meningitidis* er en gramnegativ diplokokk og kalles ofte meningokokk. Meningokokker er en av de viktigste årsakene til meningitt (hjernehinnebetennelse) og sepsis (blodforgiftning) i verden (1).

### 1.1.1 Oppbygging

Som andre gramnegative bakterier har *N. meningitidis* en indre cytoplasmisk membran og en yttermembran adskilt av et peptidoglykanlag (figur 1).



Figur 1: *Neisseria meningitidis*' cellevegg (2).

### Kapsel

Yttermembranen er omgitt av en polysakkaridkapsel. Dette er en viktig virulensfaktor som er med på å gjøre bakterien serumresistent ved å beskytte den mot fagocytose og komplementmediert lyse (2). Stammer uten kapsel forårsaker sjelden sykdom, men slike stammer finnes ofte i nasofarynx hos asymptotiske bærere (3). Sammensetningen av polysakkaridene i kapselen gir grunnlag for klassifisering av bakterien i serogrupper, se kapittel 1.1.2. Serogruppe A, B, C, W135, X og Y er kjent å forårsake sykdom (4). Polysakkaridene i serogruppe B, C, Y og W135 består av polymere av en type sialinsyre (N-acetyl-neuraminsyre) satt sammen på ulike måter, mens serogruppe A polysakkarid er satt sammen av N-acetyl-mannosaminfosfat. A, C, W135 og Y polysakkarider er immunogene i mennesker og er grunnlaget for de eksisterende polysakkarid- og konjugatvaksinene.

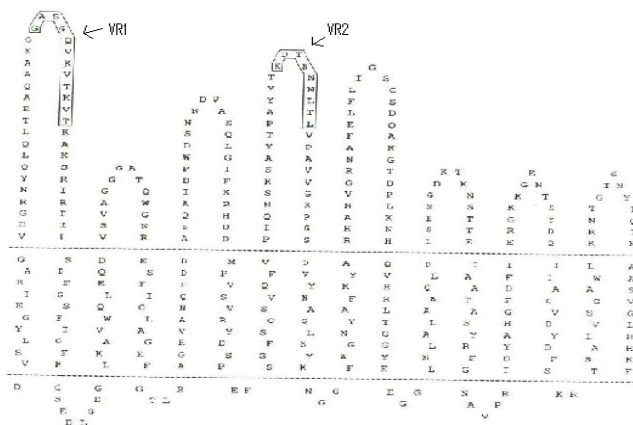
Serogruppe B polysakkarid er lite immunogent i mennesker på grunn av likhet mellom dette polysakkaridet og polysialinsyre som finnes på neurale celledhesjonsmolekyler i hjernevev hos fostre og nyfødte (5).

## Yttermembranproteiner

I meningokokkens yttermembran finnes det proteiner med forskjellige funksjoner. Noen av de viktigste presenteres kort her.

### *PorA*

PorA er et porin og et av hovedproteinene i yttermembranen. Porinene er tilstede som trimere og fungerer som porer i membranen. Gjennom porene kan små hydrofile molekyler passere. Poriner er amfifile molekyler med hydrofile og variable løkker eksponert på overflaten av bakterien og hydrofobe områder inkorporert i yttermembranen. Porinene varierer mellom bakteriestammer. Nesten alle meningokokker har PorA. PorA kalles også klasse 1 protein og er kationselektivt. Mesteparten av variasjonen i PorA foreligger i løkke 1 og 4, henholdsvis variabel region 1 (VR1) og 2 (VR2) (6) (figur 2). De variable regionene i PorA bestemmer serosubtypen (kapittel 1.1.2). Antistoffer mot PorA er baktericide og er viktig i beskyttende immunitet mot meningokokker. I OMV-vaksiner er PorA det immunodominante antigenet og derfor en viktig vaksinekomponent (7-9).



Figur 2: **Todimensjonal struktur av PorA.** Den største variasjonen skjer i løkke 1 og 4, henholdsvis variabel region 1 (VR1) og 2 (VR2) (10).

### *PorB*

Alle meningokokker har det anionselektive porinet PorB, enten PorB2 eller PorB3 (6). Variable regioner i PorB bestemmer serotypen (kapittel 1.1.2). PorB er immunogent, men dets bidrag til beskyttende immunitet er foreløpig uvisst (7). En studie viste at PorB3, i

---

motsetning til PorB2, ikke er eksponert på overflaten i levende bakterier, noe som indikerer at PorB3 er en mindre viktig vaksinekomponent (11).

### *RmpM*

RmpM (reduction modifiable protein M) kalles også klasse 4 protein. Dets funksjon er ukjent, men det er vist å bidra til PorAs stabilitet *in vitro* (12). RmpM er et immunogent protein, men er ikke vist å indusere dannelse av baktericide antistoffer (13).

### *Opc og Opa*

Opc og Opa er proteiner som også kalles klasse 5 proteiner. De er adhesiner som sammen med type IV pili medierer adhesjon ved å binde seg til visse strukturer på humane celler (14). Opc er vist å indusere dannelse av immunogene og baktericide antistoffer i mennesker (8, 15).

### *NadA*

NadA (*Neisseria* adhesin A) er et høymolekylært adhesin bestående av tre domener. Det finnes fem kjente varianter av proteinet, hvor variant 1-3 oftest er uttrykt i virulente stammer (16). Da NadA er vist å indusere dannelsen av baktericide antistoffer i mus og mennesker er det en viktig vaksinekomponent (7, 17). Det er imidlertid ikke alle meningokokker som uttrykker dette proteinet (18). NadA er en av komponentene i Novartis' universale serogruppe B vaksine, Bexsero®, som nå er under vurdering for markedsføringstillatelse (19).

### *fHbp*

fHbp (faktor H-bindende protein) binder faktor H. Faktor H er en regulatorisk komponent som hemmer aktivering av komplementsystemet. fHbp er et lovende vaksineantigen, da det er vist å indusere dannelse av baktericide antistoffer. I tillegg til at antistoffene mot fHbp er baktericide, vil de indirekte kunne øke sjansen for lysing av bakterien ved å hemme binding av faktor H (20). fHbp inngår sammen med NadA i Novartis' serogruppe B vaksine Bexsero®. (19).

### *NspA, FetA og Omp85*

Andre godt studerte yttermembranproteiner er FetA, Omp85 og NspA (*Neisseria* surface protein A). FetA er involvert i jernopptak, Omp85 er viktig i lipidtransport og NspA er antatt å være involvert i adhesjon. FetA kan indusere dannelse av baktericide antistoffer i mus, mens dets betydning i mennesker er usikker. Antistoffer mot Omp85 er lite baktericide (7).

NspA var lenge regnet som en lovende vaksinekandidat, men en rekombinant NspA-vaksine induerte ikke dannelsen av baktericide antistoffer i en klinisk fase I-studie (21).

### Lipopolysakkarid (LPS)

Meningokokkens LPS er et amfifilt glykolipid med molekylvekt rundt 4,8 kDa. LPS bidrar til å gi bakterien serumresistens og består av to strukturelt forskjellige regioner. Lipiddelen (lipid A) sitter i membranen og den polare oligosakkariddelen er overflateeksponert. Strukturen av oligosakkariddelen varierer fra stamme til stamme og gir grunnlag for immunotyping (kapittel 1.1.2). Siden oligosakkariddelen i meningokokkens LPS mangler de repeterende sukkerkjedene som finnes i andre gramnegative bakterier, blir meningokokkens LPS også omtalt som lipooligosakkarid (LOS) (22). LPS er et endotoksin og det er lipid A-delen som står for de toksiske effektene. Nivåer av LPS i serum korrelerer med alvorligheten av sykdom og overlevelse. Det er kjent at lipid A inducerer cytokinfrigjøring som kan føre til septisk sjokk (23). Oligosakkariddelen er immunogent i menneske og en potensiell vaksinekandidat dersom toksisiteten reduseres.

### Pili

*N. meningitidis* har som mange andre gramnegative bakterier type IV pili. Pili er filamenter sammensatt av flere proteiner som strekker seg fra den indre membranen til bakterieoverflaten gjennom yttermembranen. De er dynamiske strukturer som kan forlenges og forkortes. Kapsulære bakterier uten type IV pili kan ikke interagere med epitel- og endotelceller. Pilin er en av hovedkomponentene som bidrar til interaksjon mellom bakterien og humane mukosale celler, og er nødvendig for første adhesjon (14).

## **1.1.2 Klassifisering av meningokokker**

### Serologisk klassifisering: serogruppe, serotype, serosubtype, immunotype

Meningokokkene deles inn i serogrupper, serotyper, serosubtyper og immunotyper. Det finnes 13 serogrupper (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y og Z) basert på ulikheter i polysakkaridsammensetningen i kapselen (4). Serotyping baseres på hypervariable regioner i yttermembranproteinet PorB. Serosubtyping baseres på hypervariable regioner i PorA. Monoklonale antistoffer brukt i serosubtyping gjenkjenner som regel enten variabel region 1 eller 2 (løkke 1 og 4), se figur 2. Derfor inkluderer man begge de variable regionene når man klassifiserer et isolats serosubtype (24). Immunotyping baseres på heterogenisitet i

---

oligosakkariddelen av LPS. Dette gir grunnlaget for inndeling i 12 immunotyper. Noen immunotyper er mer utbredt i visse serogrupper enn andre. L10-L11 er mest vanlig i serogruppe A, og immunotype L3,7,9 er mest vanlig i serogruppe B, C og W135 (25). På grunn av fasevariasjon kan LPS variere mellom bakterier i samme stamme og det er derfor ikke alltid lett å basere klassifiseringen på LPS-variasjon (24). Et isolat angis med dets serogruppe:serotype:serosubtype:immunotype, for eksempel B:15:P1.7,16:L3,7,9.

### Genetisk klassifisering: Sekvenstype (ST) og klonale komplekser

Serologisk klassifisering baseres på fenotypiske egenskaper bestemt ved reaksjon med monoklonale antistoffer. Multilocus sequence typing (MLST) er en molekylærbiologisk alternativ metode som for *N. meningitidis* først ble utviklet på 1990-tallet (26). I denne metoden klassifiseres meningokokkene genetisk i forskjellige sekvenstyper (ST) etter sekvensering av syv såkalte "housekeeping genes". Det finnes mange tusen sekvenstyper. Mange sekvenstyper er nært beslektet og kan deles inn i klonale komplekser, også kalt ST-komplekser. Visse ST-komplekser er mer assosiert med sykdom enn andre, såkalte hyperinvasive slekter, mens andre er mer utbredt blant asymptomatiske bærere. ST-11 og ST-5 komplekset er et eksempel på en gruppe sekvenstyper som mer assosiert med sykdom enn med bæring (27).

## 1.2 Meningokokksykdom

### 1.2.1 Sykdom og patogenese

Meningokokken er bare patogen i mennesker og en viktig årsak til meningitt og sepsis. Meningokokken koloniserer i nasofarynx. Kolonisering i seg selv er ikke nødvendigvis farlig da meningokokker ofte koloniserer asymptomatisk i befolkningen. Andel bærere er vist å variere rundt om i verden og i forskjellige aldersgrupper (27). Da meningokokker er følsomme for uttørring, overlever de ikke lenge som aerosoler i luften, og trenger derfor tett og hyppig kontakt mellom mennesker for smitte (28). Selv med tilgang på behandling er det høy dødelighet av meningokokksykdom; 5-10 % og over 20 % for henholdsvis meningitt og sepsis. Av de som overlever får 10-15 % varige følgesykdommer, som f. eks. tap av hørsel, nedsatt motorikk og amputasjoner som følge av vevsnekrose (1). Vanlige symptomer på meningitt er feber, hodepine og nakkestivhet. Symptomer på sepsis er rask innsettende feber og bloduttredelser i huden som etterfølges av kraftig hypotensjon og multiorgansvikt (23).

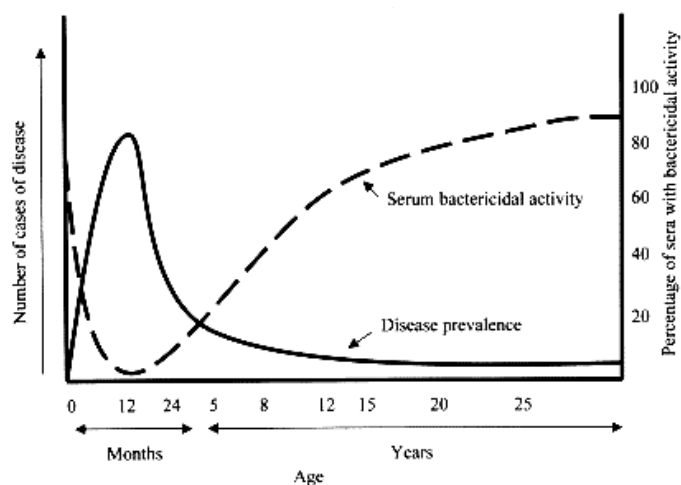
En antar at invasive meningokokker uttrykker type IV pili som binder strukturer på humane celler i nese og svelg. Klasse 5 proteiner (Opc og Opa) medierer tettere kontakt etter første adhesjon. Bakterien koloniserer, formerer seg og forandrer epitelcellene. Ved endocytose passerer bakterien epitelcellene og beveger seg gjennom cytoplasma i basalmembranen og inn i blodsirkulasjonen. Samtidig skiller bakterien ut IgA-protease som spalter IgA, man tror dette hjelper bakterien til overlevelse. Den eksakte mekanismen for hvordan bakterien entrer blodsirkulasjonen er delvis ukjent. Det er observert at de kan dele seg inne i makrofager, og en spekulerer i om fagocytter bærer bakterien inn i blodstrømmen uten å drepe dem. Bakteriens evne til å motstå antistoffavhengig, komplementmediert lysing og fagocytose er essensielt for overlevelse i blodsirkulasjonen og for å kunne gi systemisk infeksjon. Polysakkaridkapselen og LPS bidrar til slik serumresistens. I blodsirkulasjonen frigjør bakterien vesikulære yttermembranstrukturer (blebs) som inneholder LPS, yttermembranproteiner og kapselpolysakkarider. Man tror at dette er en mekanisme for å unnsnippe immunforsvaret, ved at antistoffer og fagocytter ”konsentrerer seg” om disse vesiklene. Lipid A og andre komponenter fra membranen stimulerer cytokinproduksjon som kan føre til septisk sjokk. Videre kan bakterien krysse blod-hjernebarrieren, invadere subaraknoidalrommet og gi meningitt (23).

### **1.2.2 Beskyttelse og immunitet**

Drap av *N. meningitidis* som kommer inn i blodsirkulasjonen kan skje på to måter: ved komplementmediert lysing og/eller opsonofagocytose. Bakterien er delvis serumresistent fordi polysakkaridkapselen forhindrer alternativ aktivering av komplementsystemet og fagocytose. Antistoffer mot overflatestrukturer på bakterien vil kunne føre til drap ved klassisk aktivering av komplementsystemet som igjen fører til alternativ aktivering. Resultatet er at man får avsettelse av komplementprodukter på bakterieoverflaten som til slutt ender i det såkalte ”membran angrepskomplekset” som fører til bakteriolyse. Antistoffer og visse komplementprodukter fungerer som opsoniner og vil trekke til seg leukocytter som kan fagocyttere og drepe bakterien. Antistoffer kan også fungere nøytraliserende ved å binde substanser som skilles ut fra bakterien (29).

Allerede på 1960-tallet ble det vist at disposisjon for meningokokksykdom er relatert til mangel på antistoffer i serum mot patogene stammer av *N.meningitidis*. Det ble vist å være en direkte korrelasjon mellom det å være utsatt for sykdom og fravær av baktericide antistoffer (30). Det ble også vist at naturlig immunitet mot sykdom forsterkes ved periodisk

bæring av meningokokkstammer gjennom livet (31). Gjennom svangerskapet får fosteret overført IgG-antistoffer fra mor som vil beskytte barnet de første månedene. Høy insidens av meningokokksykdom sees fra 6-12 måneders alder. Økte nivåer av baktericide antistoffer fra 2-12 år korrelerer med nedgangen i sykdomsinsidens (1). Figur 3 viser en modifisert versjon av den såkalte "Goldschneiderkurven".



*Figur 3: "Goldschneiderkurven". Aldersavhengig endring i serumbaktericid aktivitet og sykdomsprevalens. De første seks måneder av livet er man beskyttet av materielle antistoffer. Fra 6-12 måneders alder er sykdomsforekomsten høyest, før en gradvis reduksjon med årene på grunn av ervervede antistoffer. Tegning fra (32).*

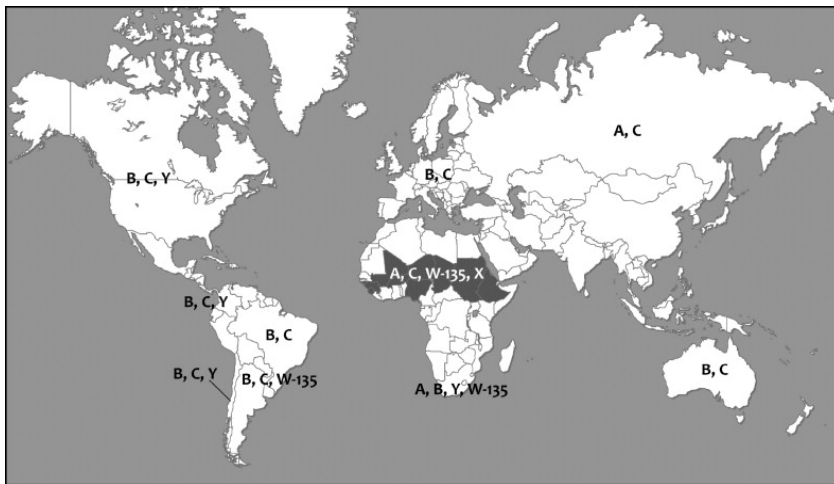
Man vet ikke den relative viktigheten av fagocytmediert drap sammenlignet med serumbaktericid aktivitet, men begge deler er trolig viktige. Et tegn på at fagocytmediert drap er viktig er at IgG subklasse 2 (IgG2) trolig har en rolle i beskyttelsen mot meningokokker. FcγRIIa finnes i to allotyper, hvorav den ene er den eneste Fc-reseptoren som binder IgG2. Siden IgG2 har redusert evne til å aktivere komplement er den avhengig av binding til denne ene varianten av FcγRIIa på fagocytter for å utøve sin effektorfunksjon. Det er sett at personer som er homozygot for den ikke-bindende varianten av FcγRIIa er mer utsatt for meningokokksepsis. Dette indikerer at IgG2 spiller en rolle i beskyttelsen mot meningokokker (29).



## 1.3 Epidemiologi

### 1.3.1 Sykdomsforekomst og distribusjon av serogrupper

Globalt forårsaker *N. meningitidis* rundt 500 000 tilfeller av meningokokksykdom og 50 000 dødsfall hvert år (1). Den høyeste insidensen ser man i det såkalte meningittbeltet i Afrika (figur 4), hvor sykdomsforekomsten kan bli så høy som 1 % under epidemier. I Europa og deler av Amerika er insidensene mye lavere, fra 0,3 til 8,9 tilfeller per 100 000 innbygger per år. Serogruppe A, B og C forårsaker mesteparten av sykdommen globalt. Man ser en ulik distribusjon av serogrupper i verden (figur 4). Serogruppe A er mest vanlig i Afrika og i mange deler av Asia og Russland, men er sjelden i resten av verden som Europa og Amerika (33). Serogruppe Y har i senere år økt i USA, Sør-Afrika og Israel, hvor den nå forårsaker over 20 % av tilfellene (34). I Europa og Nord-Amerika har det først og fremst vært serogruppe B og C som forårsaker sykdom. Etter innføringen av polysakkarid- og konjugatvaksiner mot serogruppe C, er serogruppe B nå det største problemet da det fortsatt ikke finnes en universell vaksine mot serogruppe B. Serogruppe B er viktig også i deler av Asia og Sør-Amerika (33).



Figur 4: **Den globale distribusjonen av serogrupper.** Land inkludert i meningittbeltet farget sort (35).

### 1.3.2 Meningittbeltet

Den høyeste insidensen av meningokokksykdom i Afrika forekommer i et område som kalles meningittbeltet. Begrepet ”meningittbeltet” ble for første gang introdusert i 1963 (36). Beltet strekker seg fra Senegal i vest til Etiopia i øst. I disse landene opplever man

---

periodiske epidemier hvert 5.-10. år. Mellom hver epidemi faller insidensen, men den er fortsatt høyere enn det man ser i industrialiserte land. Epidemiene starter nesten alltid tidlig i tørketiden når det er tørt og støvete, og bygger seg opp til en topp på slutten av denne perioden. Epidemien stopper plutselig når regntiden starter, for så å starte på igjen neste tørketid. Epidemiene varer som regel i to til tre tørketider. Det er fremsatt mange teorier om årsakssammenhengen mellom økt insidens og tørketid. Blant annet at støv og lav luftfuktighet gjør slimhinner såre og mer utsatt for kolonisering og at siden det er mindre å gjøre på gårdene, er sosiale sammenkomster mer vanlig i tørketiden (37).

Serogruppe A har vært og er fremdeles den dominerende serogruppen i Afrika (35). I løpet av 1970- og 80-tallet så man epidemier med serogruppe C i flere land i meningittbeltet (38, 39), men etter dette fortsatte serogruppe A å dominere. I de siste ti årene har man sett at både serogruppe W135 (40) og serogruppe X (41) kan forårsake høy insidens og vesentlig sykkelighet og dødelighet.

En viktig observasjon er at stammer isolert fra epidemier i meningittbeltet fra 1988 til 2003 viser klonale egenskaper. De fleste serogruppe A stammer tilhørte ST-5 komplekset. Til tross for et skifte fra ST-5 til ST-7 i denne perioden, uttrykker stammene likevel samme poriner (PorB3 = 4/21 og PorA = P1.20,9) (18, 42). Det samme gjelder serogruppe W135-stammer som tilhører ST-11 komplekset og uttrykker PorB2 = 2a og PorA = P1.5,2 (42). Mange isolerte serogruppe C-stammer tilhører også ST-11 komplekset med samme porinvarianter som serogruppe W135 (43). Under serogruppe X-epidemien i 2006 i Niger tilhørte de isolerte stammer ST-181 med PorA = P1.5-1,10-1 (41). Selv om det ennå er lite sykdom forårsaket av serogruppe Y i meningittbeltet, er denne serogruppen utbredt blant stammer funnet hos asymptomatiske bærere. De isolerte stammene er vist å tilhøre ST-23 komplekset med PorA = P1.5,2 (44).

## 1.4 Vaksiner mot meningokokksykdom

### 1.4.1 Polysakkaridvaksiner

Polysakkaridvaksinene består av kapselpolysakkarider fra de enkelte serogruyper. Disse vaksinene er billige, sikre og effektive i voksne og barn over to år og er anbefalt til risikogrupper. Det finnes i dag blant annet en bivalent og en tetravalent polysakkaridvaksine, mot henholdsvis serogruppe A+C og A+C+W135+Y. Polysakkaridvaksinene kan kontrollere

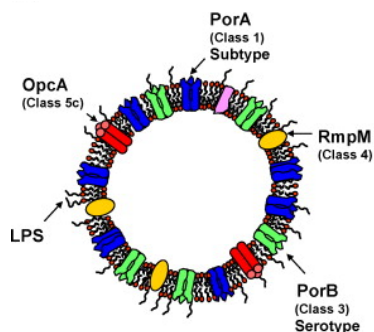
og stoppe epidemier i meningittbeltet, men på grunn av kortvarig effekt brukes de ikke rutinemessig i vaksinasjonsprogram. Årsaken til den aldersavhengige immunresponsen og den kortvarige beskyttelsen er at polysakkarider er tymus-uavhengige antigener. De gir lite B-cellemodning (isotypeskifte og hypermutasjon) som hovedsakelig resulterer i lavaffinitets IgM-antistoffer og mindre dannelse av hukommelsesceller (45). Serogruppe C polysakkaridvaksine kan gi hyporesponsivitet ved revaksinasjon, men den kliniske betydningen av dette er fortsatt uklart (1).

