

Outer membrane vesicle-vaccins; nieuwe bouwstenen voor vaccinontwikkeling

Jeroen Langereis en Marien de Jonge

Samenvatting

Vaccinaties hebben in de afgelopen vijftig jaar meer dan 150 miljoen mensenlevens gered, met name kinderen die toegang hebben tot nationale vaccinatieprogramma's. De eerste generatie vaccins was gebaseerd op afgedode of verzwakte bacteriën en virussen. Later volgden subunitvaccins, bestaande uit gezuiverde eiwitten of polysachariden, en zeer recent zijn de RNA-vaccins geïntroduceerd. Een relatief nieuw type vaccin is gebaseerd op 'outer membrane vesicles' (OMV's). OMV's zijn kleine blaasjes die spontaan afsnoeren van het buitenmembraan van gramnegatieve bacteriën en daardoor buitenmembraaneiwitten bevatten die als belangrijke antigenen bescherming kunnen opwekken. OMV-vaccins hebben voor- en nadelen ten opzichte van andere type vaccins. In dit overzichtsartikel geven we uitleg over de geschiedenis en de toepassing van OMV-vaccins. Verder belichten we hun voor- en nadelen en schetsen we de stand van zaken in de ontwikkeling van nieuwe OMV-vaccins, met speciale aandacht voor niet-typeerbare *Haemophilus influenzae* als pathogeen waarvoor nog geen vaccin beschikbaar is.

Summary

Vaccinations have saved more than 150 million lives over the past fifty years, particularly among children with access to national immunization programs. The first generation of vaccines was based on inactivated or attenuated bacteria and viruses. These were followed by subunit vaccines, consisting of purified proteins or polysaccharides, and more recently, RNA vaccines have been introduced. A relatively new type of vaccine is based on outer membrane vesicles (OMVs). OMVs are small vesicles that spontaneously bud off from the outer membrane of Gram-negative bacteria and therefore contain outer membrane proteins that can serve as key antigens to induce protective immunity. OMV-based vaccines have both advantages and disadvantages compared to other types of vaccines. In this overview article, we provide an overview of the history and application of OMV

vaccines. Furthermore, we discuss their benefits and limitations and summarize the current state of development of new OMV-based vaccines, with special attention to non-typeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen for which no vaccine is yet available.

Vaccinatie en het effect op verbeterde overleving en gezondheid

Vaccinatie is een van de meest kosteneffectieve gezondheidsinterventies ooit, waarbij een investering van 1 dollar een economische opbrengst van 16 tot 44 dollar kan genereren [1]. Ook in Nederland laten analyses van het RIVM zien dat de baten van het Rijks Vaccinatie Programma (RVP) de kosten ruimschoots overtreffen, mits de kosten van de vaccines niet te hoog zijn [2,3]. In 1974 werd het Expanded Programme on Immunization (EPI) door de Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) geïnitieerd om de bescherming via vaccinatie voor iedereen toegankelijk te maken. Wereldwijd heeft vaccinatie de laatste 50 jaar naar schatting 154 miljoen sterfgevallen voorkomen [4]. Een vaccinatie is erop gericht om het menselijk lichaam immunologisch voor te bereiden om een infectie met een ziekteverwekker te voorkomen of het klinisch beloop gunstig te beïnvloeden. Vaccins maken gebruik van het vermogen van het immuunsysteem om een pathogeen te herkennen en daarop te reageren, maar ook om deze reactie te onthouden, beter bekend als het immunologisch geheugen. Het induceren van dit immunologisch geheugen is sterk afhankelijk van het type vaccin, de dosis en het aantal toedieningen, maar ook van de immunusstatus van de ontvanger, de reeds aanwezige antistoffen tegen de vaccinantigenen en de leeftijd van de ontvanger.