### **1.4.2 Konjugatvaksiner**

Kjemisk binding (konjugering) av kapselpolysakkarider til et bærerprotein resulterer i at man får en tymus-avhengig immunrespons som gir høyere antistoffkonsentrasjoner og immunologisk hukommelse, også i barn under to år. Det finnes monovalente vaksiner mot serogruppe A og C, og en tetravalent vaksine mot serogruppe A, C, W135 og Y. Vaksinene inneholder oligosakkarider fra polysakkaridkapselen enten konjugert til mutert difteritoksin (CRM197) eller til tetanustoksoid (45). Ulempen med konjugatvaksinen er prisen og fokuset har derfor vært å få den billig nok for masseimmunisering i meningittbeltet. Prosjektet Meningitis Vaccine Project lanserte i 2010 MenAfriVac™, en konjugatvaksine mot serogruppe A til under 0,5 US\$ per dose. Denne vaksinen er vist å være sikker og mer immunogen enn en ren serogruppe A polysakkaridvaksine og er allerede gitt til mange millioner mennesker i flere land i meningittbeltet (46).

### **1.4.3 Yttermembranvesikkel (OMV)-vaksiner**

Kapselpolysakkaridene i serogruppe B er lite immunogene, selv konjugert til et bærerprotein, og det har ikke lyktes å lage en vaksine mot serogruppe B basert på polysakkarider. Dette forklares med immunologisk toleranse på grunn av likhet med strukturer i humant vev. Antistoffer mot serogruppe B polysakkarider kryssreagerer med polysialinsyrekjeder på neurale celleadhesjonsmolekyler i hjernevev hos fostre og nyfødte. Da serogruppe B forårsaker meningokokksykdom i store deler av verden, måtte man finne alternativer. Ved å fokusere på proteiner i bakteriens yttermembran, ble de såkalte OMV-vaksinene utviklet (OMV = "outer membrane vesicle") (47). Figur 5 viser en skjematisk tegning av en yttermembranvesikkel med hovedproteiner.



**Figur 5: En skjematisk tegning av en yttermembranvesikkel med hovedkomponenter.** Tegning av Audun Aase, SMBI, FHI (47)

Det viste seg at ekstraherte yttermembranvesikler med native proteiner var mer immunogene enn rensede yttermembranproteiner fordi proteinenes konformasjon påvirker deres immunogenisitet. I forbindelse med serogruppe B epidemier på 1970-90-tallet ble det både i Norge og på Cuba utviklet en serogruppe B OMV-vaksine av den sirkulerende stammen i de ulike landene. Det var Folkehelseinstituttet (FHI) i Norge og Finlay Institute på Cuba som utviklet vaksinene (henholdsvis MenBvac og VA-MENGOC-BC). Man ønsket å lage en nativ fremstilling av yttermembranproteinene, men med redusert mengde LPS. Ved ekstraksjon med deoksykholat i fremstillingsprosessen av yttermembranvesikler, fikk man fjernet så mye LPS at vaksinene var sikre til bruk i mennesker (48). Toksisiteten av gjenværende LPS blir redusert ved binding til proteiner i yttermembranen (49) og ved adsorpsjon til aluminiumhydroksid (50). Det var derfor mulig å lage en sikker vaksine, med immunogene mengder av LPS. Cuba har brukt sin serogruppe B OMV-vaksine rutinemessig i sitt barnevaksinasjonsprogram i over 20 år (33). To doser av den norske og den kubanske vaksinen ble estimert til å ha en effektivitet på henholdsvis 57 % (etter 29 måneder) og 87 % (etter 16 måneder). Reevaluering av den norske vaksinen ga en effektivitet på 87 % etter ti måneder (47). Senere studier har vist at hvis den norske vaksinen gis i tre doser øker beskyttelsen og varigheten betrakkelig (8). Den norske og kubanske vaksinen viste liten kryssreaktivitet mot heterologe stammer med forskjellig PorA, og vil sannsynligvis ikke gi beskyttelse under en heterolog epidemi (51).

I forbindelse med epidemiske utbrudd av serogruppe B sykdom på New Zealand produserte FHI i 2001 en serogruppe B OMV-vaksine (MenNZB) av den sirkulerende stammen. Den ble produsert på tilsvarende måte som den norske serogruppe B OMV-vaksinen og ble estimert til å ha en effektivitet på 80 % for barn under fem år (52).

Serogruppe B OMV-vaksiner er til sammen gitt i mange millioner doser i land som Norge, Cuba, New Zealand, Frankrike, USA, Island og Chile. Sikkerheten av flere serogruppe B OMV-vaksiner har vært undersøkt gjennom studier i mange land, og er vurdert som sikre for bruk i alle aldersgrupper (48, 53).

Fra 2006 har den norske vaksinen MenBvac blitt brukt i Normandie i Frankrike på grunn av økt insidens av en serogruppe B stamme med samme serosubtype (PorA) som den norske vaksinen er laget av. Over 25 000 personer har blitt vaksinert. Insidensen av sykdomstilfeller ble signifikant redusert i de vaksinerte gruppene (54).

#### **1.4.4 Aluminium som adjuvans**

Adjuvans betyr ”til hjelp” og brukes i vaksiner for å forsterke immunresponsen av vaksineantigenet. Aluminium er brukt for å forsterke immunresponsen av vaksiner siden 1926, og er i dag den mest brukte adjuvans. Det er flere aluminiumsubstanser som er godkjent til bruk i vaksiner, f. eks aluminiumhydroksid og aluminiumfosfat. Til tross for at aluminiumsubstanser er de mest brukte adjuvans, er ikke mekanismen for immunresponsen fullstendig forstått. Den enkleste og eldste teorien er at antigen adsorbert til aluminium gir en depoteffekt. Forsinket frigjøring av det adsorberte antigenet fra det injiserte depotet gjør at antigenet blir presentert for antigenpresenterende celler på en måte som forbedrer opptak. Selv om denne forklaringen i dag blir sett på som ufullstendig, er den fysiske adsorpsjonen fortsatt sett på som en viktig mekanisme. Aluminium induserer antistoffproduksjon, og det er vist at immunresponsen er forskjøvet mot en Th2-respons. Th2-cellene medierer differensiering av B-celler som danner antistoffer av isotype IgE og IgG1 i mus. Aluminium er derfor en viktig komponent i vaksiner mot mikroorganismer som drepes av antistoffer. Aluminium er vist å være ineffektiv i vaksiner mot flere intracellulære mikroorganismer (55).

### **1.5 A+W135 OMV-vaksine for Afrika**

#### **1.5.1 Rasjonale for å utvikle en OMV-vaksine for Afrika**

De viktigste argumenter for utvikling av en OMV-vaksine for Afrika er:

- 
- Flere yttermembranproteiner inducerer dannelse av baktericide antistoffer og er potensielle vaksinekandidater (kapittel 1.1.1).
  - OMV-vaksiner er tidligere vist å være trygge og effektive mot serogruppe B sykdom (kapittel 1.4.3).
  - Meningokokker som forårsaker epidemier i meningittbeltet viser klonale egenskaper og uttrykker samme PorA og PorB. Å inkludere en representativ serogruppe W135 stamme vil også kunne beskytte mot serogruppe C og Y, da de har lignende PorA og PorB (kapittel 1.3.2).
  - Man vet enda ikke varigheten og effekten av MenAfriVac™ og den beskytter bare mot serogruppe A sykdom. Andre serogrupper kan også forårsake vesentlig sykkelighet og dødelighet (kapittel 1.3.2).
  - Produksjonsprosessen for OMV-vaksiner er relativt enkel sammenlignet med konjugatvaksiner. Det er derfor grunn til å vente at vaksinen vil bli relativt billig slik at den er lettere tilgjengelig for land i Afrika.

### **1.5.2 Samarbeid mellom Norge og Cuba**

Både Cuba (Finlay Institute) og Norge (FHI) utviklet egne serogruppe B OMV-vaksiner da landene på 1970-90-tallet ble rammet av meningokokkepidemier med serogruppe B. Også New Zealand ble rammet av serogruppe B epidemi. En OMV-vaksine basert på den epidemiske stammen på New Zealand ble utviklet ved FHI. I dag er ikke denne sykdommen lenger et problem verken i Norge eller på Cuba. Teknologien og erfaringen fra denne type vaksine kan potensielt brukes til å utvikle samme type vaksiner mot andre serogrupper (f. eks. A, W135 og X) som er vanlige i meningittbeltet. I 2008 ble et formelt samarbeid mellom FHI og Finlay Institute i Havanna opprettet. Samarbeidet går ut på å utvikle en OMV-vaksine mot serogruppe A og W135 meningokokksykdom til bruk i Afrika. Selve produksjonen foregår på Finlay, mens FHI har rolle som rådgiver og konsulent. Norges forskningsråd støtter dette prosjektet gjennom GLOBVAC (Global Health and Vaccination Research). Når GMP-produksjonen er etablert og ikke-kliniske studier gjennomført er det meningen at en klinisk fase I studie skal settes i gang på Cuba. Dette skal etter planen skje høsten 2011. Begge samarbeidspartnere har lang erfaring med produksjon og kontroll av serogruppe B OMV-vaksiner, og man ønsker da å bruke denne kunnskapen til å utvikle en effektiv og rimelig vaksine meningokokksykdom i Afrika.

### 1.5.3 Fremstilling av vaksinen

A+W135 OMV-vaksinen er basert på to representative stammer med tanke på serogruppe, serotype og serosubtype utbredt i meningittbeltet. Stamme Mk499/03 (serogruppe A) er isolert i Etiopia og stamme Mk222/02 (serogruppe W135) i Burkina Faso. De er klassifisert som henholdsvis A:4/21:P1.20,9:L11:ST-7 og W135:2a:P1.5,2:L3,7,9:ST-11. OMV-vaksinen fremstilles ved at bakteriestammene dyrkes i hver sin fermentor. Bakteriene høstes ved cross-flow filtrering og yttermembranvesiklene blir så ekstrahert med detergenten deoksyholat. Videre blir denne blandingen rensert ved sentrifugering og gelfiltrering. På slutten av renseprosessen blir OMV-løsningene diafiltrert mot en sukroseløsning. Til slutt blir OMV-løsningene adsorbent til aluminiumhydroksid i forholdet 1:40 protein og aluminiumhydroksid. Dette gjøres for hver av serogruppene A og W135, og de blandes til slutt i forholdet 1:1. Vaksinen inneholder konserveringsmiddelet tiomersal da den lages som en multidoserformulering for å gjøre vaksinen så billig som mulig. Fremstillingen av OMV-vaksiner er relativt enkel og gjør at det er mulig å fremstille en rimelig vaksine.

## 1.6 Mål med oppgaven

Denne oppgaven er en del av samarbeidsprosjektet mellom FHI i Norge og Finlay Institute på Cuba. Prosjektets hovedmål er som tidligere beskrevet å utvikle en effektiv og rimelig OMV-vaksine mot bakterien *Neisseria meningitidis* serogruppe A og W135 til bruk i Afrika.

Følgende delmål for denne oppgaven ble definert:

1. Karakterisering av vaksinen med tanke på antigeninnhold.
2. Undersøke antistoffkinetikken i to forskjellige musestammer etter 1, 2, og 3 doser av A+W135 OMV-vaksinen med og uten aluminiumhydroksid.
3. Sammenligne immunrespons av A+W135 OMV-vaksinen med de markedsførte vaksinerne Menveo® (A+C+W135+Y konjugatvaksine) og Mencevax® (A+C+W135+Y polysakkaridvaksine).

---

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 SDS-PAGE

Kilde: (56, 57)

#### 2.1.1 Prinsipp

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) er en teknikk hvor proteiner separeres etter størrelse i en gel. Proteinene blir eksponert for SDS (sodium dodecyl sulfate), en anionisk detergent, som denaturerer sekundære og tertiære strukturer og gjør proteinene negativt ladde. I tillegg vil 2-merkaptoetanol og koking av prøvene være med på å denaturere proteinene. Gelen dannes ved polymerisering av akrylamid og bisakrylamid. Polymeriseringen settes i gang med katalysatoren TEMED (tetrametyletyldiamin) og APS (ammoniumpersulfat). TEMED akselererer dannelsen av frie radikaler fra persulfat. Disse vil igjen katalysere polymerisering ved å omdanne akrylamidmonomerer til frie radikaler som reagerer med uaktiverede monomerer; en kjedereaksjon som gir en voksende polyakrylamidkjede. Polymerene som dannes blir tilfeldig kryssbundet av bisakrylamid som resulterer i et komplekst nettverk med en karakteristisk porøsitet avhengig av konsentrasjonen av de enkelte komponentene i gelen. Siden oksygen kan fange frie radikaler, og dermed hemme polymeriseringen, må løsningen degasses før tilsetting av TEMED og APS. Gelen settes i et elektrisk felt som gjør at de påsatte negativt ladde proteinene migrerer gjennom gelen mot den positive elektroden. Proteinene vil bevege seg forskjellig avhengig av størrelse, små proteiner vil vandre lengre enn store på grunn av mindre motstand i gelen.

#### 2.1.2 Prosedyre

##### Materialer

Se vedlegg 1.2.

##### Fremgangsmåte

Gel- og elektroforeseutstyr fra Bio-Rad ble brukt i forsøket (Mini Protean Tetra Cell og PowerPac Hc Power Supply). Glassplater ble satt sammen i gelholdere og montert i et støpestativ. 3,4 ml destillert vann, 2,5 ml løsning B og 4,0 ml løsning A ble blandet i en



sugekolbe og degasset. 100  $\mu$ l SDS 10 %, 50  $\mu$ l APS 10 % og 5  $\mu$ l TEMED ble tilsatt og blandingen ble pipettert ut mellom glassplatene. Løsningen polymeriserte i minst 1,5 time og ga en separasjonsgel med 12 % akrylamid og pH 8,8. En konsentrasjonsgel på 4 % akrylamid og pH 6,8 ble laget ved å blande og degasse 6,1 ml destillert vann, 2,5 ml løsning C og 1,3 ml løsning A, for så å tilsette 100  $\mu$ l SDS 10 %, 50  $\mu$ l APS 10 % og 10  $\mu$ l TEMED. Konsentrasjonsgelen ble pipettert ut mellom glassplatene på toppen av separasjonsgelen. En kam som gir ønsket antall brønner i konsentrasjonsgelen ble montert og gelen satt til polymerisering i 30 minutter. Kammen ble fjernet og glassplater med geler plassert i elektrodestativet som ble montert i et bufferkammer. Bufferkammeret ble fylt med elektrodebuffer. Proteinprøven som skulle analyseres (OMV-løsningene) ble blandet med prøvebuffer og fargestoffet pyronin, og deretter kokt i 5 minutter. Som referanse ble en molekylvektstandard med proteiner med kjente molekylvekter brukt. Hvis gelen skulle brukes til immunblott ble en kam med én stor brønn brukt og ca 50  $\mu$ g protein i 150  $\mu$ l prøvebuffer applisert i brønnen. Hvis en tibrønnskam skulle brukes ble ca 2  $\mu$ g protein i 10  $\mu$ l prøvebuffer applisert i hver brønn. Elektroforesen ble startet straks etter applisering av prøvene. Spenningen var 200 volt og elektroforesen ble stanset når den rosa pyroninfronten hadde nådd bunnen av gelen (ca 45 minutter). Gelene ble tatt ut av stativet og farget som beskrevet i kapittel 2.2. Dersom gelen skulle brukes i immunblott fortsatte arbeidet som beskrevet i kapittel 2.7.

## 2.2 Farging med Coomassie Brilliant Blue G250

### 2.2.1 Prinsipp

Bio-Safe Coomassie Stain er en fosforsyreløsning av fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G250. Den eksakte formuleringen er merkevarebeskyttet. G250 partikler danner kolloider i vandig løsning og vil interagere med proteiner i nærheten. Proteinene vises som blå bånd. Fargeprosedyren har en sensitivitet på 8 ng protein. Da kolloidene ikke interagerer med gelen, blir det lite bakgrunnsfarging.

### 2.2.2 Prosedyre

#### Materialer

Se vedlegg 1.2.

---

## Fremgangsmåte

Etter at elektroforesen i SDS-PAGE var ferdig ble gelen vasket i 200 ml destillert vann. Vannet ble fjernet og Bio-Safe Coomassie Stain tilsatt. Gelen ble farget på ristebord i en time. Etter farging ble gelen rensset i destillert vann i 30 minutter. Gelen kunne så fotograferes og tørkes i geltørker.

## 2.3 LPS-kvantitering med sølvfarging

Kilder: (58, 59)

### **2.3.1 Prinsipp**

For å kvantitere LPS i vaksinen lages det en gel som i SDS-PAGE (kapittel 2.1). Man bruker LPS-standarder med kjente konsentrasjoner til å lage en standardkuve. Etter elektroforesen følger fire trinn for farging av LPS-bånd. LPS blir fiksert i gelen med etanol og eddiksyre. LPS blir så oksidert i en løsning av perjodsyre, eddiksyre og etanol. Deretter tilsettes sølvnitrat i basisk løsning. Sølvionene binder til karbohydratdelen i LPS og blir redusert til metallisk sølv. Båndene blir farget brun-svarte ved å legge gelen i en løsning med sitronsyre og formaldehyd. Intensiteten til båndene i gelen scannes og ved hjelp av standardkurven kan mengde LPS i prøven regnes ut. Metoden kan detektere 5 ng LPS som laveste konsentrasjon.

### **2.3.2 Prosedyre**

OMV-løsningene ble analysert for innhold av LPS. Forsøket ble utført av Vegard Bråthen ved Avdeling for produksjon ved FHI. En 15 % akrylamidgel ble laget. Det ble brukt LPS-standarder til å lage en standardkurve med tre punkter fra tre konsentrasjoner (20, 60 og 100 ng). For OMV fra serogruppe A stamme Mk499/03 ble L11 brukt som standard. For OMV fra serogruppe W135 stamme Mk222/02 ble L3,7,9 brukt. Serogruppe A OMV-løsning ble fortynnet til 67 ng protein/ $\mu$ l og serogruppe W135 OMV-løsning til 670 ng protein/ $\mu$ l. Det ble applisert 10  $\mu$ l prøve per brønn. De fargede områdene ble scannet og ved hjelp av standardkurven ble LPS-innholdet regnet ut. Da forsøket ble utført av Bråthen er ikke fullstendig prosedyre og materialliste beskrevet.

## 2.4 Elektronmikroskopi

Et elektronmikroskop ”belyser” objekter med elektroner i stedet for lys. Kontrasten som dannes avhenger av hvordan elektronene treffer objektet. Elektronmikroskopering ble utført av Sverre-Henning Brorson ved Institutt for patologi, Enhet for elektronmikroskopi, Oslo universitetssykehus Rikshospitalet. 10 µl av OMV-løsningene ble ufortynnet lagt på en karbondekket ”grid”. 2 % uranylacetat ble brukt til negativ farging, slik at området rundt strukturene i prøven ble farget når man plasserte ”gridden” i elektronmikroskopet. Brorson tok bilde av OMV fra stamme Mk499/03 (serogruppe A) og Mk222/02 (serogruppe W135). Da forsøket ble utført av Brorson er ikke fullstendig prosedyre og materialliste beskrevet.

## 2.5 Immunisering av mus

### 2.5.1 Prinsipp

Før man kan teste vaksiner i kliniske studier på mennesker, er det krav om ikke-kliniske studier. Dette er farmakologiske og toksikologiske studier utført på dyr. Det er også krav om at slike studier skal foregå etter kvalitetsstandarden god laboratoriepraksis (GLP), som omhandler oppgaver og prosesser i et forsøkslaboratorium. I tillegg må det i Norge søkes tillatelse for å benytte dyr i studier. Forsøksdyrutvalget gir slik tillatelse og krever at nødvendig bruk av forsøksdyr skjer på en dyrevernmessig forsvarlig måte (60). Avdeling for forsøksdyr ved FHI er godkjent for ikke-kliniske forsøk i henhold til GLP-standarden. Tillatelse til vaksinerings av mus oppdateres annethvert år.

### 2.5.2 Prosedyre museforsøk 1: Immunogenisitetstudier av A+W135 OMV-vaksine med og uten adjuvans i to musestammer

Antistoffkinetikken i to ulike musestammer etter immunisering med 1, 2 og 3 doser av den kubanske A+W135 OMV-vaksinen med og uten aluminiumhydroksid skulle undersøkes. Det ble gitt en dose på totalt 8 µg protein, det vil si 4 µg OMV-protein fra hver serogruppe, på dag 0, 21 og 42. Det ble tatt blodprøver av musene på dag 0, 21, 42 og 56.

## Utgangsløsninger

1. OMV fra serogruppe W135 stamme Mk499/03 (DFVME 002W135 sukrose). 1 mg protein/ml. Produsert på Finlay Institute, februar 2010.
2. OMV fra serogruppe A stamme Mk222/02 (DFVME 003A sukrose). 1 mg protein/ml. Produsert på Finlay Institute, februar i 2010.
3. Bivalent OMV-vaksine fra stamme Mk499/02 og Mk 222/02 med Al(OH)<sub>3</sub> og tiomersal (Bivalent 003A+002W135). 106 µg protein/ml. Produsert på Finlay Institute, februar 2010.
4. PBS pH 7,2 0,01M "Dr.Kornstad". Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.

## Tillaging av vaksiner

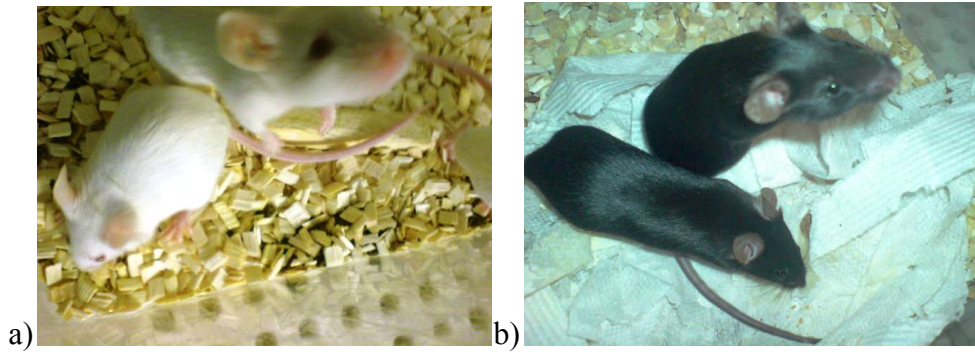
Fortynninger ble utført i LAF-benk og aseptisk teknikk benyttet. Tillaging av vaksiner ble gjentatt før hver vaksinerings. Blandinger og fortynninger ble gjort i sterile plastrør. Sterile kanyler og sprøyter ble brukt for å ta ut OMV-løsninger fra hetteglass. Utgangsløsning 1 og 2 ble blandet i forholdet 1:1 og fortynnet med utgangsløsning 4 til 40 µg protein/ml. Utgangsløsning 3 ble fortynnet med utgangsløsning 4 til 40 µg protein/ml. Ved immunisering med 0,2 ml per mus fikk hver mus 8 µg protein. For fullstendig beskrivelse av tillaging av vaksiner, se protokoll i vedlegg 2.

## Immuniseringsoppsett

5-6 uker gamle BALB/cJ- og C57BL/6J-mus (heretter kalt Balb/c og C57Black) fra Taconic ble brukt i forsøket. Musene ble immunisert med 0,2 ml vaksine subkutant. Fem og seks mus ble oppbevart per bur. Merking, immunisering og blodprøvetaking ble utført av Avdeling for dyreforsøk (ADFD) ved FHI. Se tabell 1 for immuniseringsoppsett.

*Tabell 1: Immuniseringsoppsett for museforsøk 1. Fire grupper fikk OMV-vaksine med eller uten aluminiumhydroksid. To grupper fikk placebo med PBS. ADFD mottok fire C57Black-mus for lite, derfor bare ti mus i gruppe 2 og 4. Musene fikk tre doser med tre ukers mellomrom.*

<b>Gruppe</b>	<b>Bur</b>	<b>Mus</b>	<b>Antall</b>	<b>Vaksiner</b>	<b>Dose per mus per immunisering</b>
1	1-2	Balb/c	12	A+W OMV + Al(OH) <sub>3</sub>	8 µg protein
2	3-4	C57Black	10	A+W OMV + Al(OH) <sub>3</sub>	8 µg protein
3	5-6	Balb/c	12	A+W OMV (uten adj)	8 µg protein
4	7-8	C57Black	10	A+W OMV (uten adj)	8 µg protein
5	9	Balb/c	6	Placebo (PBS pH 7,2)	-
6	10	C57Black	6	Placebo (PBS pH 7,2)	-



Figur 6: **Mus benyttet i museforsøk 1.** a) Balb/c og b) C57Black. Foto: Marianne Arnemo

### 2.5.3 Prosedyre museforsøk 2: Sammenlignende studier av tre meningokokkvaksiner

A+W135 OMV-vaksinen skulle sammenlignes med to allerede eksisterende meningokokkvaksiner, en A+C+W135+Y konjugatvaksine og en A+C+W135+Y polysakkaridvaksine. Mus ble immunisert med to doser á 1/10 av human dose av enten konjugatvaksinen Menveo® (Novartis), polysakkaridvaksinen Mencevax® (GlaxoSmithKline) eller A+W135 OMV-vaksinen. For Menveo® vil det si 1+0,5+0,5+0,5 µg av henholdsvis serogruppe A+C+W135+Y oligosakkarid og for Mencevax® 5+5+5+5 µg av serogruppe A+C+W135+Y polysakkarid. Den antatte humane dose av A+W135 OMV-vaksinen er totalt 50 µg protein (25 µg protein fra hver av serogruppe A og W135), musene fikk derfor 5 µg protein. Musene ble immunisert på dag 0 og 21 og tatt blodprøver av på dag 0, 21 og 33.

#### Utgangsløsninger

1. Bivalent OMV-vaksine fra stamme Mk499/02 og Mk 222/02 med Al(OH)<sub>3</sub> og tiomersal (Bivalent 003A+002W135). 106 µg protein/ml. Produsert på Finlay Institute, februar 2010.
2. Menveo® serogruppe A, C, W135 og Y konjugatvaksine. 0,5 ml (1 dose) vaksine inneholder: 10 µg serogruppe A oligosakkarid og 5 µg serogruppe C, W135 og Y oligosakkarid konjugert til CRM197 protein. Novartis Vaccines.
3. Mencevax® serogruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine. 0,5 ml (1 dose) vaksine inneholder: 50 µg av hvert polysakkarid. GlaxoSmithKline Biologicals.
4. Alhydrogel®. Aluminiumhydroksid (Al(OH)<sub>3</sub>). Brenntag Biosector.
5. PBS pH 7,2 0,01M "Dr.Kornstad". Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.

## Tillaging av vaksiner

Blandinger og fortynninger ble utført i LAF-benk og aseptisk teknikk benyttet. Tillaging av vaksiner ble gjentatt før hver vaksinerings. Blandinger og fortynninger ble gjort i sterile plastrør. Sterile kanyler og sprøyter ble brukt for å ta vaksinene ut fra hetteglass. Vaksinene ble fortynnet med utgangsløsning 5 slik at 0,2 ml vaksine inneholdt 1/10 av human dose av vaksinene. Placebovaksinen inneholdt 200 µg aluminiumhydroksid i utgangsløsning 5. Dette tilsvarte mengde aluminiumhydroksid i A+W135 OMV-vaksinen som inneholdt 1:40 protein:Al(OH)<sub>3</sub>. For fullstendig beskrivelse av tillaging av vaksiner, se protokoll i vedlegg 3.

## Immuniseringsoppsett

5-6 uker gamle NMRI-mus fra Taconic ble brukt i forsøket. Musene ble immunisert med 0,2 ml vaksine subkutan. Seks mus ble oppbevart per bur. Merking, immunisering og blodprøvetaking ble utført av Avdeling for dyreforsøk (ADFD) ved FHI. Se tabell 2 for immuniseringsoppsett.

**Tabell 2: Immuniseringsoppsett for museforsøk 2.** Tre grupper á 12 mus fikk enten OMV-vaksine, konjugatvaksine eller polysakkaridvaksine. En gruppe med seks mus fikk placebo med aluminiumhydroksid. Musene fikk to doser med tre ukers mellomrom.

<b>Gr.</b>	<b>Bur</b>	<b>Mus</b>	<b>Vaksiner</b>	<b>Dose per mus per immunisering</b>
1	1-2	12 NMRI	A+W135 OMV vaksine	5 µg protein (2,5µg A + 2,5µg W135)
2	3-4	12 NMRI	A+C+W135+Y konjugatvaksine	1+0,5+0,5+0,5 µg av henholdsvis A+C+W135+Y oligosakkarid
3	5-6	12 NMRI	A+ C+W135+Y polysakkaridvaksine	5+5+5+5 µg av A+C+W135+Y polysakkarid
4	7	6 NMRI	Placebo med Al(OH) <sub>3</sub>	200 µg Al(OH) <sub>3</sub>



**Figur 7: Vaksiner testet i forsøket.** Innpakkingene fra de registrerte vaksinene a) Mencevax® og b) Menveo®.

## 2.5.4 Blodprøvetaking og behandling av blodprøver

Rør til blodprøvetaking ble merket med burnummer og individnummer (1-1 = burnummer 1-individnummer 1). Etter blodprøvetaking ble blodprøvene oppbevart på benk i romtemperatur i minst en time. De ble så sentrifugert med 1600 x g i 10 minutter. Etter sentrifugering ble sera pipetert over i mikrosentrifugerør og merket med gruppe, individ og tappenummer (1-1-1 = gruppe 1-individ 1-tapping 1). Seraene ble oppbevart i fryser i -20 °C.

## 2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Kilder: (61, 62)

### 2.6.1 Prinsipp

Det finnes flere typer ELISA. Indirekte ELISA brukes til å detektere antistoffer i en prøve mot et eller flere antigener. Prøven kan for eksempel være musesera. I denne metoden bruker man flatbunnede mikrotiterplater vanligvis av polystyrenplastikk coatet med det antigenet man er interessert i. Coating er en prosess hvor antigenet adsorberes til plastikkoverflaten som et resultat av hydrofobe interaksjoner mellom ikke-polare proteinstrukturer og plastikken. Prøven man ønsker å undersøke appliseres i brønnene på den coatede platen. Hvis det i prøven finnes antistoffer mot antigenet på platen, vil det skje en binding. Man kaller antistoffene i prøven for primærantistoff. Etter vask av platene tilsettes et sekundært antistoff. Dette er antistoffer produsert i en art, for eksempel kanin, mot immunoglobuliner fra en annen art, for eksempel mus. Hvis prøven man undersøker er sera fra mus, må man bruke et sekundært antistoff spesifikk for immunoglobuliner fra mus (kalt anti-mus). Det sekundære antistoffet brukt i denne oppgaven er konjugert til enzymet alkalisk fosfatase (ALP). Ved tilsetting av ALP-substratet para-nitrofenylfosfat vil det dannes et gulfarget produkt som kan måles i et spektrofotometer. Spektrofotometeret måler absorbansen ("optical density"=OD) til prøven. Desto mer farge man får dannet etter tilsetting av substrat jo høyere OD-verdier registreres, og jo mer primærantistoff har bundet antigenet på platen. Men økningen i OD er ikke alltid lineær proporsjonal med antistoffkonsentrasjon, og det er derfor vanlig å regne om OD-verdier til antistoffkonsentrasjon ved å lage en fortynningsrekke av en standard med kjent konsentrasjon. Standarden må fortynnes slik at

---

man kan definere det lineære området mellom OD-verdier og antistoffkonsentrasjon. Hvis man ikke har en kjent standard kan man på forhånd definere en løsning til å inneholde en viss konsentrasjon enheter (x enheter/ml) og bruke denne som referanse. Det er tidligere vist at kurvetilpasning med en sigmodial fireparametrisk kurve er best egnet til å beskrive sammenhengen mellom antistoffkonsentrasjon og OD. Beregning av antistoffkonsentrasjonen i prøvene blir automatisk regnet ut av et dataprogram.

## 2.6.2 Prosedyre

Det ble gjort både OMV-IgG ELISA og polysakkarid-IgG ELISA (PS-IgG ELISA). Reagenser og fremgangsmåte varierte noe.

### Materialer

Se vedlegg 1.3.

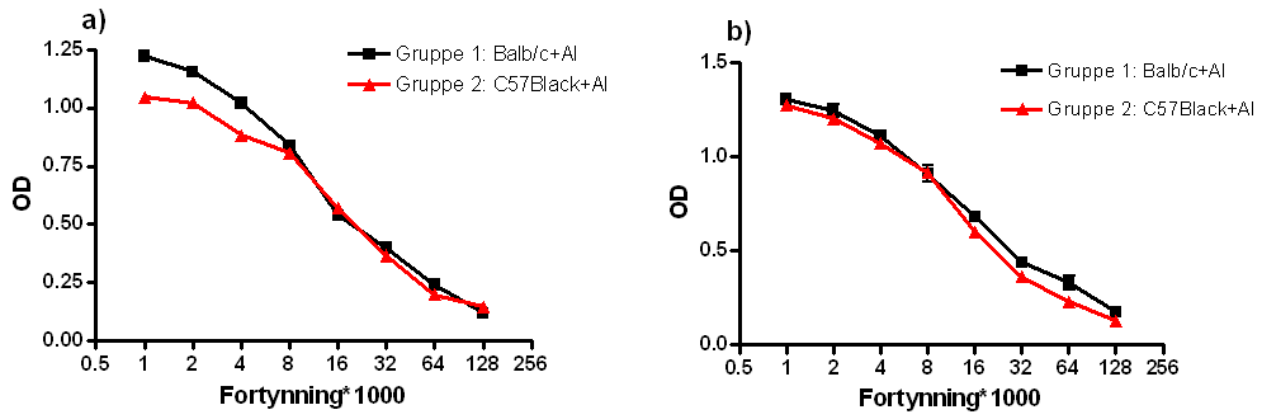
### Fremgangsmåte

#### *OMV-IgG ELISA*

Mikrotiterplater ble coatet med OMV-løsninger fortynnet til 4 µg protein/ml i coatingbuffer. Platene ble inkubert i varmeskap ved  $36 \pm 3$  °C over natt. Deretter ble de oppbevart i kjøleskap til de skulle brukes.

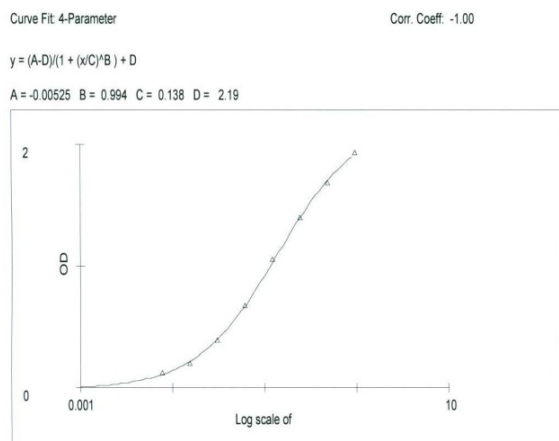
Siden vi ikke hadde et standardserum med kjente konsentrasjoner av IgG, måtte vi lage et referanseserum for å kunne regne om OD-verdier til IgG-respons i enheter/ml. Det var ønskelig å ha et referanseserum med høy IgG-respons. Museforsøk 1 var først ferdig og ble først analysert. Da aluminiumhydroksid er en mye brukt vaksineadjuvans, var det forventet at gruppe 1 og 2 (de to gruppene som fikk OMV-vaksine med aluminiumhydroksid) fra museforsøk 1 skulle gi høyest IgG-respons. Serapool fra disse to gruppene ga like kurver i tofolds-fortynning i serumfortynningsbuffer fra 1:1000 til 1:128000 (figur 8). For å være sikre på å ha nok referanseserum til alle forsøk, ble serapool fra gruppe 1 og 2 kombinert. Gruppe 5 og 6 (placebogruppene) ble også testet og ga ingen respons i 1:100 fortynning og ble senere brukt som negativ kontroll. Referanseserumet ble definert til å inneholde 2000 enheter/ml.





**Figur 8: Fortynningskurver for referansesera til OMV-ELISA.** Punktene på grafene viser medianen for de tre parallellene for hver fortynning. X-aksen viser fortynningen (eks 2=1:2000 fortynning). a) IgG-respons mot serogruppe A OMV. b) IgG-respons mot serogruppe W135 OMV.

Når sera fra de individuelle musene skulle analyseres, ble det for hver mikrotiterplate laget en fortynningsrekke i tre paralleller av referanseserumet med følgende fortynninger 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000, 1:256000. Siden referanseserumet ble definert til å inneholde 2000 enheter/ml var konsentrasjonen i første fortynning (1:2000) 1 enhet/ml. Eksempel på en representativ standardkurve er vist i figur 9.



**Figur 9: Utklipp fra en ELISA-rapport fra programvaren SOFTmax PRO.** Grafen viser standardkurven til referanseserumet som ble brukt på hver plate for utregning av enheter/ml i individuelle musesera.

De individuelle museseraene ble fortynnet i serumfortynningsbuffer til en OD som falt innenfor det lineære området på standardkurven. Serapooler fra alle tappinger fra alle grupper i museforsøkene ble først undersøkt i 2-3 fortynninger for å få et inntrykk av hvor mye de måtte fortynnes. Deretter ble de individuelle seraene analysert i tre paralleller i én fortynning. De seraene som likevel falt utenfor det lineære området måtte fortynnes på nytt

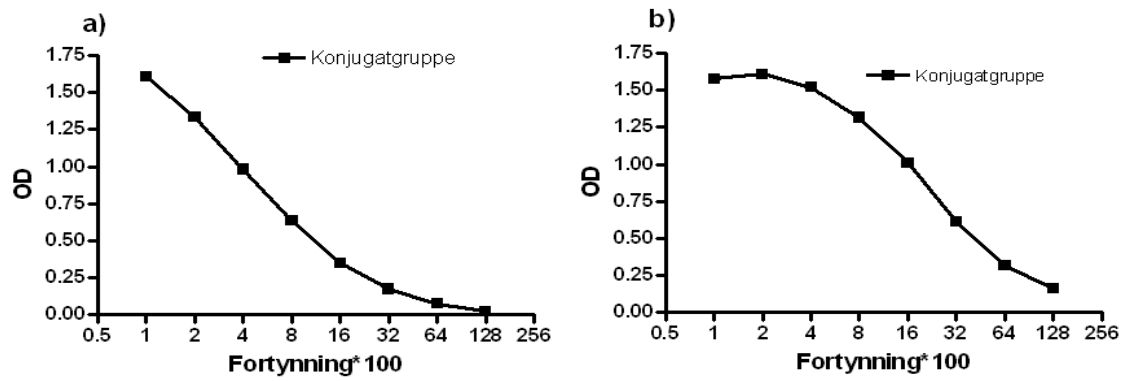
---

og analysen måtte gjentas. Før tilsetning av de enkelte serumfortynninger til hver brønn, ble de coatede platene vasket med ELISA-vaskebuffer i ELISA-vaskeren (Scanwasher 300, Skatron Instruments). Platene ble inkubert med ønskede fortynninger av referanseserum, prøver og negativ kontroll i 2 timer ved  $36 \pm 3$  °C. Etter inkubasjon ble platene vasket i ELISA-vaskeren før de ble inkubert med anti-mus IgG ALP (sekundært antistoff). Det sekundære antistoffet ble fortynnet 1:10000 i serumfortynningsbuffer og deretter applisert i alle brønner og inkubert i 2 timer ved  $36 \pm 3$  °C. Platene ble deretter vasket i ELISA-vaskeren. For å fremkalle en fargereaksjon ble brønnene tilsatt substratløsningen. Subtrattablettene ble først løst i substratbuffer (1 mg substrat/ml). Platene ble inkubert med substratløsningen i romtemperatur til laveste fortynning av referanseserumet viste en OD på 1,8-2,0 (etter ca 30 minutter). OD-verdiene ble lest av i ELISA-avleseren (Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices) ved bølgelengde 405 nm og konsentrasjonene regnet automatisk ut av programvaren (SOFTmax PRO, Molecular Devices).

### *PS-IgG ELISA*

Polysakkarider adsorberes ikke like godt til polystyrenplastikk som proteiner. Coateløsningen inneholder derfor polysakkarider kompleksbundet til metylert humant serumalbumin (mHSA) for å øke bindingsgraden. Det ble laget to coateløsninger, en for serogruppe A polysakkarid og en for serogruppe W135 polysakkarid. Konsentrasjon A polysakkarid var 5 µg PS/ml, mens for W135 1 µg PS/ml. Konsentrasjonen mHSA var henholdsvis 5 µg/ml og 2 µg/ml i A og W135 polysakkaridløsningene. Platene ble inkubert i kjøleskap i minst 2 døgn før bruk.

Seraene fra museforsøk 2 ble analysert i PS-ELISA. I likhet med i OMV-ELISA trengte vi et referanseserum. Som forventet ga serapool fra mus immunisert med konjugatvaksinen høy respons mot både mot A og W135 polysakkarid (figur 10) og ble derfor brukt som referanseserum for analyse av de individuelle seraene. IgG-responsen mot serogruppe W135 polysakkarid trengte høyere fortynning enn serogruppe A polysakkarid for å gi en standardkurve med et lineært område (figur 10b)). Ved analyse av de individuelle seraene ble derfor referanseserum for plater coatet med serogruppe W135 polysakkarid fortynnet i tofolds-fortynning fra 1:2000, mens for platene coatet med serogruppe A polysakkarid ble referanseserumet fortynnet i tofolds-fortynning fra 1:200. Referanseserumet ble definert til å inneholde 2000 enheter/ml.



Figur 10: **Fortynningskurve for referansesera til PS-ELISA.** Punktene på grafene viser medianen for de tre parallellene for hver fortynning. X-aksen viser fortynningen (eks 2=1:200 fortynning). a) IgG-respons mot serogruppe A polysakkarid. b) IgG-respons mot serogruppe W135-polysakkarid.

Prosedyren for PS-ELISA varierte noe fra OMV-ELISA. Coatede plater ble vasket med ELISA-vaskebuffer i ELISA-vaskeren. Etterpå ble platene vasket manuelt med vann, for så å bli inkubert en time i romtemperatur med blokkeringsbuffer med 1 % BSA. Videre ble prøver, sekundært antistoff og substrat tilsatt på samme måte som i OMV-ELISA.

## 2.7 Immunblott

Kilder: (57, 63).

### 2.7.1 Prinsipp

Immunblott (også kjent som Western blott) er en metode som brukes til å detektere antistoffer mot enkeltproteiner adsorbent til en nitrocellulosemembran (NC-membran). Proteinene blir først separert ved SDS-PAGE som beskrevet i kapittel 2.1. Gelen med de separerte proteinene blir så lagt på en NC-membran og plassert i et elektrisk felt. Proteinene som er negativt ladde på grunn av SDS vil overføres til NC-membranen som er plassert nærmest anoden. Etter overføring inkuberes oppskårede striper av NC-membranen med antistoffer rettet mot de proteinene i prøven man ønsker/forventer å detektere. Det kan for eksempel være et monoklonalt antistoff mot ett enkelt protein, eller det kan være sera fra vaksinerte individer som har utviklet antistoffer mot flere proteiner. Disse omtales ofte som primære antistoffer, som i ELISA. For å detektere om det har oppstått binding mellom proteiner og antistoffer bruker man et sekundært antistoff som vil binde det primære antistoffet. I likhet med det sekundære antistoffet i ELISA, binder også dette til primære

---

antistoffer fra en spesifikk art. Dersom man undersøker IgG-innholdet i sera fra mennesker, må man bruke et anti-human IgG. Det sekundære antistoffet er i denne oppgaven konjugert til enzymet pepperrot peroksidase ("horseradish peroxidase"=HRP). Ved tilsetting av et HRP-substrat og hydrogenperoksid som oksidasjonsmiddel vil man få en synlig fargeforandring. Her brukes 3-amino-9-etylcarbazol (AEC) som gir rød utfelling ved enzymatisk omdannelse av HRP på stedet hvor primærantistoffet har bundet proteinet.

## 2.7.2 Prosedyre

### Materialer

Se vedlegg 1.4.

### Fremgangsmåte

Immunblottutstyr fra Bio-Rad ble brukt i forsøket (Mini Trans-Blot Module). Geler med OMV ble laget ved SDS-PAGE (kapittel 2.1). Mens elektroforesen pågikk, ble nitrocellulosemembran, filterpapir og fiberputer bløtlagt i transferbuffer. Når elektroforesen var ferdig ble gelene overført til karet med transferbuffer. Pakking i transferholder ble gjort i følgende rekkefølge: klar plate i transferholder, fiberpute, filterpapir, NC-membran, gel, filterpapir, fiberpute, svart plate i transferholder. Transferholder ble lukket og montert i elektrodestativet. Elektrodestativet og kjøleelementet ble plassert i bufferkammeret fylt med transferbuffer. NC-membranen lå da nærmest anoden (+ pol) og de negativt ladde SDS-proteinkompleksene mot katoden (- pol). Spenningen var 100 volt og etter en time ble transferholderen tatt ut. En blyantstrek ble tegnet rundt gelen på NC-membranen. For å redusere uspesifikk binding ble NC-membranen blokkert med 3 % BSA i PBS i 30 minutter. NC-membranen ble skåret i striper og hver stripe inkubert på ristebord over natt med primært antistoff fortynnet i 3 % BSA i PBS. Musesera fra museforsøk 1 ble testet i serumfortynning 1:200. Monoklonale antistoffer ble brukt som referanser, fortynning av de enkelte er oppgitt i vedlegg 1.3. Visse monoklonale antistoffer (anti-PorB) er avhengige av delvis renaturering av proteinene i membranen for binding. Disse monoklonale antistoffene ble derfor tilsatt detergenten Empigen-BB. Det ble også gjort et forsøk hvor musesera fra museforsøk 1 ble inkubert med og uten Empigen-BB. Dagen etterpå ble stripene vasket med PBS, tilsatt anti-mus IgG HRP (sekundært antistoff) fortynnet 1:10000 i 3 % BSA i PBS og inkubert på ristebord i 2 timer. Deretter ble stripene vasket med PBS, og én gang natriumacetatbuffer for å senke pH. Stripene ble så mettet med 1 % AEC fortynnet 1:25 i

natriumacetatbuffer. Til slutt ble 30 % hydrogenperoksid satt til og rødfarge dukket opp innen 15 minutter. Etter farging ble stripene skylt i vann, tørket og fotografert.

## 2.8 Serumbaktericid analyse (SBA)

Kilder: (30, 64)

### 2.8.1 Prinsipp

Mens ELISA (kapittel 2.6) kvantiterer antistoffene som binder et antigen, kan man med SBA måle nivå av funksjonelle antistoffer i sera. Det er vist at høy respons i SBA, det vil si høye nivåer av baktericide antistoffer i sera, korrelerer med beskyttelse mot meningokokksykdom. Metoden baserer seg på at bakterien lyseres i nærvær av spesifikke antistoffer i testserum og eksternt komplement (= antistoffmediert, komplementavhengig drap). Man teller kolonier som vokser opp etter inkubasjon med bakterier, sera og eksternt komplement. Responsen oppgis som titer. Titer oppgis vanligvis som den resiproke serumfortynningen som gir  $\geq 50\%$  drap sammenlignet med antall kolonier tilstede i kontrollen (cutoff-verdien).