In de afgelopen eeuwen zijn er verschillende type vaccins getest en gebruikt [5]. De eerste vaccins waren

Radboudumc, Laboratorium Medische Immunologie, Nijmegen, dr. J.D. Langereis, medisch immunoloog; prof. dr. M.I. de Jonge, hoofd Laboratorium Medische Immunologie. Correspondentieadres: dr. J.D. Langereis (Jeroen.Langereis@radboudumc.nl).

gebaseerd op verzwakte of afgedode pathogenen, zoals het mazelen- en het kinkhoestvaccin. Later kwamen hier de subunitvaccins bij, zoals vaccins op basis van gedetoxificeerde toxines (tetanus en difterie) of 'virus-like particles' (hepatitis B) vaccins en polysacharide-conjugaatvaccins (*Haemophilus influenzae* type B, meningokokken en pneumo-kokken). In 2020 hebben RNA-vaccins tijdens de SARS-CoV2-pandemie een vlucht genomen. In dit overzichtsartikel willen wij de ontwikkelingen van 'outer membrane vesicles' (OMV)-gebaseerde vaccins onder de aandacht brengen, die met name gebruikt kunnen worden voor bacteriële pathogenen.

Outer membrane vesicles, wat zijn dat?

Grampositieve en gramnegatieve bacteriën onderscheiden zich door een verschil in samenstelling van de celwand, wat de basis is voor de gramkleuring, omdat deze peptidoglycaan aankleurt. Gram-positieve bacteriën hebben een dikke peptidoglycaan laag en een enkel celmembraan, wat zorgt voor een paarse kleur. Gramnegatieve bacteriën hebben twee membranen, een binnenmembraan en een buitenmembraan met daartussen een dunne laag peptidoglycaan. Veel gramnegatieve bacteriën maken tijdens het groeien OMV's, waarschijnlijk als gevolg van een onbalans tussen celgroei en de aanmaak van het buitenmembraan, waarbij er te veel buitenmembraan wordt gemaakt. Het te veel aangemaakte buitenmembraan wordt vervolgens afgesnoerd en vrijgelaten als OMV's. Deze OMV's bevatten veel buitenmembraneiwitten, belangrijke immunogene antigenen, waardoor ze zeer geschikt zijn als vaccinformulering. Aan de natuurlijke productie van OMV's door bacteriën worden verschillende functies toegeschreven, zoals het overbrengen van virulentiefactoren, de vorming van biofilms en het ontstaan van antibioticumresistentie door DNA-overdracht [6].

OMV's zijn een afspiegeling van het buitenmembraan en bevatten verschillende buitenmembraneiwitten die potentieel goede vaccinantigenen zijn. Daarnaast bevatten OMV's zogeheten 'pathogen-associated molecular patterns' (PAMP's), zoals lipo-oligosacharide (LOS) of lipopolysacharide (LPS), peptidoglycaan en lipoproteïnes. Deze PAMP's kunnen afzonderlijk van elkaar herkend worden door specifieke receptoren op immuuncellen, wat leidt tot immuunactivatie en daardoor zorgt voor intrinsieke adjuvantactiviteit van de OMV's. Een belangrijk voordeel van

OMV's ten opzichte van bijvoorbeeld gezuiverde eiwitten is dat met name de buitenmembraneiwitten in hun natuurlijke vorm (conformatie) in de OMV's aanwezig zijn. Hierdoor komt de immunoreactie tegen deze buitenmembraneiwitten beter overeen met die van de natuurlijke reactie na infectie. Ook worden er door vaccinatie met OMV's antistoffen opgewekt tegen het LPS/LOS, wat naast de eiwitantigenen kan bijdragen aan een effectieve beschermende werking van het vaccin.

OMV's zijn tussen de 20 en 300 nm groot en kunnen gemakkelijk worden opgenomen door fagocyten, zoals macrofagen en dendritische cellen, door middel van endocytose. Deze fagocyten spelen een cruciale rol in de antigeenpresentatie. Na opname worden delen van de antigenen gepresenteerd aan de buitenkant van deze cellen, wat leidt tot T- en B-celactivatie.