### 2.8.2 Prosedyre

#### Materialer

Se vedlegg 1.5.

#### Fremgangsmåte

Alt arbeid med levende meningokokker foregikk i eget rom beregnet for arbeid med levende bakterier, i sikkerhetsbenk og med verneutstyr. Arbeidet foregikk sammen med Lisa Nome ved Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi ved FHI. Meningokokkene ble tatt opp av fryser (- 70 °C), sådd ut på blodagarskåler og inkubert over natt ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Dagen etter ble kolonier sådd ut på en ny plate og inkubert i fire timer ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

Bakterieløsning ble laget ved å resuspendere en bakteriekoloni i HBSS (Hanks balanced salt solution). Bakteriesuspensjonen ble justert med HBSS til en OD<sub>650</sub> på 0,1. Bakteriesuspensjonen ble så fortynnet til ønsket konsentrasjon kolonier per ml, fortynningen

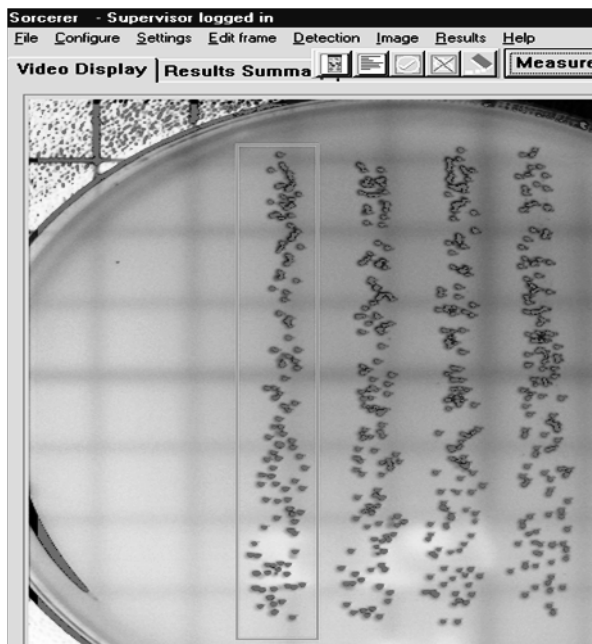
varierte for de enkelte bakteriestammene. Brønner i kolonne 1-11 i en rundbunnet mikrotiterplate ble fylt med 20 µl HBSS, kolonne 12 ble fylt med 10 µl (figur 11). Sera fra mus immunisert med en og to doser OMV-vaksine, konjugatvaksine eller polysakkaridvaksine (museforsøk 2) ble inaktivert ved 56 °C i 30 minutter (for å hindre at musenes eget komplement påvirket resultatet) og preforynnet 1:16 i HBSS. 20 µl forfynnet musesera ble tilsatt brønner i kolonne 1 (figur 11) og videre tofolds-forynnet fra kolonne 1 til 9. Så ble aktivt eller inaktivt eksternt komplement og bakterieløsning tilsatt som vist i figur 11. Det vil si at serumforynning i kolonne 1 var 1:64 i stedet for 1:4 (siden musesera preforynnet 1:16 ble forfynnet 1:4 i første kolonne). Det var plass til åtte sera per plate (ett serum per rad). Kolonne 10 var en kontroll på at eksternt komplement alene ikke forårsaker drap. Kolonne 11 (T60) viste hvor mange kolonier som vokste opp uten påvirkning fra eksternt komplement og musesera; denne ble brukt til å regne ut cutoff-verdien. Kolonne 12 var en kontroll på at det ikke var annet enn komplement i musesera som påvirket veksten.

Reagens (µL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11(T60)	12
HBSS	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
Serum, Varmeinaktivert	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	8 x tofolds serumforynning Titrer med 20 µL fra kolonne 1 til og med 9, resuspender godt, kast 20 µL fra kolonne 9											
Bakterie suspensjon	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Komplement	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0
Varmeinaktivert komplement	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10
Total volum	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Sluttfortynning av serum	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024			

*Figur 11: Oversikt over innholdet i én rad i mikrotiterplaten. Tallene angir antall µl tilsatt per brønn. Det er åtte slike rader i mikrotiterplaten og dermed plass til åtte sera per plate. Seraene ble preforynnet 1:16. Derfor ble sluttfortynningen i kolonne 1 1:64 i stedet for 1:4 som vist i figuren.*

Mikrotiterplatene ble inkubert i 37 °C i en time (derav T60 = tid 60.). Med ”tilt-metoden” ble det påført 10 µl fra hver brønn til blodagarskåler (påsatte 10 µl øverst på skålen for så å vippe/tilte skålen slik at det påsatte volumet rant nedover og lagde en stripe av bakteriekolonier som kan telles som i figur 12). Seks og seks brønner ble sådd ut i skålene, slik at det ble to blodagarplater per sera/rad. Alle brønner fra kolonne 11 (T60) ble også sådd ut på to ekstra agarskåler. Platene ble inkubert over natt ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Dagen

etterpå ble antall kolonier fra hver brønn i kolonne 11 (T60) talt ved hjelp av elektronisk koloniteller (Sorcerer colony counter versjon 2.2, Perceptive Instruments) og gjennomsnittet regnet ut. Cutoff-verdien ble definert som 50 % av gjennomsnittet av T60. Titeret for hvert serum ble oppgitt som den siste resiproke fortynningen som ga flere kolonier enn cutoff-verdien. Derfor var det viktig at seraene var fortynnet slik at man kunne se ved hvilken fortynning antall kolonier gikk fra under til over cutoff-verdien. Noen av seraene var så ”sterke” at de måtte analyseres på nytt med en høyere prefortynning. Det er vanlig å bruke positive og negative kontroller for å kontrollere at systemet virker som det skal.



Figur 12: *Bilde av en agarskål slik kolonitelleren ”ser” skålen”. Hver stripe med kolonier kommer fra én brønn i mikrotiterplaten.*

## 2.9 Opsonofagocytose (OPA)

Kilder: (65, 66)

### 2.9.1 Prinsipp

I SBA (beskrevet i kapittel 2.8) måler man baktericide antistoffer som vi vet er beskyttende mot meningokokksykdom. En annen måte antistoffer kan beskytte oss mot meningokokker på, er ved opsonofagocytose. Antistoffer som gjenkjenner meningokokken fungerer som opsoniner og trekker til seg effektorceller (granulocytter og makrofager) i det medfødte immunforsvaret. Antistoffer vil også kunne aktivere komplementsystemet gjennom klassisk

aktivering. Komplement- og Fc-reseptorer på granulocytter vil gjenkjenne bakterien, og på denne måten gjøre fagocytosen lettere. Etter fagocytosen vil granulocytten produsere reaktive oksygenprodukter, for eksempel hydrogenperoksid, som dreper bakterien. Denne prosessen kalles ”respiratorisk burst” (RB). RB kan detekteres ved å benytte dihydrorhodamin 123 (DHR). DHR omdannes til det fluorescerende stoffet rhodamine 123 ved tilstedeværelse av blant annet hydrogenperoksid. Ved bruk av flowcytometri kan man registrere prosentandel granulocytter som har blitt aktivert til RB. Man regner ut hvor mange prosent av granulocytterne som har en fluorescens høyere enn negativkontrollene. I disse granulocytterne regner man med at det har foregått RB. Høyeste resiproke serumfortynning som gir  $\geq 50\%$  RB oppgis her som titer. Det vil si at desto høyere titer, desto høyere verdier av opsoniserende antistoffer i serum og man kan være bedre beskyttet mot sykdom. Fordi en av Fc-reseptorene (Fc $\gamma$ RIIa) finnes i to varianter med forskjellig affinitet for IgG-subklasser, brukes det effektorceller fra donor som er heterozygot for denne reseptoren.

## 2.9.2 Prosedyre

### Materialer

Se vedlegg 1.5.

### Fremgangsmåte

Alt arbeid med levende meningokokker foregikk i eget rom beregnet for arbeid med levende bakterier, med verneutstyr og så langt som mulig i sikkerhetsbenk. Arbeidet ble gjort sammen med Audun Aase ved Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi. Dagen før analysen sådde Lisa Nome ut meningokokkene på blodagarskåler. Skålene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> over natt.

Sera fra mus vaksinert med to doser konjugat- eller OMV-vaksine (fra museforsøk 2) ble fortynnet 1:20 med HBSS til totalt 200  $\mu$ l i første rad i en rundbunnet mikrotiterplate. Som positiv kontroll for de to serogruppene ble monoklonale antistoffer mot den enkelte serogruppes PorA (P1.9 og P1.2 for henholdsvis serogruppe A og W135) brukt. Som negativ kontroll ble det brukt sera fra placebomus. De fortyndede serumløsningene ble fortynnet videre på platen i tofolds-fortynningsrekke, slik at hver kolonne i brønnen inneholdt sera fra én mus fortynnet fra 1:20 til 1:2560 (åtte brønner per kolonne). 50  $\mu$ l av hver brønn ble så overført til et nytt brett, slik at man til slutt hadde to identiske brett, et til brukt for



serogruppe A og et for W135. To brønner per brett inneholdt bare HBSS som blank prøve. Det ble laget en bakterieløsning ved å skrape av bakteriekolonier og vaske bakteriene med HBSS i en sentrifuge. Bakterieløsningen ble så justert med HBSS til en  $OD_{650}$  på 0,7. Alle brønnene ble tilsatt 5  $\mu$ l bakterieløsning. Platene ble inkubert i 45 minutter ved 37 °C på ristepate. Humant serum ble brukt som ekstern komplementkilde. For å fjerne IgG-antistoffer hos komplementkilden ble sera presset gjennom en proteinG-søyle. For å skaffe effektorceller til metoden ble det tappet blod fra donor som er heterozygot for Fc $\gamma$ RIIa (samme donor som komplementkilden). For å lysere erytrocyttene, men beholde granulocytter ble det tilsatt en lyseringsløsning i 3-7 minutter. Da erytrocyttene var hemolysert ble suspensjonen spunnet ned slik at effektorcellene ble liggende på bunn. Supernatanten ble fjernet, og effektorcellene ble vasket med HBSS. Etter at bakterieløsningen var inkubert i 45 minutter, ble hver brønn tilsatt 5  $\mu$ l rensert komplementserum og inkubert i 10 minutter ved 37 °C på ristepate. Et minutt før effektorcellene skulle brukes ble effektorcelleløsningen tilsatt dihydrorhodamin 123. 5  $\mu$ l av effektorcellene med dihydrorhodamin ble applisert i brønnene og inkubert i nye 10 minutter ved 37 °C

Etter endt inkubasjon ble innholdet i hver brønn analysert i flowcytometeret (CyFlow ML space, Partec). Prøvene ble registrert som % granulocytter som hadde en fluorescens høyere enn blank prøve. Høyeste resiproke serumfortynning som ga  $\geq 50$  % RB ble oppgitt som titer.

## 2.10 Statistiske metoder

Programmet GraphPad Prism versjon 4 ble brukt for konstruering av grafer og utregninger. For utregning av signifikans og korrelasjon ble det brukt ikke-parametriske tester fordi vi antok at dataene ikke var normalfordelte. I slike tester blir verdiene rangert fra laveste til høyeste og gitt et tall. Analysen baser seg på distribusjonen av rangeringene. Statistisk signifikans ble definert som  $p < 0,05$ . Statistisk signifikante forskjeller omtales heretter som signifikante forskjeller. Ved sammenligning av data fra før og etter en intervensjon i samme individ, ble testen Wilcoxon Signed Rank brukt. Testen Mann-Whitney ble brukt for å sammenligne data mellom forskjellige individer. For å undersøke korrelasjoner ble Spearman korrelasjonstest brukt.

---

## 3. Resultater

### 3.1 Karakterisering av A+W135 OMV-vaksine

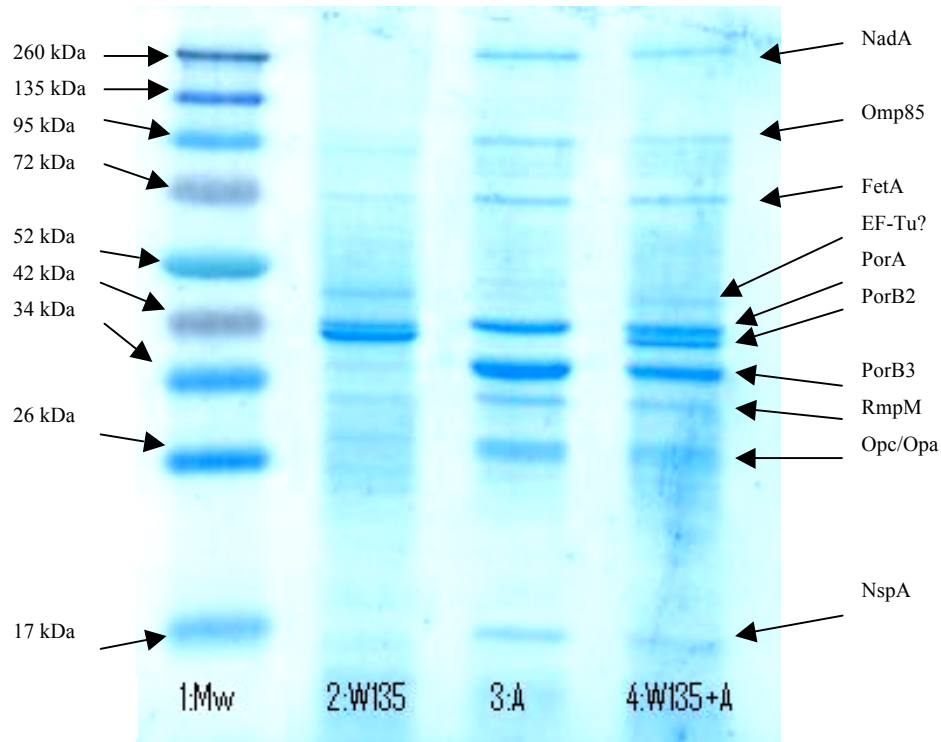
#### 3.1.1 Proteinkarakterisering

For å identifisere hvilke proteiner som er tilstede i vaksinen ble OMV fra serogruppe A stamme Mk499/03 og serogruppe W135 stamme Mk222/02 analysert i SDS-PAGE. Gelen ble deretter farget med Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB). Proteinene ble videre identifisert med monoklonale antistoffer i immunblott (kapittel 3.2.2).

Figur 13 viser den CBB-fargede gelen. OMV fra serogruppe A (brønn nr. 3 i figur 13) inneholdt et kraftig bånd som ble identifisert som PorA (42-45 kDa) og PorB3 (37-39 kDa). To svakere bånd ble observert i området til RmpM (33-34 kDa) og Opc (26-30 kDa). Proteinene NspA ligger i området rundt 17kDa og det høymolekylære proteinet NadA gir et bånd høy oppe på gelen. Det ble også observert andre proteinbånd rundt 70-90 kDa. I dette området ligger blant annet proteinene FetA og Omp85.

OMV fra serogruppe W135 (brønn nr. 2 i figur 13) inneholdt proteiner i PorA- og PorB2-området. PorB2 (40-42 kDa) ligger like under PorA i molekylvekt og gelen viste to tette bånd i dette området. Svake bånd kunne observeres i RmpM-området og rundt 70-90 kDa. Det ble observert et bånd over PorA. Ferske massespektroskopi analyser (utført av Bernd Thiede, Bioteknologisenteret, UiO) indikerte at dette trolig er proteinet elongation factor-Tu (EF-tu).

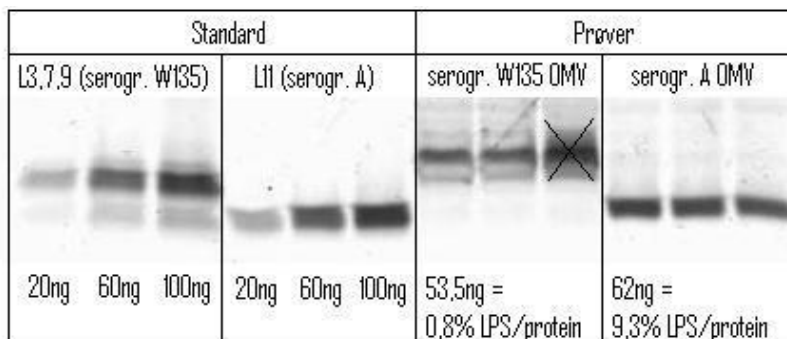
Figur 13 viser også blandingen av de to OMV-løsningene (brønn nr. 4).



**Figur 13: Gel farget med Coomassie Brilliant Blue G250.** Brønn 1: Molekylvektstandard med proteiner med tilhørende molekylvekter. Brønn 2: OMV fra serogruppe W135 stamme Mk222/02. Brønn 3: OMV fra serogruppe A stamme Mk499/03. Brønn 4: Blanding av serogruppe A og W135 OMV.

### 3.1.2 LPS-kvantitering

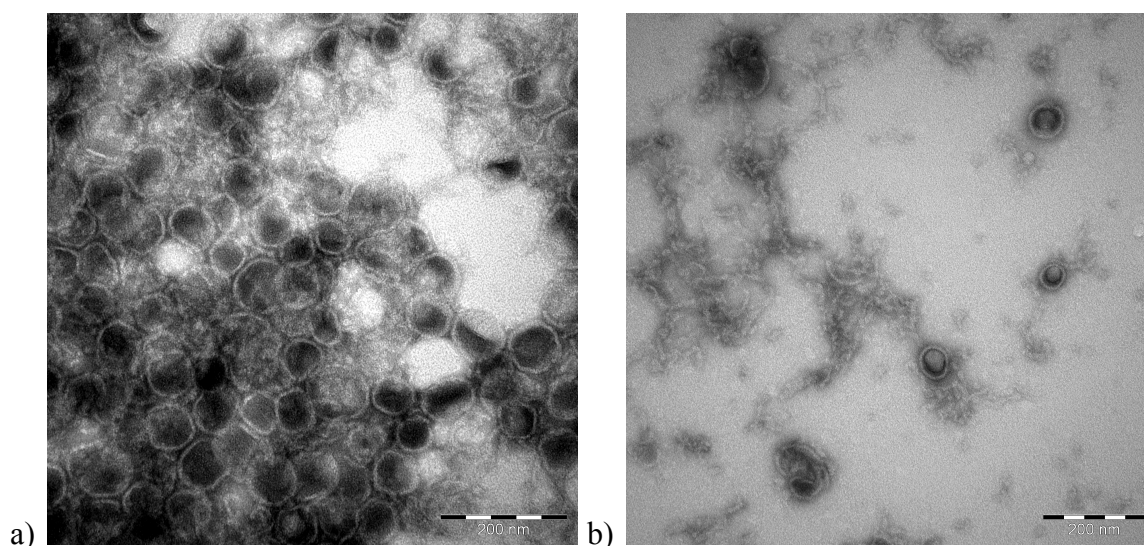
For å kvantitere mengde LPS ble OMV fra serogruppe A og W135 analysert med SDS-PAGE og sølvfarget (figur 14). Gjennomsnittet for L11-båndene i prøven fra A OMV ble beregnet til 62 ng som tilsvarer 9,3 % LPS/protein. Gjennomsnittet for to av L3,7,9-båndene til prøven fra W135 OMV ble beregnet til 53,5 ng, som tilsvarer 0,8 % LPS/protein.



**Figur 14: Sølvfarget LPS i gel med OMV-løsninger.** L3,7,9 ble brukt som standard for serogruppe W135 OMV. L11 ble brukt som standard for serogruppe A OMV. En av tre paralleller i serogruppe W135 OMV ble ekskludert (merket med kryss i figuren).

### 3.1.3 Elektronmikroskopi

Elektronmikroskopibilder av OMV fra serogruppe A stamme Mk499/03 viste mange hele vesikler (figur 15a)), mens OMV fra serogruppe W135 stamme Mk222/02 viste få hele vesikler. Man kunne se tilstedeværelse av membranflak som kan tyde på ødelagte vesikler (figur 15b)). Vesiklene fra serogruppe A OMV hadde en diameter på rundt 100 nm.



*Figur 15: Elektronmikroskopibilder av OMV negativt farget med uranylacetat. a) OMV fra serogruppe A stamme Mk499/03 b) OMV fra serogruppe W135 stamme Mk222/02. Målestokken er 200 nm på begge bildene.*

## 3.2 Immunogenisitetsstudier av A+W135 OMV-vaksine med og uten adjuvans i to musestammer

Antistoffrespons i sera fra Balb/c- og C57Black-mus ble studert etter immunisering med 1, 2 og 3 doser med 4+4 µg protein/dose av A+W135 OMV-vaksine med og uten aluminiumhydroksid ved hjelp av ELISA og immunblott.

### 3.2.1 OMV-IgG ELISA

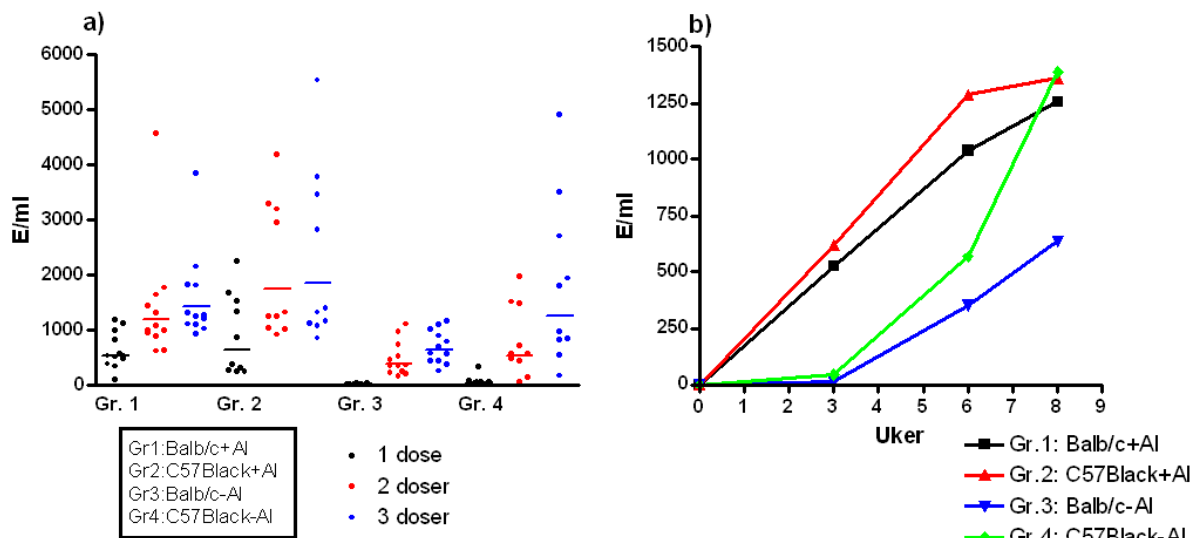
#### IgG-respons i mus mot serogruppe A OMV

Se tabell 3 for oversikt over gruppene og ELISA-resultater gitt med geometrisk gjennomsnitt og 95 % konfidensintervall og figur 16 for grafer.

**Tabell 3: IgG-nivåer i alle grupper testet mot serogruppe A OMV. Resultatene er oppgitt i enheter/ml med geometrisk gjennomsnitt og 95 % konfidensintervall.**

Musegr.	Musestamme	Vaksine	0 uker	3 uker (etter 1.dose)	6 uker (etter 2.dose)	8 uker (etter 3.dose)
1	Balb/c	OMV+Al	<5	532 (344-823)	1196 (850-1683)	1437 (114-1854)
2	C57Black	OMV+Al	<5	646 (341-1226)	1740 (1143-2646)	1844 (1156-2941)
3	Balb/c	OMV-Al	<5	12 (7-19)	394 (265-585)	631 (467-851)
4	C57Black	OMV-Al	<5	37 (17-82)	525 (238-1157)	1262 (620-2565)
5	Balb/c	Placebo	it	It	it	<5
6	C57Black	Placebo	it	It	it	<5

it=ikke testet. Al=aluminiumhydroksid. <5=verdier for lave for standardkurven definert til tilnærmet ingen respons



**Figur 16: IgG-respons mot serogruppe A OMV i alle grupper. a) Scatterplot over responsen i individuelle mus med geometrisk gjennomsnitt. b) Punktene på kurvene viser medianen for responsen til de individuelle mus.**

*Forskjell i IgG-respons mellom dose 1, 2 og 3:*

Forskjell i respons mellom første og andre dose var signifikant for alle gruppene ( $p=0,005$ ,  $0,01$ ,  $0,005$  og  $0,002$  for hhv. gruppe 1, 2, 3 og 4). Når det gjelder forskjell i respons mellom andre og tredje dose, var det bare i gruppe 4 hvor denne var signifikant forskjellig ( $p=0,02$ ). Gruppe 1, 2, og 3 responderte også høyere fra andre til tredje dose, men økningen var ikke

---

signifikant. Selv om det i dette forsøket ble brukt innavlede mus, kunne man likevel se stor variasjonen mellom musene i hver gruppe (figur 16a)).

*Forskjell i IgG-respons mellom musestammene:*

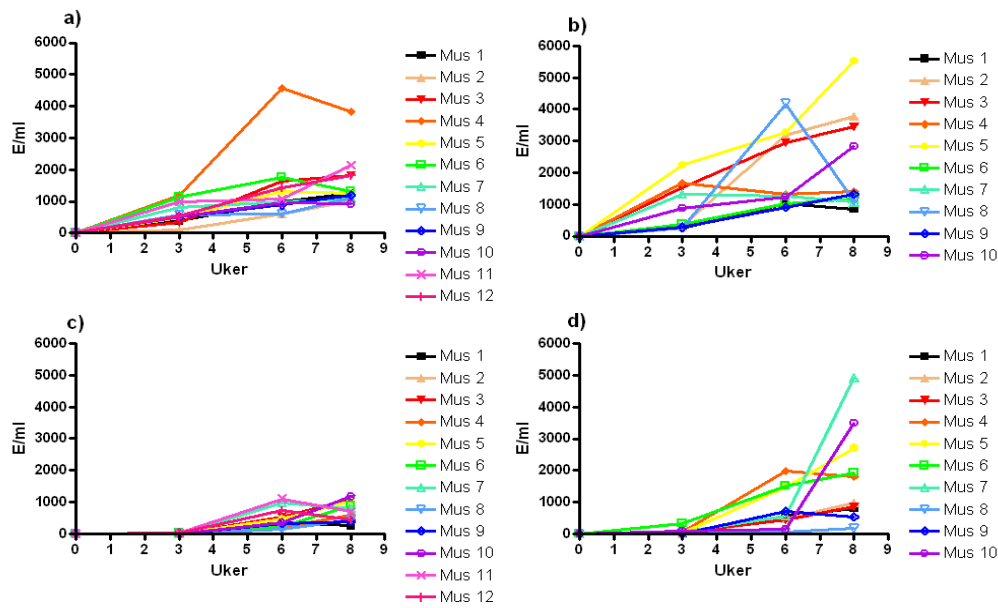
Det var ingen signifikant forskjell mellom respons i Balb/c og C57Black immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid (gruppe 1 og 2). Balb/c og C57Black immunisert med vaksine uten aluminiumhydroksid (gruppe 3 og 4) responderte signifikant forskjellig ( $p=0,01$ ) etter første dose, dette var i favør C57Black, men IgG-responsen var lav (figur 16). Etter to og tre doser var det ikke signifikant forskjell mellom Balb/c og C57Black immunisert med vaksine uten aluminiumhydroksid (gruppe 3 og 4).

*Forskjell i IgG-respons etter immunisering med og uten aluminiumhydroksid:*

Mus immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid responderte relativt høyt allerede etter første dose, mens det ble detektert liten eller ingen respons i sera fra mus som ikke fikk aluminiumhydroksid (figur 16). Balb/c immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid responderte signifikant høyere enn Balb/c immunisert med vaksine uten aluminiumhydroksid, ( $p=0,0001$ ,  $0,0007$ ,  $0,0002$  for hhv. dose 1, 2 og 3). Dette gjaldt også for C57Black ved første ( $p=0,0001$ ) og andre dose ( $p=0,0147$ ). Etter tredje dose responderte C57Black som ikke fikk aluminiumhydroksid like høyt som C57Black som fikk aluminiumhydroksid.

*Antistoffdannelsen til de individuelle mus*

Figur 17 viser hvilke mus som skilte seg fra resten av gruppen. Man kan også se at hos noen mus sank antistoffnivået etter tredje dose sammenlignet med nivået etter andre dose.



**Figur 17: Antistoffkinetikken i de individuelle mus mot serogruppe A.** Musene ble immunisert med første dose i uke 0, andre dose i uke 3 og tredje dose i uke 6. I uke 8 ble siste blodprøve tatt. a) Gruppe 1: Balb/c+Al. b) Gruppe 2: C57Black+Al. c) Gruppe 3: Balb/c-Al. d) Gruppe 4: C57Black-Al.

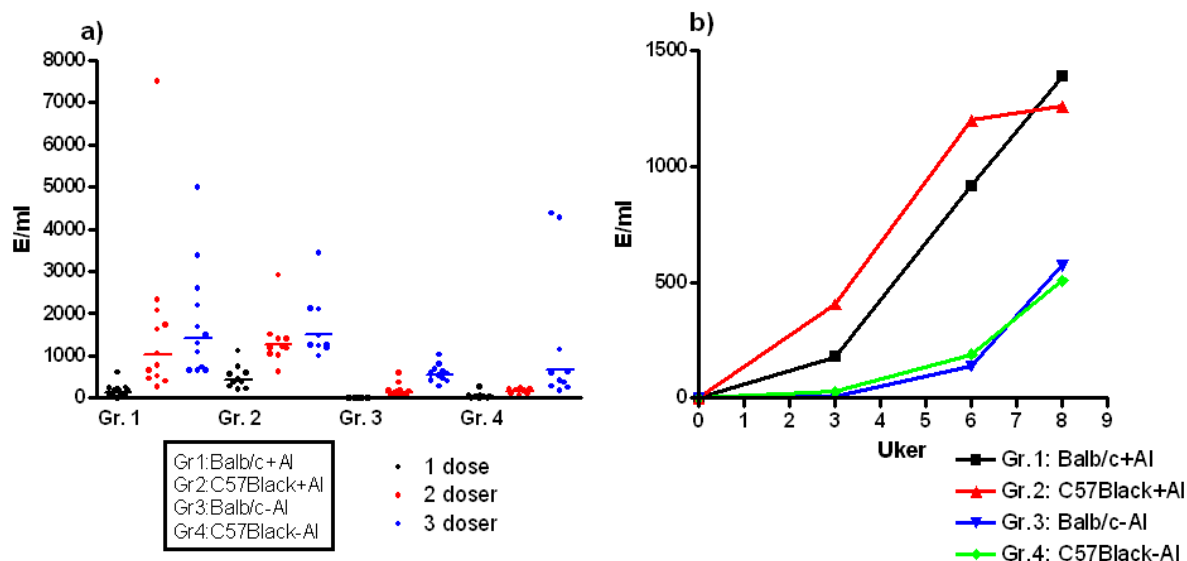
### IgG-respons i mus mot serogruppe W135 OMV

Se tabell 4 for oversikt over gruppene og ELISA-resultater gitt med geometrisk gjennomsnitt og 95 % konfidensintervall og figur 18 for grafer. Det var stort sett lignende responser mot serogruppe A og W135 OMV.

**Tabell 4: IgG-nivåer i alle grupper testet mot serogruppe W135 OMV.** Resultatene er oppgitt i enheter/ml med geometrisk gjennomsnitt og 95 % konfidensintervall.

Musegruppe	Musestamme	Vaksine	0 uker	3 uker (etter 1.dose)	6 uker (etter 2.dose)	8 uker (etter 3.dose)
1	Balb/c	OMV+Al	<5	122 (58-256)	1025 (563-1865)	1423 (918-2206)
2	C57Black	OMV+Al	<5	430 (289-632)	1254 (950-1656)	1517 (1159-1986)
3	Balb/c	OMV-Al	<5	5 (5-5)	128,4 (75-220)	550 (442-685)
4	C57Black	OMV-Al	<5	23 (10-52)	152 (107-215)	658,8 (296-1469)
5	Balb/c	Placebo	it	lt	it	<5
6	C57Black	Placebo	it	lt	it	<5

it=ikke testet. Al=aluminiumhydroksid. <5=verdier for lave for standardkurven definert til tilnærmet ingen respons.



**Figur 18: IgG-respons mot serogruppe W135 OMV i alle grupper.** a) Scatterplot over responsen i individuelle mus med geometrisk gjennomsnitt. b) Punktene på grafen viser medianen for responsen til de individuelle mus.

#### *Forskjell i IgG-respons mellom dosene:*

Forskjell i respons mellom første og andre dose var også mot W135 OMV signifikant for alle gruppene ( $p=0,0005$ ,  $0,004$ ,  $0,0005$  og  $0,006$  for hhv. gruppe 1, 2, 3 og 4). Gruppe 3 og 4 responderte signifikant høyere fra andre til tredje dose ( $p=0,0005$  og  $0,002$ ). Gruppe 1 og 2 responderte også høyere fra andre til tredje dose, men økningen var ikke signifikant.

#### *Forskjell i IgG-respons mellom musestammene:*

C57Black responderte signifikant høyere enn Balb/c etter første immunisering. Ellers var det ikke signifikante forskjeller mellom de to musestammene (figur 18).

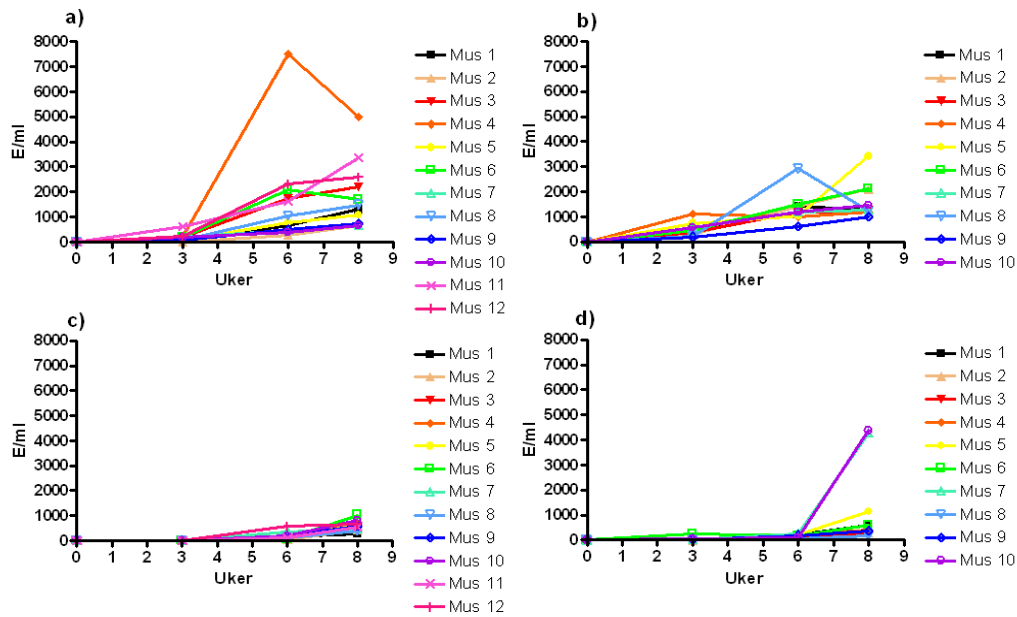
#### *Forskjell i IgG-respons etter immunisering med og uten aluminiumhydroksid:*

Mus immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid responderte høyt allerede etter første dose, mens det ble detektert liten eller ingen respons i sera fra mus som ikke fikk aluminiumhydroksid (figur 18). Det var signifikant høyere respons i gruppene som fikk vaksine med aluminiumhydroksid sammenlignet med de som fikk vaksine uten.

#### *Antistoffdannelsen til den individuelle mus:*

Ved å sammenligne figur 19 med figur 17 kan man se at flere av musene hadde lignende antistoffkinetikk mot serogruppe A og W135 OMV, for eksempel mus 3 i gruppe 1.



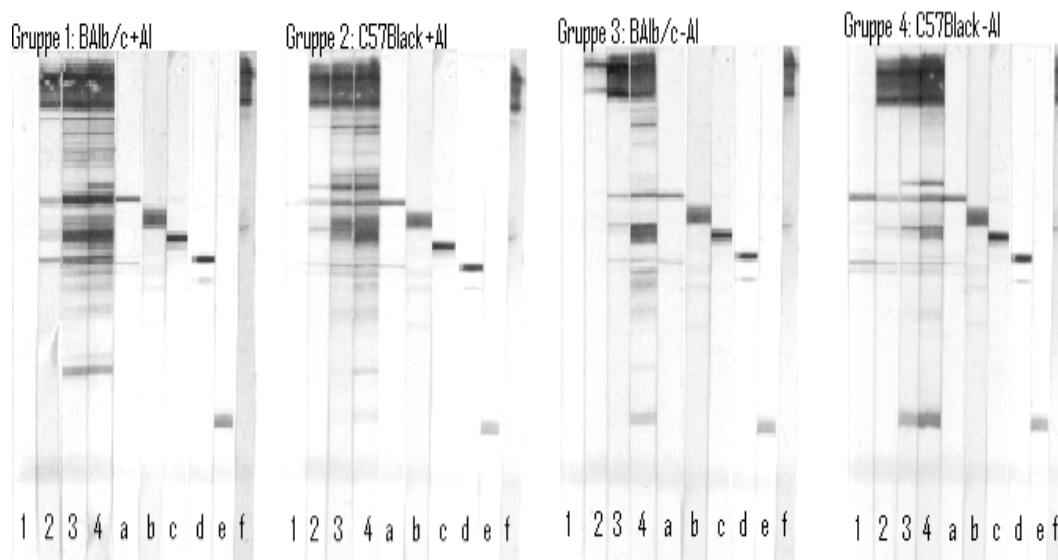


Figur 19: Antistoffkinetikken i de individuelle mus mot serogruppe W135. Musene ble immunisert med første dose i uke 0, andre dose i uke 3 og tredje dose i uke 6. I uke 8 ble siste blodprøve tatt. a) Gruppe 1: Balb/c+AI. b) Gruppe 2: C57Black+AI. c) Gruppe 3: Balb/c-AI. d) Gruppe 4: C57Black-AI.

### 3.2.2 Immunblott

#### IgG-respons mot enkeltproteiner i serogruppe A OMV

Bilde av resultatene fra serapooler er vist i figur 20.



Figur 20: Immunblott med serogruppe A OMV. Stripe 1, 2, 3 og 4 viser første, andre, tredje og fjerde blodprøve av gruppene. Stripe a, b, c, d, e og f er inkubert med monoklonale antistoffer mot hhv. PorA, PorB, RmpM, Opc, LPS og NadA.

---

Alle gruppene utviklet antistoffer mot PorA og NadA. Det ser også ut som om alle responderte mot RmpM og Opc, selv om båndet for Opc i gruppe 2, 3 og 4 er svakt. Det var ikke alle gruppene som responderte mot PorB. Gruppe 3 og 4 har ingen bånd i dette området. Siden PorB er en konformasjonepitop, kan det imidlertid bety at det ved hjelp av en detergent kan påvises en eventuell respons. Se forsøk med og uten detergent (figur 22). Gruppe 1 og 2 utviklet antistoffer mot mange høymolekylære proteiner.

*Forskjell i IgG-respons mellom dosene:*

I likhet med ELISA-resultatene for gruppe 1 og 2, ser det ut som om dannelsen av antistoffer økte mest fra første til andre dose (fra stripe nummer 2 til 3 i figur 20), mens forskjellen fra andre til tredje dose ikke var like stor.

*Forskjell i IgG-respons mellom musestammene:*

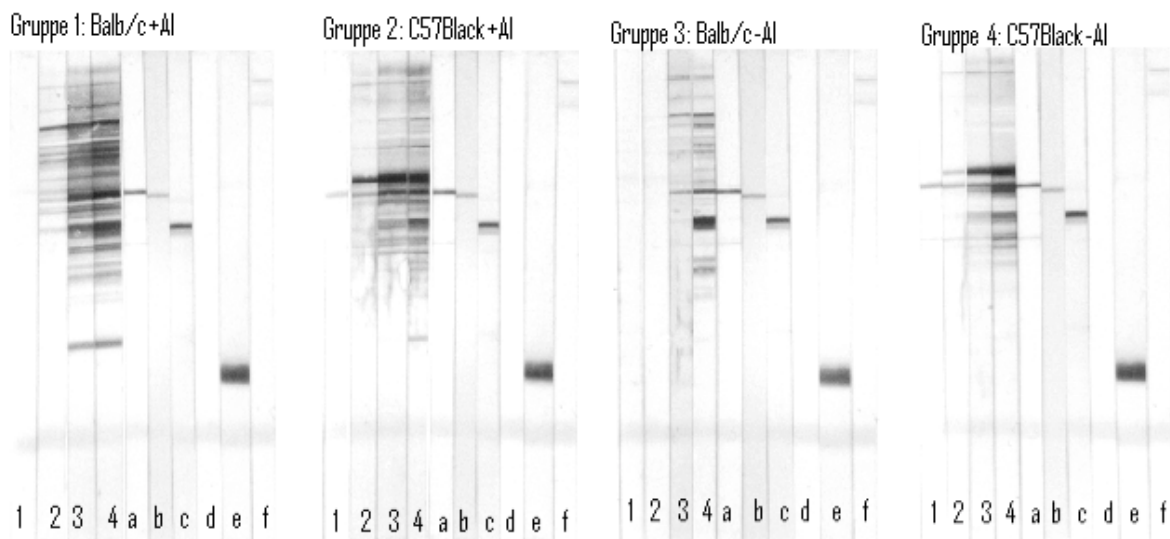
Det var ikke lett å se forskjell mellom musestammene. Gruppe 4 (C57Black) ser ut til å ha noen antistoffer, blant annet mot PorA, før forsøket startet (stripe 1 i figur 20). Like over PorAs posisjon kan man spesielt i gruppe 2 og 4 (C57Black) se et bånd, som dukket opp etter første dose i gruppe 2 og etter andre dose i gruppe 4. Dette er antistoffer mot EF-Tu, og det kan se ut som om proteinet er spesielt immunogent i C57Black sammenlignet med Balb/c som hadde lite eller ingen respons mot dette proteinet.

*Forskjell i IgG-respons etter immunisering med og uten aluminiumhydroksid:*

Mus immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid (gruppe 1 og 2) utviklet antistoffer mot flere proteiner enn gruppene som fikk vaksine uten aluminiumhydroksid (gruppe 3 og 4). Gruppene som ikke fikk aluminiumhydroksid utviklet antistoffer mot LPS (figur 20).

## IgG-respons mot enkeltproteiner i serogruppe W135 OMV

Bilde av resultatene fra serapooler er vist i figur 20.



**Figur 21: Immunblott med serogruppe W135 OMV.** Stripe 1, 2, 3 og 4 viser første, andre, tredje og fjerde blodprøve av gruppene. Stripe a, b, c, d, e og f er inkubert med monoklonale antistoffer mot hhv. PorA, PorB, RmpM, Opc, LPS og NadA.

Alle gruppene utviklet antistoffer mot PorA og RmpM. Det var ingen respons mot Opc i musesera eller referansen. Når det gjelder PorB er det vanskelig å se siden båndet ligger tett opp til PorA, se forsøk med og uten detergent og figur 22. Gruppe 1 og 2 utviklet antistoffer mot mange høymolekylære proteiner. Ingen av gruppene utviklet antistoffer mot LPS.

### *Forskjell i IgG-respons mellom dosene:*

I likhet med ELISA-resultatene for gruppe 1 og 2, ser det ut som om dannelsen av antistoffer økte mest fra første til andre dose (fra stripe nummer 2 til 3 i figur 21). I gruppe 3 og 4 var det også stor økning fra andre til tredje dose.

### *Forskjell i IgG-respons mellom musestammene:*

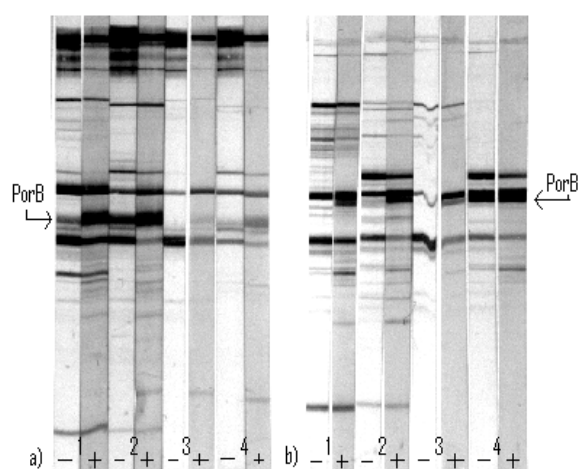
Gruppe 1 (Balb/c) utviklet antistoffer mot flere proteiner enn gruppe 2 (C57Black). Gruppe 2 og 4 (C57Black) ser ut til å ha antistoffer, blant annet for PorA, før forsøket startet (stripe 1 i figur 21). Like over PorAs posisjon ser man at gruppe 2 og 4 (C57Black) har utviklet antistoffer mot EF-Tu, slik som vist mot serogruppe A OMV.

*Forskjell i IgG-respons etter immunisering med og uten aluminiumhydroksid:*

Mus immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid (gruppe 1 og 2) utviklet antistoffer mot flere proteiner enn gruppene som fikk vaksine uten aluminiumhydroksid (gruppe 3 og 4).

### PorB-respons analysert med og uten detergent

Da epitopene i PorB hovedsaklig er konformasjonelle og denatureres i SDS-PAGE ble det gjort et forsøk hvor stripene ble inkubert med og uten detergent. Med detergenten Empigen-BB fikk man sterkere bånd for PorB (figur 22).



**Figur 22: Forsøk med og uten detergent.** Striper inkubert med serumpool etter tre immuniseringer fra gruppe 1, 2, 3 og 4 uten og med detergenten Empigen-BB (-/+). a) Serogruppe A OMV. b) Serogruppe W135 OMV.