Productie van OMV's

OMV's kunnen op verschillende manieren worden geproduceerd en deze productiemethoden beïnvloeden de samenstelling van de membraaneiwitten, de lipiden en het LOS/LPS. Er bestaat echter geen eenduidige terminologie voor de verschillende typen OMV's. In dit overzichtsartikel gebruiken we daarom de terminologie zoals beschreven in *tabel 1*. Spontane OMV's (sOMV's) zijn OMV's die tijdens de groei van bacteriën op natuurlijke wijze worden gevormd. In veel gevallen is dit niet efficiënt genoeg voor OMV-vaccinproductie. Om de opbrengst van OMV-productie te verbeteren zonder de antigeenexpressie sterk te veranderen, kunnen bacteriën worden behandeld met hoge-frequentiegeluidsgolven (sonificatie) of door het binden van tweewaardige metaalionen (chelatie) met EDTA, waardoor de stabiliteit van het buitenmembraan wordt verlaagd. Deze OMV's worden natuurlijke ('native') OMV's (nOMV's) genoemd.

Een andere manier om de aanmaak van OMV's te bevorderen is door middel van genetische modificatie van de bacteriestam. De hierbij gevormde OMV's worden 'mutant-derived' OMV's (mOMV's) genoemd. Voor de mOMV's worden vaak mutaties geïntroduceerd in genen die coderen voor eiwitten die de koppeling vormen tussen het buitenmembraan, het binnenmembraan en de peptidoglycaanlaag, wat leidt tot een verhoogde afgifte van OMV's. Daarnaast kunnen er mutaties aangebracht worden om andere redenen dan productieverhoging, bijvoorbeeld in genen die betrokken zijn bij de LPS/LOS-synthese.

Deze mutaties worden aangebracht om LPS/LOS, ook wel 'endotoxine' genoemd, minder reactief te maken en zo eventuele bijwerkingen van het vaccin te voorkomen.

Het mOMV-gebaseerde platform 'Generalized modules for membrane antigens' (GMMA) is ontwikkeld door GSK en wordt gebruikt voor vaccinproductie voor meerdere pathogenen. Dit GMMA-platform maakt gebruik van genetisch gemodificeerde bacteriën die een minder toxisch LPS tot expressie brengen, en van andere mutaties die ervoor zorgen dat de juiste vaccinantigenen, waaronder eiwitten en LPS, tot expressie komen (zie *tabel 1*) [7,8].

Naast sOMV's, nOMV's en mOMV's zijn er ook 'detergent-extracted OMV's' (dOMV's), die worden geëxtraheerd met behulp van een zeepachtige stof. Door deze zeepachtige stof te mengen met bacteriën lost het buitenmembraan gedeeltelijk op, waardoor

OMV's worden gevormd. Het voordeel van deze dOMV's is dat de opbrengst hoog is en de zeepoplossing ook een groot deel van LPS extraheert, waardoor de reactogeniciteit afneemt en daarmee eventuele bijwerkingen kunnen worden voorkomen. Het nadeel is dat deze procedure er ook voor zorgt dat lipoproteïnes uit het buitenmembraan verwijderd worden. Deze lipoproteïnes zijn vaak belangrijke immunogene antigenen met een sterke adjuvantwerking; het verwijderen van deze eiwitten kan dus nadelig zijn. Deze dOMV's worden bijvoorbeeld toegepast in het *Neisseriameningitidis*-serogroep B-vaccin Bexsero.

Geregistreerde OMV-vaccins

Er zijn verschillende OMV-vaccins ontwikkeld en geregistreerd, om te beschermen tegen *N. meningitidis* serogroep B en uitbraken in te dammen.

Tabel 1. Vergelijking van verschillende typen OMV's.