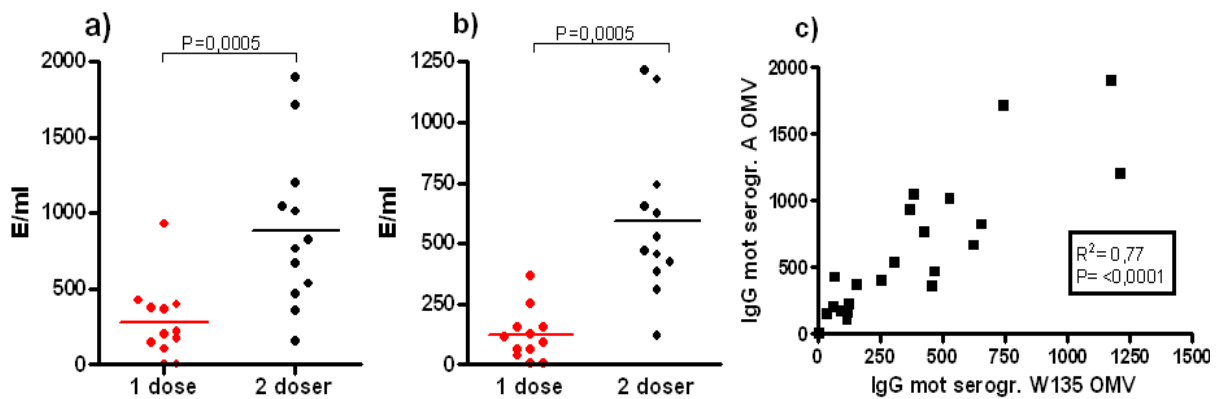
## 3.3 Sammenlignende studier av tre meningokokkvaksiner

Antistoffrespons i NMRI-mus ble studert etter to doser med 1/10 human dose av A+W135 OMV-vaksine, A+C+W135+Y konjugatvaksine (Menveo®) og A+C+W135+Y polysakkaridvaksine (Mencevax®) ved hjelp av ELISA, serumbaktericid analyse og opsonofagocytose.

### 3.3.1 OMV IgG-ELISA

Mus immunisert med A+W135 OMV-vaksinen utviklet høye nivåer av IgG-antistoffer mot både serogruppe A og W135 OMV etter første dose, og en signifikant økt respons fra første

til andre dose (figur 23 a) og b)). Det var signifikant korrelasjon mellom responsen mot OMV fra serogruppe A og W135 (figur 23 c)).



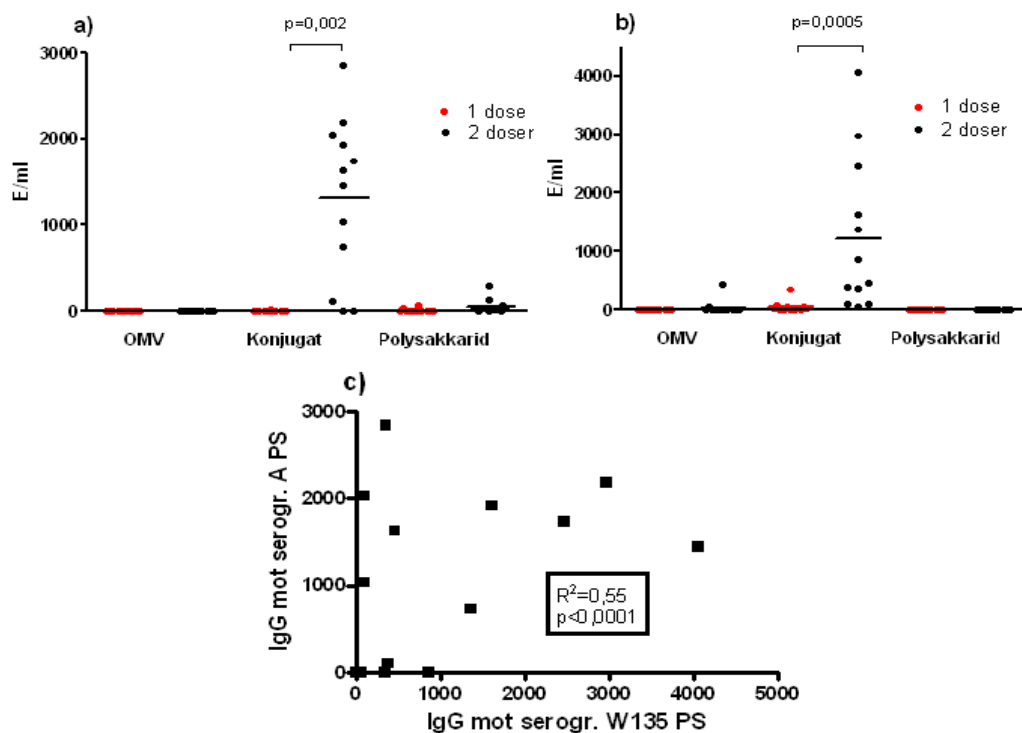
**Figur 23: IgG-respons i NMRI-mus immunisert med A+W135 OMV-vaksine.** Musene ble immunisert med 2,5  $\mu$ g+2,5  $\mu$ g protein fra hver av serogruppene. a) IgG-respons mot serogruppe A OMV. b) IgG-respons mot serogruppe W135 OMV. c) Korrelasjon mellom IgG-respons mot serogruppe A og W135 OMV etter en og to doser.

### 3.3.2 Polysakkarid IgG-ELISA

IgG-respons mot serogruppe A polysakkarid er vist i figur 24a). Sera fra mus immunisert med konjugatvaksinen ga ingen respons mot serogruppe A polysakkarid etter første dose, men høy respons etter andre dose. Sera fra mus immunisert med polysakkaridvaksinen ga liten eller ingen respons mot serogruppe A polysakkarid hverken etter første dose eller andre dose. Sera fra mus immunisert med OMV-vaksinen ga ingen respons mot serogruppe A polysakkarid.

IgG-respons mot serogruppe W135 polysakkarid er vist i figur 24b). Sera fra mus immunisert med konjugatvaksinen ga liten eller ingen respons mot serogruppe W135 polysakkarid etter første dose, og høy respons etter andre dose. Mus immunisert med polysakkaridvaksinen ga ingen respons mot serogruppe W135 polysakkarid verken etter første eller andre dose. Sera fra mus immunisert med OMV-vaksinen ga ingen respons mot serogruppe W135 polysakkarid etter første dose, men etter andre dose responderte to av tolv mus. Dette funnet ble bekreftet med gjentatt testing.

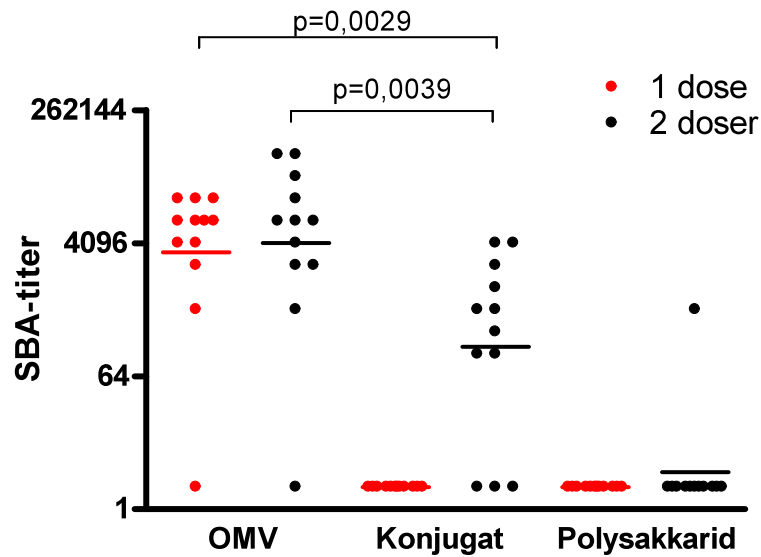
Det var signifikant korrelasjon mellom IgG-responsen etter en og to doser konjugatvaksine mot serogruppe A og W135 polysakkarid (figur 24c)), men også tydelige forskjeller ved at enkelte mus hadde utviklet antistoffer mot bare ett av polysakkaridene.



**Figur 24: IgG-respons mot serogruppe A og W135 polysakkarid i NMRI-mus.** Scatterplot med geometrisk gjennomsnitt. OMV = sera fra mus immunisert med A+W135 OMV-vaksine. Konjugat = sera fra mus immunisert med A+C+W135+Y konjugatvaksine. Polysakkarid = sera fra mus immunisert med A+C+W135+Y polysakkaridvaksine. a) IgG-respons mot serogruppe A polysakkarid. b) IgG-respons mot serogruppe W135 polysakkarid. c) Korrelasjonsplot mellom IgG-respons etter en og to doser konjugatvaksine mot serogruppe A og W135 polysakkarid.

### 3.3.3 Serumbaktericid analyse (SBA)

SBA-resultater mot serogruppe A stamme Mk499/03 er vist i figur 25. Elleve av tolv mus immunisert med OMV-vaksinen ga høye baktericide titer mot serogruppe A stamme Mk499/03 både etter en og to doser. Ni av tolv mus immunisert med konjugatvaksinen ga høye baktericide titer etter to doser, men ingen av musene responderte etter en dose. Mus immunisert med polysakkaridvaksinen ga ingen respons etter en dose, etter to doser var det bare en mus som responderte. Mus immunisert med en og to doser OMV-vaksine ga signifikant høyere baktericide titer enn sera fra mus immunisert med to doser konjugatvaksine.

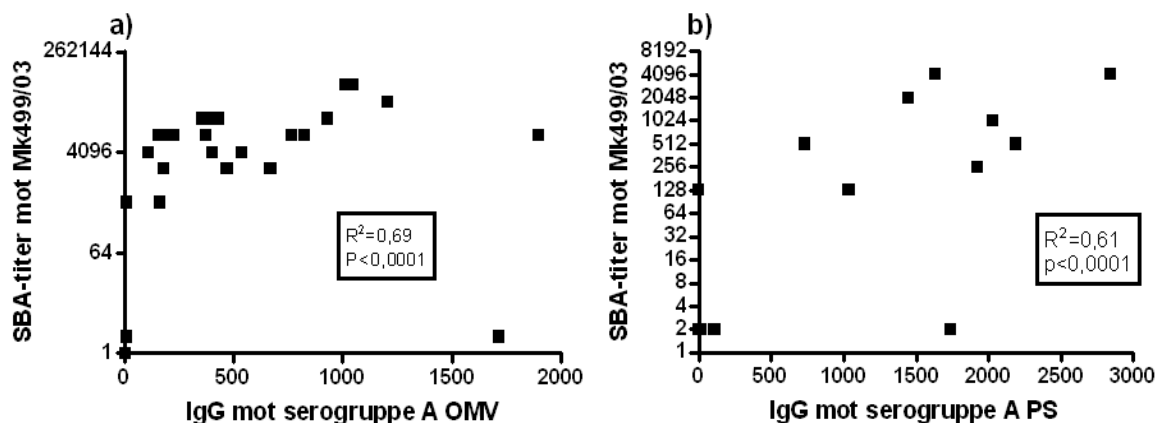


Figur 25: **SBA-titer mot serogruppe A stamme Mk499/03 i NMRI-mus.** Scatterplot med geometrisk gjennomsnitt. OMV = sera fra mus immunisert med A+W135 OMV-vaksine. Konjugat = sera fra mus immunisert med A+C+W135+Y konjugatvaksine. Polysakkarid = sera fra mus immunisert med A+C+W135+Y polysakkaridvaksine.

Det var ikke mulig å oppnå tilfredsstillende resultater i testingen mot serogruppe W135 stamme Mk222/02, da denne stammen viste seg å ikke fungere i testen. Analysen ble utført under like betingelser som mot serogruppe A stamme Mk499/03, men i kontrollbrønnen 11 (T60) vokste bare halvparten av de utsådde koloniene. Det arbeides med å løse dette problemet.

### 3.3.4 Korrelasjon mellom respons i ELISA og SBA

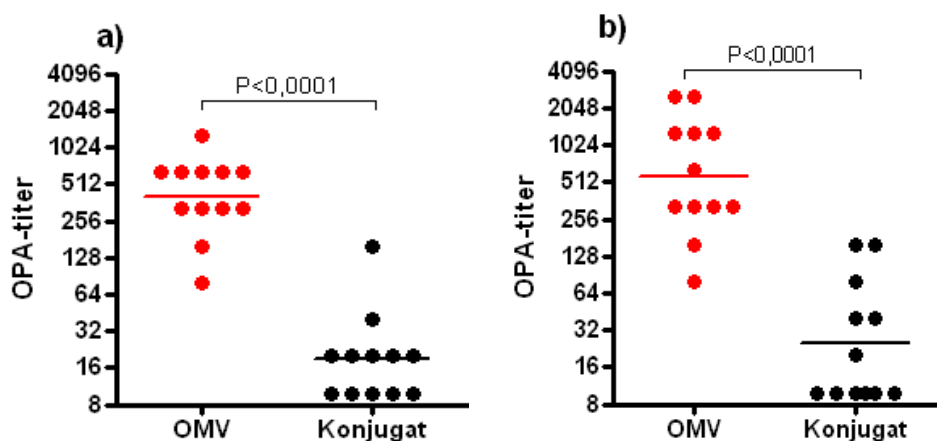
Korrelasjon mellom respons i ELISA og SBA er vist i figur 26. Det var signifikant korrelasjon mellom baktericide titer mot stamme Mk499/03 og IgG-nivå mot serogruppe A OMV for mus immunisert med OMV-vaksinen. Det var også signifikant korrelasjon mellom baktericide titer mot stamme Mk499/03 og IgG-nivå mot serogruppe A polysakkarid for mus immunisert med konjugatvaksinen. Resultatene fra både en og to doser er tatt med i figurene.



Figur 26: **Korrelasjonsplot mellom resultater fra SBA og ELISA.** a) Korrelasjon mellom resultater fra SBA og ELISA for mus immunisert med A+W135 OMV-vaksine. b) Korrelasjon mellom resultater fra SBA og ELISA for mus immunisert med A+C+W135+Y konjugatvaksine. A PS= A polysakkarid.

### 3.3.5 Opsonofagocytose (OPA)

OPA-resultater er vist i figur 27. Sera fra mus immunisert med to doser OMV-vaksine ga statistisk signifikant høyere titer mot serogruppe A stamme Mk499/03 og serogruppe W135 stamme Mk222/02 enn sera fra mus vaksinert med to doser konjugatvaksine.



Figur 27: **OPA-titer i NMRI-mus immunisert med to doser OMV- eller konjugatvaksine.** OMV = sera fra mus som har fått to doser A+W135 OMV-vaksine. Konjugat = sera fra mus som har fått to doser A+C+W135+Y konjugatvaksine. a) Test mot serogruppe A stamme Mk499/03. b) Test mot serogruppe W135 stamme Mk222/02.



## 4. Diskusjon

### 4.1 Karakterisering av A+W135 OMV-vaksine

#### 4.1.1 Proteinkarakterisering

Begge vaksine-OMVene inneholdt PorA og PorB som hovedproteiner (figur 12 side 43). Tilstedeværelse av PorA i en OMV-vaksine er viktig, da det er kjent at PorA induserer dannelsen av baktericide antistoffer og at disse er viktige i beskyttende immunitet mot meningokokksykdom (7-9). Betydningen av PorB som antigen i vaksiner er foreløpig uviss (7). En studie viser at PorB3, i motsetning til PorB2, ikke er eksponert på overflaten i levende bakterier, noe som indikerer at PorB3 er en mindre viktig vaksinekomponent (11). Serogruppe A OMV inneholdt også mye NadA. NadA er en viktig komponent i vaksinen da det er vist å inducere dannelsen av baktericide antistoffer (17). NadA er regnet som en viktig komponent i Novartis' serogruppe B vaksine Bexsero® som for tiden er under vurdering til markedsføringstillatelse. Det er imidlertid ikke alle serogruppe A-stammer som uttrykker NadA (18). Antistoffer mot NadA vil derfor bare bidra til beskyttelse mot serogruppe A-stammer som har dette proteinet. Tilstedeværelsen av Opc i serogruppe A OMV er trolig viktig, da Opc induserer dannelsen av baktericide antistoffer i mennesker (8, 15). Serogruppe W135 stamme Mk222/02 tilhører ST-11 komplekset, disse stammene har ikke genet for Opc (43). Tilstedeværelsen av RmpM er trolig ikke viktig med tanke på beskyttende antistoffer (13), men det kan likevel være et viktig protein da det bidrar til PorAs stabilitet (12). FetA induserer dannelsen av baktericide antistoffer i mus mot et hypervariabelt område i proteinet. På grunn av stor variabilitet i FetA er det usikkert om FetA bidrar til OMV-vaksinens beskyttelse (7). Betydningen av tilstedeværelsen av NspA og Omp85 i vaksinen er også usikker (7, 67). Ferske massespektrometrianalyser av et tidligere ukjent protein som ligger like over PorA i SDS-PAGE-gelen i begge OMVene, viser at dette kan være elongation factor-Tu. Dette er et konserverte cytoplasmisk protein både i gramnegative og grampositive bakterier og er trolig ikke et viktig antigen i vaksinen (68). Det jobbes videre med å identifisere alle vaksinekomponentene.

---

### 4.1.2 LPS-innhold

De eksisterende serogruppe B OMV-vaksinene inneholder 6-10 % LPS/protein og spesifikasjonskravene til den norske serogruppe B OMV-vaksinen er 4-12 % LPS/protein. Fullstendig fjerning av LPS fra en OMV-vaksine er ikke mulig uten å denaturere proteinantigenene, derfor må LPS-innholdet holdes på et nivå som ikke danner uønskede reaksjoner (49). Ved ekstraksjon med deoksyholat i fremstillingsprosessen av yttermembranvesikler, får man fjernet så mye LPS at vaksinen er sikre til bruk i mennesker (48). Det er vist at LPS-toksisiteten reduseres ved binding til yttermembranproteiner (49) og at toksisiteten blir ytterligere redusert ved adsorpsjon til aluminiumhydroksid (50). Serogruppe W135 OMV inneholdt ca 1 % LPS/protein, mens serogruppe A OMV inneholdt ca 9 % LPS/protein (figur 14 side 43). Samlet er dette ca 5 % som antas å være akseptabelt. Det finnes maksimumskrav til endotoksininnhold i vaksiner og andre injeksjonspreparater. Den europeiske farmakopé beskriver to tester for injeksjonspreparater, pyrogenitetstest i kanin og limulus amoebocyte lysate (LAL)-test. Selv med tilstedeværelse av noe LPS vil A+W135 OMV-vaksinen oppfylle farmakopekravene. Da det var stor forskjell mellom LPS-innholdet fra serogruppe A og W135 OMV bør det gjøres studier på forskjell i toksisitet mellom L11 og L3,7,9.

### 4.1.3 Vesikkeldannelse

Elektronmikroskopibilder viste at OMV fra serogruppe A bestod av mange intakte vesikler, i motsetning til OMV fra serogruppe W135 som bestod av få hele vesikler (figur 15 side 44). Det er ikke kjent om vaksinen må ha tilstedeværelse av fullstendige vesikler for optimal effekt. Visse proteiner trenger å være i sin naturlige konformasjon for å gi en antistoffrespons, og er dermed avhengig av å være inkorporert i vesikkelmembranen for å være immunogene. For eksempel ga en vaksine med rekombinant NspA ikke baktericide antistoffer i mennesker (21), og det kan tenkes å være fordi proteinet ikke ble presentert for immunforsvaret i sin native konformasjon. Flere studier tyder også på at det immunodominante antigenet PorA må være i sin native konformasjon for å gi baktericide antistoffer (7). Hvorfor serogruppe W135 OMV inneholdt få vesikler og serogruppe A OMV inneholdt mange er vanskelig å forklare. Deoksyholat fra produksjonsprosessen kan potensielt løse opp yttermembranen og føre til ødeleggelse av vesiklene. Fra LPS-kvantiteringen vet vi at serogruppe W135 OMV inneholdt svært lite LPS, mye mindre enn i

serogruppe A OMV. Da serogruppe W135 OMV tydelig hadde lite LPS, kan dette være en årsak til at vesiklene er ødelagte. Andre forklaringer kan være at L3,7,9 i serogruppe W135 OMV har andre egenskaper enn L11 i serogruppe A OMV, noe videre studier kan undersøke gi svar på.

## 4.2 Immunogenisitetstudier av A+W135 OMV-vaksine med og uten adjuvans i to musestammer

### 4.2.1 IgG-respons mot OMV i ELISA

Resultatene viste at det er viktig å gi to doser A+W135 OMV-vaksine, da alle gruppene fikk signifikant økt IgG-respons fra første til andre dose mot både serogruppe A og W135 OMV. For gruppene som fikk OMV-vaksine med aluminiumhydroksid flatet responsen ut fra andre til tredje dose (figur 16 side 45 og figur 18 side 48). En tredje dose var viktigere for immunresponsen til OMV-vaksinen uten aluminiumhydroksid da noen av gruppene som ikke fikk aluminiumhydroksid responderte signifikant høyere etter tre sammenlignet med to doser.

Aluminiumhydroksid er vist å øke immunresponsen mot mange vaksiner (55), også proteinvaksiner mot meningokokksykdom (69, 70). Det var derfor forventet at OMV-vaksinen med aluminiumhydroksid ville gi signifikant høyere IgG-respons enn vaksinen uten aluminiumhydroksid. Unntaket var respons mot serogruppe A OMV, hvor C57Black-musene som fikk tre doser OMV-vaksine uten aluminiumhydroksid responderte like kraftig som gruppene immunisert med tre doser OMV-vaksine med aluminiumhydroksid (figur 16 side 45). En studie av to doser med en serogruppe B OMV-vaksine i mennesker viste imidlertid ikke store forskjeller mellom vaksine med og uten aluminiumhydroksid (50). Forskjellen i mennesker trenger derfor ikke være like stor som observert i dette forsøket.

Det er tidligere sett store forskjeller i andre studier når det gjelder immunresponsen til de to musestammene C57Black og Balb/c. Valg av musestamme så ikke ut til å ha stor betydning i vår studie. C57Black omtales som Th1-dominant og er derfor delvis resistent mot flere intracellulære mikroorganismer, mens Balb/c har en Th2-dominerende immunrespons (71-73). Man kan derfor tenke seg at Balb/c burde være bedre rustet til å gi IgG-respons da Th2 induserer B-celler til isotypeskifte. I mus er det imidlertid sett at Th1-respons vil kunne

---

indusere IgG subklasse 2a (74). Da det i våre forsøk ble brukt et anti-mus IgG som binder alle IgG-subklasser, vet vi ingen ting om distribusjonen av subklassene. Det ville vært interessant å se på distribusjonen av IgG-subklasser da en Th1-respons først og fremst vil gi IgG2 og IgG3 og en Th2-respons først og fremst IgG1. Subklassene har forskjellig evne til å aktivere komplement og opsonofagocytose (75) og videre studier burde derfor gjøres for å karakterisere eventuelle forskjeller mellom musestammene. Dette gjelder også for aluminiumhydroksid, som er kjent for å gi en Th2-respons (55). Da både aluminiumhydroksid og Balb/c fortrinnsvis gir Th2-responser, vil man tro at disse skulle gi høyere nivåer av IgG1.

Da det i denne studien bare er undersøkt for IgG i seraene vet vi ingenting om dannelse av andre isotyper. De første antistoffene som blir dannet i en immunrespons er IgM. IgM er viktig i den tidlige responsen og minker over tid når B-cellene har blitt aktivert av Th2. Ved å studere IgMs antistoffkinetikk kan eventuelle forskjeller mellom musestammene eller de to vaksinene bli detektert. Man vet også at aluminiumhydroksid kan stimulere produksjon av IgE i mus (55) og det kunne også være interessant å studere IgE-respons i de ulike gruppene. Tidligere studier ved FHI av serogruppe B OMV-vaksinen viste at C57Black ga høyere IgG-respons og høyere nivåer av baktericide antistoffer enn Balb/c (upubliserede data).

Selv om det her ble målt høye nivåer av IgG-antistoffer mot OMV er dette ingen garanti for tilstedeværelse av funksjonelle antistoffer. Som tidligere nevnt har IgG-subklassene forskjellig evne til å aktivere komplement og opsonofagocytose i mus. IgG-respons i C57Black kan være dominert av IgG2a og IgG3 da disse IgG-subklassene dominerer en Th1-respons i mus, og Balb/c kan være dominert av IgG1. I mennesker er det IgG1 som best aktiverer komplement, mens IgG2 har redusert evne til aktivering (29), men i mus er det motsatt. IgG2 og IgG3 i mus har høyere baktericid og opsonofagocyterende aktivitet enn IgG1 i mus (75). For å undersøke om hvorvidt musene har utviklet funksjonelle antistoffer bør seraene også testes for tilstedeværelse av serumbaktericide og opsoniserende antistoffer. Det bør også studeres varighet av immunresponsen og effekt av en boosterdose. Det er tidligere sett at en boosterdose av en serogruppe B OMV-vaksine kan være viktig (76).