	Voordelen	Nadelen
sOMV	<ul style="list-style-type: none"> • Antigenen in natuurlijke ('native') vorm op de OMV's 	<ul style="list-style-type: none"> • Lage opbrengst • Aanpassingen aan LPS nog noodzakelijk
nOMV	<ul style="list-style-type: none"> • Antigenen in natuurlijke ('native') vorm op de OMV's • Hogere opbrengst 	<ul style="list-style-type: none"> • Aanpassingen aan LPS nog noodzakelijk
mOMV / GMMA	<ul style="list-style-type: none"> • Antigenen in natuurlijke ('native') vorm op de OMV's • Hogere opbrengst • Modificatie LPS en vaccinantigenen mogelijk door genetische aanpassing 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetische modificatie kan expressie van membraaneiwitten beïnvloeden
dOMV	<ul style="list-style-type: none"> • Zeer hoge opbrengst • Lagere toxiciteit 	<ul style="list-style-type: none"> • Extractie (lipo)proteïnes uit het membraan • Verlaagde intrinsieke adjuvantactiviteit
OMV-carrier	<ul style="list-style-type: none"> • Belading met geselecteerde (heterologe) antigenen 	<ul style="list-style-type: none"> • Lagere antigeendichtheid • Aanpassingen aan LPS nog noodzakelijk

Het VA-MENGOC-BC-vaccin was het eerste geregistreerde OMV-gebaseerde vaccin voor *N. meningitidis*-serogroep B. Het gebruik ervan was echter beperkt tot het Cubaanse Nationale Vaccinatieprogramma, waar het leidde tot een reductie van meer dan 95 procent in het aantal invasieve *N. meningitidis*-serogroep B-infecties [17].

Het MenBvac-vaccin is ontwikkeld door de Norwegian Institute of Public Health en is tussen 1988 en 1991 met succes ingezet om een *N. meningitidis*-serogroep B-uitbraak in Noorwegen te bestrijden. De bescherming bleek echter kortdurend en het vaccin is inmiddels niet langer geregistreerd [18]. Het MenZB-vaccin werd gebruikt tijdens een *N. meningitidis*-serogroep B-uitbraak in Nieuw-Zeeland, waar klinische studies een beschermingsgraad van 77 procent aantoonde [19]. MenZB is niet langer geregistreerd, maar is opgenomen in het viercomponentenvaccin Bexsero®. Dit Bexsero-vaccin is het meest bekende en breed toegepaste *N. meningitidis*-serogroep B-vaccin, dat naast de dOMV's ook drie gezuiverde recombinante eiwitten NHBA, NadA en fHBP bevat. Bexsero is sterk immunogeen, mede door de aanwezigheid van dOMV's, waardoor de ontvangers van het vaccin vaak last krijgen van koorts [20]. Bexsero is in veel landen, waaronder Engeland, Ierland en Duitsland, opgenomen in de vaccinatieprogramma's voor kinderen, waar de introductie heeft geleid tot een sterke reductie van invasieve *N. meningitidis*-serogroep B-infecties [21,22]. Naast bescherming tegen *N. meningitidis*-serogroep B lijkt Bexsero mogelijk kruisreactieve immuniteit te bieden tegen andere *N. meningitidis*-serogroepen [21,23] en mogelijk zelfs tegen *N. gonorrhoeae* [24]. Het Bexsero-vaccin wordt daarnaast ook toegepast bij risicogroepen zoals patiënten met immuundeficiënties of patiënten die complement-remmende medicatie gebruiken. Hoewel deze patiënten een goede antilichaamrespons vertonen na vaccinatie met Bexsero, lijkt de bescherming mogelijk beperkt door de verminderde of volledige afwezigheid van complementactiviteit [25,26]. Uit meerdere studies blijkt dat Bexsero een goede bescherming biedt tegen *N. meningitidis*-serogroep B invasieve ziekte, maar vaccinatie leidt niet tot reductie in dragerschap, waardoor er geen sprake is van 'herd immunity' in de populatie [27].

Het PedvaxHib®-vaccin is een vaccin met dOMV's van *N. meningitidis*-serogroep B met daaraan gekoppeld het type B polysaccharide van *Haemophilus influenzae*.

PedvaxHib heeft een efficiëntie van 93-100 procent in het voorkomen van *H. influenzae* type B-infecties in een hoogrisicopopulatie [15], maar leidt niet tot bescherming tegen *N. meningitidis*-serogroep B-infecties.

OMV-vaccins in klinische testfase

Op dit moment is Bexsero het enige breed toegepaste OMV-vaccin. Er zijn verschillende type OMV-vaccinplatforms die op dit moment voor verschillende pathogenen worden onderzocht. Dit artikel beoogt geen volledig overzicht te geven van alle op OMV's-gebaseerde vaccins die zich in de klinische testfasen bevinden, maar vermeldt wel dat er momenteel meerdere OMV-vaccins voor verschillende pathogenen worden getest in fase I- en -II-klinische studies (zie tabel 2).

GMMA, een platform ontwikkeld door GSK, wordt gebruikt voor de productie van OMV's van onder andere *Shigella*, non-typhoidal *Salmonella* en *Neisseria gonorrhoeae*. Deze vaccins worden op dit moment in klinische studies getest (zie tabel 2). Het iNTS-GMMA-vaccin is een bivalent vaccin dat bestaat uit *Salmonella Enteritidis*- en *Salmonella Typhimurium*-OMV's en is primair gericht op het opwekken van antistoffen tegen het O-antigeen van deze pathogenen [28].

Het iNTS-TCV is combinatievaccin bestaande uit het bivalente iNTS-GMMA en het glycoconjugaatvaccin TyphiBEV (Biological E, India), dat ontwikkeld wordt om te beschermen tegen tyfus [29]. De combinatie van deze twee vaccins leidde bij muizen tot een brede bescherming tegen een breed panel van relevante heterologe *Salmonella*-stammen [29]. Het altSonflex1-2-3-vaccin is een viercomponentenvaccin bestaande uit OMV's van drie *S. flexneri*-stammen en één *S. sonnei*-stam geadjuveerd met aluminiumhydroxide. Dit altSonflex1-2-3-vaccin is ontworpen om antistoffen op te wekken tegen de verschillende O-antigenen van deze bacteriën [30]. Het NgG-gonokokkenvaccin is gebaseerd op genetisch gedetoxificeerde OMV's van *N. gonorrhoeae*-stam FA1090 [31]. In muizenmodellen toonde het NgG-vaccin een betere bescherming dan het kruisreagerende Bexsero-vaccin met immuniteit die gericht is tegen zowel eiwitten als LOS [31]. Daarnaast worden ook OMV-vaccins met gekoppelde antigenen getest in klinische studies. Een voorbeeld hiervan is het intranasaal toegediende vaccin tegen COVID-19,

Tabel 2. Verschillende OMV-vaccins in klinische testfasen I en II.

Fase	Pathoogeen	Vaccin	Type OMV's	Producent	ClinicalTrials.gov ID
II	Invasieve non-typhoidal <i>Salmonella</i>	iNTS-GMMA	GMMA	GSK	NCT06213506
I/IIa	Invasieve non-typhoidal <i>Salmonella</i> en <i>Salmonella Typhi</i>	iNTS-TCV	GMMA	GSK	NCT05480800
I en II	<i>Shigella spp.</i>	altSonflex1-2-3	GMMA	GSK	NCT05073003 NCT06663436
I/II	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NgG	GMMA	GSK	NCT05630859
I	COVID-19	Avacc 10	mOMV	Intravacc	NCT05604690

Avacc 10 van Intravacc, waarbij het gestabiliseerde SARS-CoV-2-spike-eiwit is gekoppeld aan *N. meningitidis*-serogroep B-OMV's [32].

Niet-typeerbare *H. influenzae* OMV-vaccins

Een pathoogeen dat vooral bij ouderen steeds vaker (invasieve) infecties veroorzaakt is de niet-typeerbare *H. influenzae* (NTHi) [33,34]. De genetische variatie tussen NTHi-stammen is vele malen groter dan bijvoorbeeld bij *H. influenzae* type b [35], wat het lastig maakt om met enkele eiwitantigenen een brede bescherming te bereiken. Daarnaast beschikt *H. influenzae* over genen die via fasevariatie de expressie van eiwitten makkelijk aan en uit kunnen zetten, met name voor eiwitten die betrokken zijn bij de opbouw van het LOS en bij de celadhesie, wat de heterogeniteit van antigenen nog verder vergroot. OMV's zouden een mogelijke oplossing kunnen bieden omdat de multivalente compositie van dit type vaccins de heterogeniteit van antigenen kan compenseren. Hoewel er voor NTHi op OMV-gebaseerde vaccins nog geen klinische studies zijn aangekondigd (zie tabel 2), zijn er wel preklinische data beschikbaar, bijvoorbeeld uit muizenstudies.