#### **4.2.2 IgG-respons mot enkeltkomponenter i OMV i immunblot**

Resultatene fra immunblott samsvarte relativt bra med ELISA-resultatene. Aluminiumhydroksid gjorde at musene responderte mot mange flere proteiner i vaksinen

(figur 20 side 49 og figur 21 side 51). At musene utviklet antistoffer mot PorA er viktig da man vet at antistoffer mot PorA er viktig i beskyttelsen mot meningokokker. Det samme gjelder antistoffer mot NadA og Opc. Resultatene viser at det er mange immunogene proteiner tilstede i vaksinen. Et problem med immunblott er at antigenene er denaturerte. Mange epitoper er konformasjonelle og trenger proteinets native konformasjon for binding av antistoff. Ved å inkubere sera samme med detergenten Empigen-BB ble det observert økt binding til PorB (figur 22 side 52) Årsaken er at antistoffer mot PorB i stor grad gjenkjenner konformasjonsepitoper PorB. Ved å tilsette detergent vil PorB i NC-membranen delvis renatureres og gi sterkere binding av antistoffer til PorB-epitopene (57). Serogruppe W135 OMV er fremstilt av stamme Mk222/02 som tilhører ST-11 komplekset. Det er vist at stammer fra ST-11 komplekset ikke inneholder genet for Opc (43), og det ble derfor ikke observert binding til Opc i serogruppe W135 OMV. Stamme Mk222/02 inneholder lite NadA, og det er derfor lite antistoffer utviklet mot dette proteinet.

Gruppene immunisert med vaksine uten aluminiumhydroksid utviklet antistoffer mot L11 LPS i serogruppe A OMV, men det gjorde ikke musene immunisert med vaksine med aluminiumhydroksid (figur 20 side 49). Aluminiumhydroksid reduserer toksisiteten av LPS, slik at man kan opprettholde ikke-toksiske, men immunogene mengder av LPS (50). Det kan være en årsak til at immunogenisiteten har blitt redusert etter adsorpsjon til aluminiumhydroksid. Det var ingen av gruppene som utviklet antistoffer mot L3,7,9 LPS i serogruppe W135 OMV. Årsaken til at musene ikke responderte mot L3,7,9 kan være at det var lite L3,7,9 tilstede i vaksinen.

Det var ikke store forskjeller mellom musestammene. Den mest tydelige forskjellen var responsen i C57Black-musene mot proteinet som nå er antatt å være EF-Tu. Dette proteinet er tydelig mer immunogent i C57Black sammenlignet med Balb/c (figur 20 side 49 og figur 21 side 51). I tillegg kunne seraene også vært undersøkt for tilstedeværelse av andre isotyper og IgG-subklasser.

## 4.3 Sammenlignende studier av tre meningokokkvaksiner

### 4.3.1 IgG-respons mot OMV og polysakkrider i ELISA

Den utavlede musestammen NMRI er brukt som standardstamme for kvalitetskontroll av den norske serogruppe B OMV-vaksinen som produseres på FHI. I likhet med i Balb/c- og

---

C57Black-mus i museforsøk 1, ga A+W135 OMV-vaksinen høy IgG-respons i NMRI-mus, også etter første dose (figur 23 side 53). Det er tidligere vist at serogruppe A OMV-vaksiner gir høy IgG-respons i NMRI-mus etter to doser (77). Konjugatvaksinen ga lite eller ingen respons verken mot serogruppe A- eller W135-polysakkarid etter første dose (figur 24 side 54), noe som indikerer at OMV-vaksinen er mer immunogen etter første dose enn konjugatvaksinen. Det trenger imidlertid ikke bety at dette er tilfellet i mennesker. Konjugatvaksiner gis vanligvis bare som en dose, med unntak av i små barn (33). I ikke-kliniske forsøk med monovalente MenAfriVac™ ble det brukt NIH-Swiss mice immunisert med polysakkarid- eller konjugatvaksine (78). I dette forsøket ga 1 µg serogruppe A-polysakkarid konjugatvaksine relativ høy IgG-respons mot A-polysakkarid etter første dose, dette til forskjell fra A+C+W135+Y konjugatvaksinen Menveo® brukt i dette forsøket. Forskjellig musestamme kan ha hatt innvirkning, men også at bærerproteinene i MenAfriVac™ er tetanustoksoid i motsetning til CRM197 (mutant av difteritoksinet) i Menveo®. I tillegg inneholder MenAfriVac™ adjuvansen aluminiumfosfat, mens Menveo® ikke inneholder adjuvans. Etter to doser ga også konjugatvaksinen Menveo® høy IgG-respons mot serogruppe A- og W135-polysakkarid. Det er vanskelig å sammenligne responsen mellom A+W135 OMV-vaksinen og konjugatvaksinen da de inneholder vidt forskjellige antigener med forskjellige bindingsegenskaper. Den rene polysakkaridvaksinen ga liten eller ingen IgG-respons mot serogruppe A- og W135-polysakkarid. Det har lenge vært kjent at rene meningokokkpolysakkarider er lite immunogene i mus. Derfor er en musemodell kanskje ikke den beste sammenligningsmodellen for polysakkaridvaksinene.

To av tolv mus immunisert med OMV-vaksinen responderte noe mot serogruppe W135-polysakkarid (figur 24b side 54)). Dette kan være et tegn på det er rester av serogruppe W135 polysakkarid i OMV-vaksinen. I seg selv er ikke dette farlig, siden eventuelle rester vil kunne øke immunogenisiteten av vaksinen. Om det er rester av serogruppe W135 polysakkarid i vaksinen bør man likevel ha kontroll på dette da polysakkarider kan brytes ned og effekten av vaksinen kan i verste fall tapes over tid.

Et annet viktig poeng i dette forsøket er at det bare ble undersøkt for IgG-respons. Da polysakkarider er tymus-uavhengige antigener induserer de først og fremst dannelse av IgM. Effekten av vaksinene kan derfor være avhengig av IgM. Derfor burde seraene også bli undersøkt for IgM mot polysakkaridene.

Det er vanskelig å direkte sammenligne disse tre vaksinene da antistoffene binder forskjellige type antigener. I tillegg ser vi bare på generell IgG-respons og ikke mengde funksjonelle antistoffer. Som tidligere beskrevet har ulike IgG-subklasser i mus ulik baktericid og opsonofagocytiserende aktivitet. For å sammenligne vaksinenes effekt ble det gjort serumbaktericid analyse.

### **4.3.2 Serumbaktericid analyse (SBA)**

Da høye nivåer av serumbaktericide antistoffer korrelerer med beskyttelse mot meningokokksykdom kunne vaksinene direkte sammenlignes med tanke på effekt ved å gjøre SBA-analyser. Mus immunisert med A+W135 OMV-vaksine ga høyere titer enn sera fra mus immunisert med to doser konjugatvaksine mot serogruppe A stamme Mk499/03, både etter en og to doser. Dette betyr at sera fra mus immunisert med OMV-vaksinen inneholder antistoffer som har bedre evne til å inducere antistoffavhengig, komplementmediert drap, noe som tilsier at disse musene vil være bedre beskyttet mot serogruppe A meningokokksykdom enn mus immunisert med konjugatvaksinen. Mus immunisert med en dose OMV-vaksine ga til og med høyere titer enn mus immunisert med to doser konjugatvaksine (figur 25 side 55). Én av tolv mus som fikk polysakkaridvaksinen ga detekterbar respons mot serogruppe A-stammen. Denne musen viste imidlertid ingen IgG-respons i ELISA. Dette kunne bety at de baktericide antistoffene denne musen hadde utviklet var IgM-antistoffer.

Baktericide antistoffer mot serogruppe W135 er ikke undersøkt da teststammen Mk222/02 ikke fungerte i testen. Det var for få kolonier som vokste opp i kontrollbrønnen hvor bakteriene var inkubert uten musesera og inaktivert eksternt komplement. Dette kan være et tegn på at bakterien ikke vokser godt i bufferen. Mulige tilnærminger for å løse problemet er å benytte annen buffer eller å bytte teststamme til en annen serogruppe W135-stamme.

At det er signifikant korrelasjon mellom resultatene fra ELISA og SBA viser at det var en tendens til at de musene som responderte høyt i SBA, også gjorde det i ELISA. Men som man kan se i figur 26 side 56, er det noen mus som for eksempel ikke responderer i SBA, men ga høye nivåer av antistoffer i ELISA.

### 4.3.3 Opsonofagocytose (OPA)

Mus immunisert med to doser OMV-vaksine ga signifikant høyere titer enn mus immunisert med to doser konjugatvaksine mot både serogruppe A stamme Mk499/03 og serogruppe W135 stamme Mk222/02 (figur 27 side 56). Det vil si at sera fra mus immunisert med OMV-vaksinen aktiverte en større andel granulocytter til respiratorisk burst. Dette betyr at disse seraene inneholdt mer opsoniserende antistoffer som kunne aktivere komplement og interagere med Fc-reseptorer på granulocytene. Selv om ikke viktigheten av opsoniserende antistoffer i beskyttelse mot meningokokker er studert like mye som baktericide antistoffer, er høye OPA-titer likevel en indikasjon på at musene er bedre beskyttet mot meningokokker.



## 5. Konklusjon

A+W135 OMV-vaksinen studert her inneholder flere antigener som induserer dannelsen av baktericide antistoffer i mus og menneske, blant annet PorA og NadA. Den inneholder også andre proteiner som man enda ikke vet den fulle betydningen av, men som også kan være viktige.

To doser av A+W135 OMV-vaksinen med aluminiumhydroksid gir god immunrespons i mus, mens en tredje dose ser ut til å være viktigere for vaksinen uten aluminiumhydroksid. Adsorpsjon av vaksinen til aluminiumhydroksid øker vaksinens immunrespons i mus. Valg av musestamme i dette forsøket ser ikke ut til å ha stor betydning, men flere studier bør imidlertid gjøres for å avdekke eventuelle forskjeller.

A+W135 OMV-vaksinen gir høyere nivåer av funksjonelle antistoffer i mus enn en allerede markedsført konjugatvaksine. Polysakkaridvaksinen gir liten eller ingen respons i mus i dette forsøket. Dette tyder på at en A+W135 OMV-vaksine kan være et bra alternativ til polysakkarid- og konjugatvaksiner i Afrika. Videre studier for å karakterisere immunogenisiteten av vaksinen, både i mus og mennesker, blir derfor viktig. Det er også viktig å teste vaksinens effekt mot nyere isolerte stammer fra Afrika enn de testet i denne oppgaven, også stammer tilhørende andre serogrupper.

---

## Referanseliste

1. World Health Organization. Meningococcal vaccines: polysaccharide and polysaccharide conjugate vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2002;77:331-9.
2. Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine* 2001;20:666-87.
3. Harrison LH. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:142-64.
4. Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:3-14.
5. Frosch M, Vogel U. Structure and genetics of the meningococcal capsule. In: Frosch M, Maiden MCJ, eds. *Handbook of meningococcal disease*. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006, pp. 145-62.
6. van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun* 1991;59:2963-71.
7. Feavers IM, Pizza M. Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine* 2009;27 Suppl 2:B42-B50.
8. Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 1995;63:4642-52.
9. Saukkonen K, Abdillahi H, Poolman JT, Leinonen M. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microb Pathog* 1987;3:261-7.
10. Poolman JT, van der Ley P, Tommassen J. Surface structures and secreted products of meningococci. In: Cartwright K, ed. *Meningococcal disease*. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons; 1995, pp. 21-34.
11. Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J, Wedge E, Rosenqvist E. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine* 2001;19:1526-33.
12. Jansen C, Wiese A, Reubsæet L, Dekker N, de Cock H, Seydel U, et al. Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2000;1464:284-98.
13. Rosenqvist E, Musacchio A, Aase A, Hoiby EA, Namork E, Kolberg J, et al. Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against

- the class 4 outer membrane protein (Rmp) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1999;67:1267-76.
14. Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, Griffiths NJ, Bourdoulous S, Murillo I, et al. Meningococcal interactions with the host. *Vaccine* 2009;27:B78-B89.
  15. Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, Kusecek B, Achtman M. The 5C protein of *Neisseria meningitidis* is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. *J Infect Dis* 1993;167:1065-73.
  16. Comanducci M, Bambini S, Caugant DA, Mora M, Brunelli B, Capecchi B, et al. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2004;72:4217-23.
  17. Comanducci M, Bambini S, Brunelli B, Adu-Bobie J, Aricò B, Capecchi B, et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *The Journal of Experimental Medicine* 2002;195:1445-54.
  18. Norheim G, Rosenqvist E, Aseffa A, Yassin MA, Mengistu G, Kassu A, et al. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates from recent outbreaks in Ethiopia and comparison with those recovered during the epidemic of 1988 to 1989. *J Clin Microbiol* 2006;44:861-71.
  19. Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Arico B, Savino S, Santini L, et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10834-9.
  20. Pizza M, Donnelly J, Rappuoli R. Factor H-binding protein, a unique meningococcal vaccine antigen. *Vaccine* 2008;26 Suppl 8:I46-I48.
  21. Halperin SA, Langley JM, Smith B, Wunderli P, Kaufman L, Kimura A, et al. Phase 1 first-in-human studies of the reactogenicity and immunogenicity of a recombinant meningococcal NspA vaccine in healthy adults. *Vaccine* 2007;25:450-7.
  22. Wright JC, Plested JS, Moxon ER. Genetics, structure and function of lipopolysaccharide. In: Frosch M, Maiden MCJ, eds. *Handbook of meningococcal disease*. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006, pp. 163-79.
  23. Brandtzaeg P. Pathogenesis and pathophysiology of invasive meningococcal disease. In: Frosch M, Maiden MCJ, eds. *Handbook of meningococcal disease*. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006, pp. 427-80.
  24. Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 1998;106:505-25.
  25. Ala'Aldeen D, Griffiths E. Vaccines against meningococcal diseases. In: Ala'Aldeen D, Hormaeche CE, eds. *Molecular and clinical aspects of bacterial vaccine development*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1995, pp. 1-39.
  26. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3140-5.

- 
27. Caugant DA, Maiden MC. Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution. *Vaccine* 2009;27 Suppl 2:B64-B70.
  28. Griffiss JM. Mechanism of host immunity. In: Cartwright K, ed. *Meningococcal disease*. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1995, pp. 35-70.
  29. Parham P. Immunity mediated by B cells and antibodies. In: Parham P, ed. *The immune system*. 3 ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2009, pp. 248-87.
  30. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969;129:1307-26.
  31. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* 1969;129:1327-48.
  32. Andrews N. Reevaluating the use of correlates of protection: Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the UK [Internet]. [updated 2009 Dec 6; cited 2010 May 11]. Available from: [http://www.who.int/vaccine\\_research/documents/WCP\\_Andrews\\_presentation.pdf](http://www.who.int/vaccine_research/documents/WCP_Andrews_presentation.pdf).
  33. Harrison LH, Pelton SI, Wilder-Smith A, Holst J, Safadi MAP, Vazquez JA, et al. The Global Meningococcal Initiative: Recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. *Vaccine* 2011;29:3363-71.
  34. Whitney AM, Coulson GB, von Gottberg A, Block C, Keller N, Mayer LW, et al. Genotypic comparison of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup Y isolates from the United States, South Africa, and Israel, isolated from 1999 through 2002. *J Clin Microbiol* 2009;47:2787-93.
  35. Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* 2009;27 Suppl 2:B51-B63.
  36. Lapeyssonnie L. Cerebrospinal meningitis in Africa. *Bull World Health Organ* 1963;28 Suppl:1-114.
  37. Greenwood B. Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:341-53.
  38. Broome CV, Rugh MA, Yada AA, Giat L, Giat H, Zeltner JM, et al. Epidemic group C meningococcal meningitis in Upper Volta, 1979. *Bull World Health Organ* 1983;61:325-30.
  39. Whittle HC, Evans-Jones G, Onyewotu I, Adjuikiewicz A, Turunen U, Crockford J, et al. Group-C meningococcal meningitis in the northern savanna of Africa. *The Lancet* 1975;305:1377.
  40. Koumaré B, Ouedraogo-Traoré R, Sanou I, Yada AA, Sow I, Lusamba PS, et al. The first large epidemic of meningococcal disease caused by serogroup W135, Burkina Faso, 2002. *Vaccine* 2007;25:A37-A41.

41. Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Mainassara HB, et al. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis* 2007;44:657-63.
42. Nicolas P, Norheim G, Garnotel E, Djibo S, Caugant DA. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* isolated in the African Meningitis Belt between 1988 and 2003 shows dominance of sequence type 5 (ST-5) and ST-11 complexes. *J Clin Microbiol* 2005;43:5129-35.
43. Wang JF, Caugant DA, Morelli G, Koumare B, Achtman M. Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1993;167:1320-9.
44. Kristiansen PA, Diomande F, Wei SC, Ouedraogo R, Sangare L, Sanou I, et al. Baseline meningococcal carriage in Burkina Faso before the introduction of a meningococcal serogroup A conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:435-43.
45. Feavers IM. Meningococcal vaccines and vaccine developments. In: Pollard AJ, Maiden MC, eds. *Meningococcal vaccines. Methods and protocols*. 1 ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001, pp. 1-22.
46. LaForce FM. Commentary on "Polysaccharide vaccines for preventing serogroup A meningococcal meningitis". *Evid -Based Child Health* 2011;6:956-8.
47. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, et al. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009;27 Suppl 2:B3-12.
48. Nøkleby H, Aavitsland P, O'Hallahan J, Feiring B, Tilman S, Oster P. Safety review: Two outer membrane vesicle (OMV) vaccines against systemic *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* 2007;25:3080-4.
49. Tsai CM, Frasch CE, Rivera E, Hochstein HD. Measurements of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparations for vaccine usage. *J Biol Stand* 1989;17:249-58.
50. Rosenqvist E, Hoiby EA, Bjune G, Aase A, Halstensen A, Lehmann AK, et al. Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. *Dev Biol Stand* 1998;92:323-33.
51. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 Serogroup B Outer-Membrane Protein Meningococcal Vaccines. *JAMA* 1999;281:1520-7.
52. Galloway Y, Stehr-Green P, McNicholas A, O'Hallahan J. Use of an observational cohort study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years. *Int J Epidemiol* 2009;38:413-8.

- 
53. World Health Organization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 12-13 December 2007. *Wkly Epidemiol Rec* 2008;83:37-44.
  54. Caron F, du Châtelet IP, Leroy JP, Ruckly C, Blanchard M, Bohic N, et al. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. *The Lancet Infectious Diseases* 2011; Published online April 12, 2011
  55. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009;9:287-93.
  56. Bio-Rad Laboratories. Acrylamide polymerization - a practical approach [Internet]. [updated 2000; cited 2011 May 11]. Available from: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_1156.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1156.pdf).
  57. Wedege E. Immunoblot analysis of sera from patients and vaccinees. In: Pollard AJ, Maiden MCJ, eds. *Meningococcal vaccines. Methods and protocols*. 66 ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001, pp. 275-88.
  58. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982;119:115-9.
  59. Tsai CM. The analysis of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal polysaccharide vaccines by silver staining following SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Stand* 1986;14:25-IN2.
  60. Hauge M, Thomassen PT. Ikke-klinisk utprøving av legemidler. In: *Legemidler og juss*. 1 ed. Bergen: Fagbokforlaget; 2007, pp. 103-8.
  61. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1991;29:1439-46.
  62. Rosenqvist E, Käyhty H, Pollard AJ. Determination of antibody responses to meningococcal antigens by ELISA. In: Pollard AJ, Maiden MCJ, eds. *Meningococcal vaccines. Methods and protocols*. 1 ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001, pp. 255-73.
  63. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
  64. Borrow R, Carlone GM. Serogroup B and C serum bactericidal assays. In: Pollard AJ, Maiden MCJ, eds. *Meningococcal vaccines. Methods and protocols*. 66 ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001, pp. 289-304.
  65. Michaelsen TE, Aase A. Antibody-induced opsonophagocytosis of serogroup B meningococci measured by flow cytometry. In: Pollard AJ, Maiden MCJ, eds. *Meningococcal vaccines. Methods and protocols*. 66 ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001, pp. 331-7.

66. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods* 1998;219:187-93.
67. Moe GR, Zuno-Mitchell P, Lee SS, Lucas AH, Granoff DM. Functional activity of anti-neisserial surface protein A monoclonal antibodies against strains of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Infect Immun* 2001;69:3762-71.
68. Kolberg J, Hammerschmidt S, Frank R, Jonak J, Sanderova H, Aase A. The surface-associated elongation factor Tu is concealed for antibody binding on viable pneumococci and meningococci. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:222-30.
69. Frasch CE, Zahradnik JM, Wang LY, Mocca LF, Tsai CM. Antibody response of adults to an aluminum hydroxide-adsorbed *Neisseria meningitidis* serotype 2b protein-group B polysaccharide vaccine. *J Infect Dis* 1988;158:710-8.
70. Wang LY, Frasch CE. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect Immun* 1984;46:408-14.
71. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004;22:460-6.
72. Liu T, Nishimura H, Matsuguchi T, Yoshikai Y. Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. *Cell Immunol* 2000;202:31-40.
73. Chiodini RJ, Buergelt CD. Susceptibility of Balb/c, C57/B6 and C57/B10 mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol* 1993;109:309-19.
74. Murphy K, Travers P, Walport M. The humoral immune response. In: Janeway's immunobiology. 7 ed. New York: Garland Science; 2008, pp. 379-420.
75. Michaelsen TE, Kolberg J, Aase A, Herstad TK, Høiby EA. The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol* 2004;59:34-9.
76. Gioia CAC, de Sousa AB, Cruz SC, Junior FCS, Andrade AFB, Sassi RM, et al. Effect of a booster dose of serogroup B meningococcal vaccine on antibody response to *Neisseria meningitidis* in mice vaccinated with different immunization schedules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44:35-42.
77. Norheim G, Aase A, Caugant DA, Hoiby EA, Fritzsonn E, Tangen T, et al. Development and characterisation of outer membrane vesicle vaccines against serogroup A *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2005;23:3762-74.
78. Lee CH, Kuo WC, Beri S, Kapre S, Joshi JS, Bouveret N, et al. Preparation and characterization of an immunogenic meningococcal group A conjugate vaccine for use in Africa. *Vaccine* 2009;27:726-32.

## **Vedlegg**

Vedlegg 1: Materialer

Vedlegg 2: Protokoll museforsøk 1

Vedlegg 3: Protokoll museforsøk 2

Vedlegg 4: Abstract til muntlig presentasjon

Vedlegg 5: Abstract til poster



## Vedlegg 1: Materialer

### 1.1. OMV-løsninger

<i>Løsning</i>	<i>Innhold</i>
<b>DFVME 002W Sukrose.</b> OMV fra serogruppe W135 stamme Mk222/02. Finlay Institute, feb. 2010	1,0 mg protein/ml i 3 % sukrose
<b>DFVME 003A Sukrose.</b> OMV fra serogruppe A stamme Mk499/03. Finlay Institute, feb. 2010	1,0 mg protein/ml i 3 % sukrose
<b>Bivalent 003A+002W.</b> Bivalent OMV-vaksine fra stamme Mk499/03 og Mk222/02. Finlay Institute, feb. 2010	106 µg protein/ml 0,13 mg tiomersal/ml 3,6 mg Al(OH) <sub>3</sub> /ml

### 1.2. SDS PAGE og farging med Coomassie Brilliant Blue G250

#### Ferdige materialer og reagenser

Akrylamid/bis løsning 30 % (Løsning A). Bio-Rad Laboratories.
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 (Løsning B). Substratlaboriet, SMAN, FHI.
0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (Løsning C). Substratlaboriet, SMAN, FHI.
Sodium dodecyl sulfat (SDS). Sigma.
Ammoniumpersulfat. Bio-Rad Laboratories.
N,N,N,N-tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED). Bio-Rad Laboratories.
Pyronin B. Sigma.
2-merkaptometanol. Bio-Rad Laboratories.
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Molekylvektstandard). Fermentas.