NTHi produceert sOMV's, maar genetische modificaties die leiden tot verstoring van het transport van

fosfolipiden van het buitenmembraan of tot het verwijderen van outer membrane protein (Omp) P5 (OmpP5), verhogen de opbrengst van OMV-productie [36]. Intranasale toediening van sOMV's van één NTHi-stam of een mengsel van drie verschillende NTHi-stammen leidde tot inductie van kruisreagerende antistoffen en bescherming tegen nasofaryngeale kolonisatie in muizen [37]. Daarnaast laten NTHi-mOMV's met overexpressie van het celadhesie-eiwit Hia zien dat deze brede bescherming mogelijk is, hoewel een deel van de NTHi-stammen nog steeds onvoldoende wordt herkend [38]. In deze studie werd ook aangetoond dat fasevariabele genen van *H. influenzae* kunnen worden uitgeschakeld onder druk van vaccineïnduceerde immuniteit tegen celadhesie-eiwitten, wat benadrukt dat effectieve immuniteit tegen NTHi gericht moet zijn op meerdere antigenen.

Conclusie

Het aantal geregistreerde OMV-vaccins is nog zeer beperkt, maar er zitten verschillende kandidaat-OMV-vaccins in de ontwikkelingspijplijn, met name tegen bacteriële pathogenen. OMV-vaccins bieden belangrijke voordelen: ze hebben intrinsieke adjuvant-activiteit, een multivalente samenstelling, en kunnen dienen als dragers voor heterologe eiwitten en

polysacchariden. Daartegenover staan enkele uitdagingen. Afhankelijk van het type OMV kunnen de productiemethoden relatief complex zijn, en de aanwezigheid van componenten zoals LOS/LPS kan leiden tot verhoogde reactogeniciteit, waardoor bijwerkingen zoals koorts vaker kunnen optreden. Dit zou de bereidheid tot vaccinatie negatief kunnen beïnvloeden.

Voor *H. influenzae* vormt de genetische heterogeniteit een belangrijk obstakel voor de ontwikkeling van een breed werkend vaccin. Een OMV-vaccin zou, dankzij de multivalente samenstelling, mogelijk een oplossing kunnen bieden.

Referenties

1. Ozawa S, Clark S, Portnoy A, et al. Return On Investment From Childhood Immunization In Low- And Middle-Income Countries, 2011-20. *Health Aff (Millwood)*. 2016;35(2):199-207. doi:10.1377/hlthaff.2015.1086.
2. Kosteneffectiviteits-analyse van vaccinatie tegen influenza in Nederland. Accessed on 10-09-2025; Available from: https://www.rivm.nl/publicaties/kosteneffectiviteits-analyse-van-vaccinatie-tegen-influenza-in-nederland?utm_source=chatgpt.com.
3. Kosteneffectiviteit van vaccinatie tegen pneumokokken en meningokokken infecties bij kinderen. Accessed on 10-09-2025; Available from: https://www.rivm.nl/publicaties/kosteneffectiviteit-van-vaccinatie-tegen-pneumokokken-en-meningokokken-infecties-bij?utm_source=chatgpt.com.
4. Shattock AJ, Johnson HC, Sim SY, et al. Contribution of vaccination to improved survival and health: modelling 50 years of the Expanded Programme on Immunization. *Lancet*. 2024;403(10441):2307-16. doi:10.1016/S0140-6736(24)00850-X.
5. Pollard AJ and Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(2):83-100. doi:10.1038/s41577-020-00479-7.
6. Juodeikis R and Carding SR. Outer Membrane Vesicles: Biogenesis, Functions, and Issues. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2022; 86(4):e0003222. doi:10.1128/membr.00032-22.
7. Berlanda Scorza F, Colucci AM, Maggiore L, et al. High yield production process for Shigella outer membrane particles. *PLoS One*. 2012;7(6):e35616. doi:10.1371/journal.pone.0035616.
8. Rossi O, Pesce I, Giannelli C, et al. Modulation of endotoxicity of Shigella generalized modules for membrane antigens (GMMA) by genetic lipid A modifications: relative activation of TLR4 and TLR2 pathways in different mutants. *J Biol Chem*. 2014;289(36):24922-35. doi:10.1074/jbc.M114.566570.
9. Kesty NC and Kuehn MJ. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into Escherichia coli outer membrane vesicles. *J Biol Chem*. 2004;279(3):2069-76. doi:10.1074/jbc.M307628200.
10. Daleke-Schermerhorn MH, Felix T, Sopova Z, et al. Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80(18):5854-65. doi:10.1128/AEM.01941-14.
11. Huang W, Wang S, Yao Y, et al. Employing Escherichia coli-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against Acinetobacter baumannii infection. *Sci Rep*.

2016;6:37242. doi:10.1038/srep37242.

12. Kuipers K, Daleke-Schermerhorn MH, Jong WS, et al. Salmonella outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. *Vaccine*. 2015;33(17):2022-9. doi:10.1016/j.vaccine.2015.03.010.
13. Huynh DT, Nolfi E, Medfai L, et al. Intranasal delivery of Salmonella OMV's decorated with Chlamydia trachomatis antigens induces specific local and systemic immune responses. *Hum Vaccin Immunother*. 2024;20(1):2330768. doi:10.1080/21645515.2024.2330768.
14. Valguarnera E and Feldman MF. Glycoengineered Outer Membrane Vesicles as a Platform for Vaccine Development. *Methods Enzymol*. 2017;597:285-310. doi:10.1016/bs.mie.2017.06.032.
15. Santosham M, Wolff M, Reid R, et al. The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of Haemophilus influenzae type b polysaccharide and Neisseria meningitidis outer-membrane protein complex. *N Engl J Med*. 1991;324(25):1767-72. doi:10.1056/NEJM199106203242503.
16. Chen L, Valentine JL, Huang CJ, et al. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(26):E3609-18. doi:10.1073/pnas.1518311113.
17. Sierra-Gonzalez VG. Cuban Meningococcal Vaccine VA-MENGOC-BC:30 Years of Use and Future Potential. *MEDICC Rev*. 2019;21(4):19-27. doi:10.37757/MR2019.V21.N4.4.
18. Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*. 1991;338(8775):1093-6. doi:10.1016/0140-6736(91)91961-s.
19. Arnold R, Galloway Y, McNicholas A, O'Hallahan J. Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand. *Vaccine*. 2011;29(40):7100-6. doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.120.
20. Ladhani SN, Campbell H, Parikh SR, et al. The introduction of the meningococcal B (MenB) vaccine (Bexsero(R)) into the national infant immunisation programme--New challenges for public health. *J Infect*. 2015;71(6):611-4. doi:10.1016/j.jinf.2015.09.035.
21. Castilla J, Garcia Cenoz M, Abad R, et al. Effectiveness of a Meningococcal Group B Vaccine (4CMenB) in Children. *N Engl J Med*. 2023;388(5):427-38. doi:10.1056/NEJMoa2206433.
22. Ladhani SN, Andrews N, Parikh SR, et al. Vaccination of Infants with Meningococcal Group B Vaccine (4CMenB) in England. *N Engl J Med*. 2020;382(4):309-17. doi:10.1056/NEJMoa1901229.
23. van den Broek B, Coolen JPM, de Jonge MI, et al. Neisseria meningitidis Serogroup Z Meningitis in a Child With Complement C8 Deficiency and Potential Cross Protection of the MenB-4C Vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2021;40(11):1019-22. doi:10.1097/INF.0000000000003259.
24. Leduc I, Connolly KL, Begum A, et al. The serogroup B meningococcal outer membrane vesicle-based vaccine 4CMenB induces cross-species protection against Neisseria gonorrhoeae. *PLoS Pathog*. 2020;16(12):e1008602. doi:10.1371/journal.ppat.1008602.
25. van den Broek B, van der Flier M, van de Kar N, et al. Eculizumab impairs killing of Neisseria meningitidis serogroup B in atypical hemolytic uremic syndrome patients vaccinated with MenB-4C. *Kidney Int*. 2022;101(6):1293-5. doi:10.1016/j.kint.2022.03.010.
26. Langereis JD, van den Broek B, Franssen S, et al. Eculizumab impairs Neisseria meningitidis serogroup B killing in whole blood despite 4CMenB vaccination of PNH patients. *Blood Adv*. 2020;4(15):3615-20. doi:10.1182/bloodadvances.2020002497.
27. McMillan M, Marshall HS, Richmond P. 4CMenB vaccine and its role in preventing transmission and inducing herd immunity. *Expert Rev Vaccines*. 2022;21(1):103-14. doi:10.1080/14760584.2022.2003708.