Elektrodebuffer pH 8,5 Substratlaboriet, SMAN, FHI.
---

Bio-Safe Coomassie Stain. Bio-Rad Laboratories.
---

### Egenlagde reagenser

#### APS 10 %:

Ammoniumpersulfat 1 g

Dest. vann 10 ml

Fryses ned i små rør pga kort holdbarhet.

#### SDS 10 %:

SDS 1 g

Dest. vann 10 ml

Oppbevares ved romtemperatur.

#### Prøvebuffer:

Dest. vann 4,2 ml

Løsning C 1,0 ml

Glyserol 0,8 ml

10 % SDS 1,6 ml

2-merkaptoetanol 0,4 ml (= 5 %)

Oppbevares i kjøleskap.

## **1.3. ELISA**

### Ferdige materialer og reagenser

0,1 M Tris/HCl pH 8,6 (coatingbuffer OMV-ELISA). Substratlaboriet, SMAN, FHI.
---

Waalder 20xkonsentrert fosfatbuffersaltvann (PBS). Substratlaboriet, SMAN, FHI.
---

Tween 20. Sigma
-----------------

Bovint serumalbumin (BSA) 30 % løsning. PAA Laboratories.
---

Anti-mus IgG alkalisk fosfatase konjugat. Sigma A3562. Lot 110K9169
---

Para-nitrofenylfosfat (substrattabletter). Sigma.
---

10 % dietanolaminbuffer (substratbuffer). Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.
A-polysakkarid til coating. Serum Institute India.
W135-polysakkarid til coating. Sanofi Pasteur.
Natriumazid 10 % m/V vandig oppløsning. Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.

### Egenlagde reagenser

#### ELISA-vaskebuffer

Waler 20xkons. PBS	250 ml
Ad dest. vann	5 L
Tween 20	2,5 ml (= 0,05 %)

#### Serumfortynningsbuffer

ELISA-vaskebuffer	118 ml
BSA 30 % løsning	2 ml (= 0,5 %)

Fryses ned i flasker på 100 ml.

#### Coatingbuffer PS-ELISA

Waler 20xkons. PBS	100 ml
Dest. vann	1900 ml
Natriumazid 10 %	4 ml (= 0,02 %)

#### Blokkeringsbuffer PS-ELISA

Coatingbuffer PS-ELISA	967 ml
BSA 30 % løsning	33 ml (= 1 %)

## **1.4. Immunblott**

### Ferdige materialer og reagenser

Transferbuffer pH 8,5. Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.
PBS pH 7,2 "Dr.Kornstad". Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.

Bovint serumalbumin (BSA), Fraksjon, $\geq$ V 96 %. Sigma
Empigen-BB 30 %. Albright & Wilson.
Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP. DAKO art.nr. P0260. Lot. 00054403
Porc anti-rabbit immunoglobulins/HRP. DAKO art.nr. P0217. Lot. 037(102)
0,05M Natriumacetatbuffer pH 5,0. Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.
3-amino-9-etylcarbazol (AEC)-løsning. Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.
Hydrogenperoksid 30 %. MERCK.

### Monoklonale antistoffer

Nr.	Protein	Identitet	Art	Fortynning
1	PorA P1.9	05/190. NIBSC	Mus	1:1000
2	PorA P1.2	95/969. NIBSC	Mus	1:10000
3	PorB P.3.4	244,C11. J.Kolberg, FHI.	Mus	1:100
4	PorB P2.2a	02/180. NIBSC.	Mus	1:1000
5	RmpM	173,6-1. J.Kolberg, FHI.	Mus	1:100
6	Opc	279 5C. J.Kolberg, FHI.	Mus	1:1000
7	NadA	961C. Gave fra M.Comanducci.	Kanin	1:10000
8	LPS L11	4C4. Gave fra M.Apicella.	Mus	1:1000
9	LPS L3,7,9	9-2. J.Kolberg, FHI.	Mus	1:2000

### Egenlagde reagenser

3 % BSA i PBS:

BSA 96 %

3 g

---

PBS ”Dr.Kornstad” pH 7,2 100 ml

Fryses ned i flasker på 100 ml

### **1.5. SBA og OPA**

#### Ferdige materialer og reagenser

Blodagarskåler. Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.
Hanks Balanced Solution (HBSS). Invitrogen.
Baby-rabbit complement. Pel-Freez Biologicals.
HiTrap Protein G HP (protein G-søyle). GE Healthcare
Lyseringsløsning. Substratlaboratoriet, SMAN, FHI.
Dihydrorhodamine 123. Invitrogen.
Monoklonale antistoffer mot PorA. Se tabell med monoklonale antistoffer i vedlegg 1.4.

## Vedlegg 2: Protokoll museforsøk 1

### Museforsøk 1

**Protokoll: Vaksinerings av mus med A+W135 OMV meningokokkvaksine fra stamme 499/03 (serogruppe A) og 222/02 (serogruppe W135) produsert ved Finlay Institute på Cuba.**

#### 1. Mål

*Primært:*

Undersøke antistoffkinetikk etter subkutan immunisering med 1, 2 og 3 doser av bivalent A+W135 OMV-vaksine (4µg A + 4µg W135).

*Sekundært:*

-Undersøke antistoffkinetikk av bivalent A+W135 OMV-vaksine i to musestammer (Balb/c og C57/Black)

-Sammenligne antistoffkinetikk av A+W135 OMV-vaksine med og uten adjuvant (Al(OH)<sub>3</sub> 1:40)

#### 2. Tidsskjema

<i>Aktivitet</i>	<i>Dato</i>
0-prøve + 1.immunisering	Tirsdag 28.september (d0)
Blodprøve + 2.immunisering	Tirsdag 19.oktober (d21)
Blodprøve + 3.immunisering	Tirsdag 9.november (d42)
Tomtapping	Tirsdag 23.november (d56)

#### 3. Tillaging av vaksine

##### 3.1. Utgangsmaterialer

- Monovalente OMV-løsninger fra A og W135 stammer i 3% sukroseløsninger (uten aluminium og tiomersal).
- Final bivalent A+W135 OMV vaksine med aluminiumhydroksid og thiomersal.
- Produsert februar 2010 på Finlay Institute, Cuba. Mottatt 17.09.2010 av Einar Rosenqvist.

<i>Nr</i>	<i>Preparat</i>	<i>Konsentrasjon mg protein/ml</i>
1	DF VME 002 W sucrose. OMV from serogroup W 222 strain	Concentration adjusted to 1,00 mg/ml
2	DF VME 003 A sucrose. OMV from serogroup A 499 strain	Concentration adjusted to 1,00 mg/ml
3	Bivalent 003A + 002W. Bivalent vaccine, strains 499 and 222 respectively, with aluminum and thiomersal.	0,106 mg/ml (Dvs. 53µg A + 53µg W)
4	Fosfatbuffersaltetvann 0,01M pH 7,2 (Dr.Kornstad)	Produsert FHI Substratlab. 3.mai 2010 (batch 1005004)

Blandinger og fortynninger utføres i LAF-benk og aseptisk teknikk benyttes. Prosedyren gjentas før hver vaksinerings (3 doser).

### **3.2. Tillaging av A+W OMV (uten adj) sukrose**

<i>Løsning som skal lages</i>	<i>Innhold</i>	<i>Konsentrasjon mg protein/ml i utgangsløsn.</i>	<i>Volum ml</i>	<i>Konsentrasjon mg protein/ml fra hver OMV</i>	<i>Final protein-konsentrasjon mg/ml etter blanding</i>
A+W OMV i sukrose (uten adj)	DF VME 002 W sucrose	1,0 mg/ml	0,5 ml	0,5 mg/ml av W135 OMV	<b>1 mg/ml</b>
	DF VME 003 A sucrose	1.0 mg/ml	0,5 ml	0,5 mg/ml av A OMV	<b>1 mg/ml</b>

### **3.3. Fortynning av vaksine til immunisering av mus**

Musene skal immuniseres med 8 µg protein i 0,2 ml volum.  
Ønsket proteinkonsentrasjon i ferdig vaksine til immunisering: 40µg protein/ml.

Beregnet volum for vaksinerings:

0,2 ml\*22 mus = 4,4 ml A+W OMV + Al(OH)<sub>3</sub>

0,2 ml\*22 mus = 4,4 ml A+W OMV (uten adj)

0,2 ml\*12 mus = 2,4 ml fosfatbuffersaltvann (placebo)

Lager 6 ml av hver vaksine.

Gjør fortynning i 15 ml plastrør.

<i>Vaksiner som skal lages</i>	<i>Nødvendig sluttvolum</i>	<i>Innhold</i>	<i>Total protein-konsentrasjon</i>	<i>Volum som må tas ut</i>	<i>Final total protein-konsentrasjon</i>
A+W OMV + Al(OH) <sub>3</sub>	6000 µl	Bivalent 003 + 002W with aluminium and thiomersal	106 µg protein/ml	2,264 ml	<b>40 µg protein/ml</b>
		Fosfatbuffersalt/vann pH 7,2	0	3,736 ml	
A+W OMV (uten adj)	6000 µl	A+W OMV i sukrose (uten adj)	1000 µg protein/ml	240 µl	<b>40 µg protein/ml</b>
		Fosfatbuffersaltvann pH 7,2	0	5,760 ml	

## **4. Immuniseringsoppsett**

Balb/cJ BomTac og C57/BL/6J BomTac. Hunmus. 5-6 uker gamle.

6 mus i 6 bur, 5 mus i 4 bur.

Subkutan injeksjon (s.k.)

Monitorering, merking, immunisering og tapping utføres av Avdeling for dyreforsøk (ADFD).

---

Immunisering på dag 0, 21 og 42.  
Blodprøver på dag 0, 21, 42 og 56.

<i>Bur</i>	<i>Mus</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Vaksiner</i>	<i>Dose protein/mus per immunisering</i>	<i>Injisert volum</i>
1-2	Balb/c	1	A+W OMV + Al(OH) <sub>3</sub>	8 µg	0,2 ml s.k.
3-4	C57/Black	2	A+W OMV + Al(OH) <sub>3</sub>	8 µg	0,2 ml s.k.
5-6	Balb/c	3	A+W OMV (uten adj)	8 µg	0,2 ml s.k.
7-8	C57/Black	4	A+W OMV (uten adj)	8 µg	0,2 ml s.k.
9	Balb/c	5	Placebo (Fosfatbuffersaltvann)	0	0,2 ml s.k.
10	C57/Black	6	Placebo (Fosfatbuffersaltvann)	0	0,2 ml s.k.



## Vedlegg 3: Protokoll museforsøk 2

### Museforsøk 2

**Protokoll: Vaksinerings av mus med A+W135 OMV meningokokkvaksine fra stamme Mk499/03 (serogruppe A) og Mk222/02 (serogruppe W135) produsert ved Finlay Institute på Cuba, Menveo® gruppe A, C, W135,Y konjugatvaksine produsert av Novartis, og Mencevax® gruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine produsert av GlaxoSmithKline.**

#### 1. Mål

Sammenligne antistoffrespons i NMRI-mus etter en og to doser med 1/10 av human dose av henholdsvis:

1) bivalent A+W135 OMV vaksine med 2) A+C+W135+Y konjugatvaksine, 3) A+C+W135+Y ren polysakkaridvaksine og 4) Aluminiumhydroksid-adjuvans

#### 2. Tidsskjema

<i>Aktivitet</i>	<i>Dato</i>
0-prøve + 1.immunisering	Torsdag 18.november (d0)
Blodprøve + 2.immunisering	Torsdag 9.desember (d21)
Tomtapping	Tirsdag 21.desember (d33)

#### 3. Tillaging av vaksiner

##### 3.1. Utgangsmaterialer

<i>Nr</i>	<i>Preparat</i>	<i>Konsentrasjon</i>	<i>Produsert</i>
1	Bivalent 003A + 002W. Bivalent vaccine, strains 499 and 222 respectively, with aluminum and thiomersal.	106 µg protein/ml 3.6 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub> 0.013% thiomersal.	Februar 2010 på Finlay Institute, Cuba. Mottatt 17.09.2010 av Einar Rosenqvist
2	Menveo® gruppe A, C, W135 og Y konjugatvaksine. Oligosakkarid konjugert til <i>Corynebacterium diphtheriae</i> CRM <sub>197</sub> protein	0,5 ml vaksine inneholder MenA oligosakkarid 10 µg, MenC oligosakkarid 5 µg, MenW135 oligosakkarid 5 µg og MenY oligosakkarid 5 µg	Novartis Vaccines Batch nr. M10068
3	Mencevax® gruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine	0,5 ml vaksine inneholder 50 µg av hvert av polysakkaridene fra gruppe A, C, W135 og Y.	GlaxoSmithKline Biologicals Batch nr. A83CA078D
4	Alhydrogel®: Aluminiumhydroksid (Al(OH) <sub>3</sub> )	10 mg Al <sup>3+</sup> /ml (tilsvarer 29 mg Al(OH) <sub>3</sub> /ml)*	Brenntag Biosector A/S Batch nr: 4360

5	Fosfatbuffersaltetvann 0,01M pH 7,2 (Dr.Kornstad)	-	Produsert FHI Substratlab. 3.mai 2010 (batch 1005004)
---	--	---	--

\*Mw Al(OH)<sub>3</sub>: 78 g/mol Mw Al<sup>3+</sup>: 27 Forhold: 78/27=2,9

### **3.2. Ønskede doser og konsentrasjoner**

<i>Vaksine</i>	<i>Injisert volum</i>	<i>Dose/mus (1/10 av humandose)</i>	<i>Konsentrasjon vaksine</i>
Bivalent 003A + 002W vaksine	0,2 ml	2,5 µg protein av hvert A og W135 OMV (totalt 5 µg )  Inneholder 1:40 protein: Al(OH) <sub>3</sub> = 200 µg Al(OH) <sub>3</sub>	12,5 (A) + 12,5 (W135) µg protein/ml.  (Totalt 25 µg protein/ml)
Menveo® Gruppe A, C, W135 og Y konjugatvaksine	0,2 ml	1+0,5+0,5+0,5 µg av henholdsvis A, C, W135 og Y oligosakkarid	5 µg (A) + 2,5 µg (A+W135+Y) oligosakkarid/ ml  (Totalt 12,5 µg oligosakkarid/ml)
Mencevax® gruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine	0,2 ml	5+5+5+5 µg av A, C, W135 og Y polysakkarid	25 µg av hvert polysakkarid/ml  (Totalt 100 µg polysakkarid/ml)
Placebo med Al(OH) <sub>3</sub>	0,2 ml	200 µg Al(OH) <sub>3</sub>	1000 µg Al(OH) <sub>3</sub> /ml

### **3.1.Fortynning av vaksiner**

Fortynninger utføres i LAF-benk og aseptisk labteknikk benyttes. Prosedyren gjentas før hver vaksinerings (2 doser).

Beregnet volum for vaksinerings:

0,2 ml\*12 mus = 2,4 ml A+W OMV vaksine med Al(OH)<sub>3</sub>

0,2 ml\*12 mus = 2,4 ml Menveo® gruppe A, C, W135 og Y konjugatvaksine

0,2 ml\*12 mus = 2,4 ml Mencevax® gruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine

0,2 ml\*6 mus = 1,2 ml Placebo med Al(OH)<sub>3</sub>

Lager 4 ml av hver vaksine.

Fortynning gjøres i 15 ml sterile plastrør.

<i>Fortynnede vaksiner</i>	<i>Nødvendig sluttvolum</i>	<i>Innhold</i>	<i>Utgangskonsentrasjon</i>	<i>Volum som må tas ut</i>	<i>Final konsentrasjon</i>
Bivalent 003A + 002W vaksine	4 ml	Bivalent 003A + 002W vaksine	Totalt 106 ≈ 100 µg protein/ml	1000 µl	<b>Totalt 25 µg protein/ml</b>
		Fosfatbuffersalt/ vann pH 7,2	-	3000 µl	
Menveo® gruppe A, C, W135 og Y konjugatvaksine	4 ml	Menveo® Gruppe A, C, W135 og Y konjugatvaksine	Totalt 50 µg oligosakkarid/ml (25 µg/0,5 ml)	1000 µl	<b>Totalt 12,5 µg oligosakkarid/ml</b>
		Fosfatbuffersalt/ vann pH 7,2	-	3000 µl	
Mencevax® gruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine	4 ml	Mencevax® gruppe A, C, W135 og Y polysakkaridvaksine	Totalt 400 µg polysakkarid/ml (200 µg/0,5 ml)	1000 µl	<b>Totalt 100 µg polysakkarid/ml</b>
		Fosfatbuffersalt/ vann pH 7,2	-	3000 µl	
Placebo med Al(OH) <sub>3</sub>	3 ml	Alhydrogel®: Aluminiumhydroksid (Al(OH) <sub>3</sub> )	29 mg Al(OH) <sub>3</sub> /ml	104 µl	<b>1000 µg Al(OH)<sub>3</sub>/ml</b>
		Fosfatbuffersalt/ vann pH 7,2	-	2896 µl	

#### **4. Immuniseringsoppsett**

42 NMRI hunmus. 5-6 uker gamle.

6 mus i 7 bur.

Subkutan injeksjon (s.k.).

Monitorering, merking, immunisering og tapping utføres av Avdeling for dyreforsøk (ADFD).

Immunisering på dag 0 og 21.

Blodprøver på dag 0, 21 og 33.

<i>Bur</i>	<i>Mus</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Vaksiner</i>	<i>Dose per mus per immunisering</i>	<i>Injisert volum</i>
1-2	12 NMRI	156	A+W <sub>135</sub> OMV vaksine	5 µg protein (2,5µg A + 2,5µg W <sub>135</sub> )	0,2 ml s.k.
3-4	12 NMRI	157	A+C+W <sub>135</sub> +Y konjugatvaksine	1+0,5+0,5+0,5 µg av henholdsvis A, C, W <sub>135</sub> og Y oligosakkarid	0,2 ml s.k.
5-6	12 NMRI	158	A+ C+W <sub>135</sub> +Y polysakkaridvaksine	5+5+5+5 µg av A, C, W <sub>135</sub> og Y polysakkarid	0,2 ml s.k.
7	6 NMRI	159	Placebo med Al(OH) <sub>3</sub>	200 µg Al(OH) <sub>3</sub>	0,2 ml s.k.

---

## Vedlegg 4: Abstract til muntlig presentasjon

Akseptert abstract til muntlig innlegg under konferansen

*Neisseria Vaccines 2011*, 29.mai-3.juni 2010, Varadero, Cuba:

### **Effects of adjuvant, mouse strain and dose regimen on immune responses in mice immunized with a meningococcal A+W<sub>135</sub> outer membrane vesicle vaccine**

Marianne Arnemo\*<sup>1</sup>, K. Bolstad, L. M. Næss<sup>1</sup>, A. Aase<sup>1</sup>, G. Tunheim<sup>1</sup>, G. Norheim<sup>1</sup>, A. Mandiarote<sup>2</sup>, D. Gonzalez<sup>2</sup>, L. Garcia<sup>2</sup>, E. Rosenqvist<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Norwegian Institute of Public Health (NIPH), Oslo, Norway, <sup>2</sup>Finlay Institute, Havana, Cuba.

**Background and aim:** An outer membrane vesicle (OMV) vaccine from representative group A and W<sub>135</sub> strains from Africa has been produced at Finlay Institute. The immunogenicity of this vaccine was tested with and without adjuvant in two different mouse strains at NIPH to reveal the importance of a third dose, adjuvant and choice of mouse strain.

**Methods:** Groups of Balb/c and C57/Black mice were immunized with the A+W<sub>135</sub> OMV vaccine, with and without aluminum hydroxide adjuvant (1:40). The mice received 3 doses with three weeks interval of 4+4 µg (A+W<sub>135</sub>) OMV protein/dose s.c. Blood samples were collected on day 0, 21, 42 and 56. Immune responses were tested by ELISA and by immunoblotting against A and W<sub>135</sub> OMVs.

**Results:** For the groups receiving the OMV vaccine with adjuvant, there were detected high levels of IgG antibodies after immunization. There was a significant increase in IgG antibody response from first to second dose, but not from second to third dose. For mice that did not receive adjuvant, the IgG antibody response increased first after second and third dose. There was no significant difference in IgG antibody response between mouse strains.

**Conclusion:** Adsorption of OMVs to aluminum hydroxide is important for the immune response in mice. Two doses of OMV with aluminum hydroxide adjuvant seem to be sufficient for high IgG antibody response. The choice of mouse strains in this trial did not seem to influence the results significantly.

## Vedlegg 5: Abstract til poster

Akseptert abstract til poster under konferansen *Neisseria Vaccines 2011*, 29.mai-3.juni 2010, Varadero, Cuba.

### **Comparison of immunogenicity of a meningococcal A and W<sub>135</sub> outer membrane vesicle vaccine with A, C, Y, W<sub>135</sub> meningococcal conjugate and polysaccharide vaccines.**

Marianne Arnemo\*<sup>1</sup>, L. M. Næss<sup>1</sup>, L. Nome<sup>1</sup>, K. Bolstad<sup>1</sup>, A. Aase<sup>1</sup>, A. Mandiarote<sup>2</sup>, D. Gonzalez<sup>2</sup>, G. Tunheim<sup>1</sup>, L. Garcia<sup>2</sup>, G. Norheim<sup>1</sup>, E. Rosenqvist<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Norwegian Institute of Public Health (NIPH), Oslo, Norway, <sup>2</sup>Finlay Institute, Havana, Cuba.

**Background and aim:** Serogroups A and W<sub>135</sub> meningococci are the main causes of meningococcal disease in sub-Saharan Africa. An outer membrane vesicle (OMV) vaccine from representative group A and W<sub>135</sub> strains has been produced at Finlay Institute, and the immunogenicity in mice of this vaccine was compared with conjugate and polysaccharide vaccines at NIPH. Clinical trial of this OMV vaccine is planned in Cuba later this year.

**Methods:** NMRI mice were immunized with either preclinical batches of A+W<sub>135</sub> OMV vaccine, or with commercially available A+C+W<sub>135</sub>+Y conjugate vaccine (Menveo®, Novartis) or A+C+W<sub>135</sub>+Y polysaccharide vaccine (Mencevax®, GlaxoSmithKline). The mice received 2 doses of 1/10 of a human dose with three weeks interval. Blood samples were collected on days 0, 21 and 33. Immune responses were tested by ELISA, and by serum bactericidal (SBA) and opsonophagocytosis assays (OPA).

**Results:** High levels of IgG antibodies against both OMVs were detected in mice receiving the OMV vaccine. The conjugate vaccine induced IgG antibodies against A and W<sub>135</sub> polysaccharide, whereas no IgG antibodies were detected in mice receiving plain polysaccharide vaccine. High SBA titers were detected in mice after receiving both one and two doses of OMV vaccine. No response was detected in SBA after one dose of conjugate or polysaccharide vaccine. Significant higher SBA and OPA titers were detected in mice immunised with OMV vaccine than in those immunised with conjugate vaccine.

**Conclusion:** The A+W<sub>135</sub> OMV vaccine induces high levels of functional antibodies in mice and may be an alternative or a supplement to conjugate and polysaccharide vaccines for Africa.