28. Skidmore PD, Canals R, Ramasamy MN. The iNTS-GMMA vaccine: a promising step in non-typhoidal Salmonella vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2023;22(1):918-20. doi:10.1080/14760584.2023.2270596.
29. De Simone D, Pinto M, Aruta MG, et al. GMMA-based vaccine candidates against invasive nontyphoidal salmonellosis elicit bactericidal antibodies against a panel of epidemiologically relevant Salmonellae. *Front Immunol*. 2025;16:1610067. doi:10.3389/fimmu.2025.1610067.
30. Rossi O, Citiulo F, Giannelli C, et al. A next-generation GMMA-based vaccine candidate to fight shigellosis. *NPJ Vaccines*. 2023;8(1):130. doi:10.1038/s41541-023-00725-8.
31. Spinsanti M, Monaci E, Romagnoli G, et al. A novel GMMA-based gonococcal vaccine demonstrates functional immune responses in mice. *NPJ Vaccines*. 2025;10(1):146. doi:10.1038/s41541-025-01190-1.
32. van der Ley PA, Zariri A, van Riet E, Oosterhoff D, Kruiswijk CP. An Intranasal OMV-Based Vaccine Induces High Mucosal and Systemic Protecting Immunity Against a SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol*. 2021;12:781280. doi:10.3389/fimmu.2021.781280.
33. Langereis JD, de Jonge MI. Invasive Disease Caused by Nontypeable Haemophilus influenzae. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1711-8. doi:10.3201/eid2110.150004.
34. Nederlands Referentie Laboratorium voor Bacteriële Meningitis ANNUAL REPORT 2023. Accessed on 02-10-2025; Available from: <https://www.amc.nl/web/file?uuid=fe55a128-c554-4779-b1fc-af8bdaf4d059&owner=9423f858-411c-47f3-b97b-98d8118882c1>.
35. De Chiara M, Hood D, Muzzi A, et al. Genome sequencing of disease and carriage isolates of nontypeable Haemophilus influenzae identifies discrete population structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5439-44. doi:10.1073/pnas.1403353111.
36. Roier S, Zingl FG, Cakar F, et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun*. 2016;7:10515. doi:10.1038/ncomms10515.
37. Roier S, Leitner DR, Iwashkiw J, et al. Intranasal immunization with nontypeable Haemophilus influenzae outer membrane vesicles induces cross-protective immunity in mice. *PLoS One*. 2012;7(8):e42664. doi:10.1371/journal.pone.0042664.
38. Winter LE, Barenkamp SJ. Immunogenicity of Nontypeable Haemophilus influenzae Outer Membrane Vesicles and Protective Ability in the Chinchilla Model of Otitis Media. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(10).doi:10.1128/CI.00138-17.