Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mass spectrometry-based degradomics analysis of toxoid vaccines

Michiels, T.J.M.

Citation
Michiels, T. J. M. (2021, September 9). *Mass spectrometry-based degradomics analysis of toxoid vaccines*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3209234

Version:	Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/3209234

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle https://hdl.handle.net/1887/3209234 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Michiels, T.J.M.
Title: Mass spectrometry-based degradomics analysis of toxoid vaccines
Issue Date: 2021-09-09

Appendix

NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING
LIST OF PUBLICATIONS
CURRICULUM VITAE

Nederlandstalige samenvatting

De COVID-19-pandemie heeft het belang van vaccins extra benadrukt. Voor het ontwikkelen van nieuwe vaccins en het optimaliseren van bestaande vaccins is het niet alleen belangrijk om nieuwe vaccinconcepten en analysetechnieken te ontwikkelen, maar evengoed nuttig om te leren van al bestaande, succesvolle vaccins, zoals die tegen difterie en tetanus.

Een belangrijk aspect van alle geneesmiddelen is de kwaliteitscontrole. Waar bij de meeste therapeutische geneesmiddelen *in vitro* analyses volstaan, worden bij vaccins van oudsher veel dierproeven gebruikt. Voor difterie- en tetanusvaccins vinden er, bijna een eeuw na de introductie van deze vaccins, nog dierproeven plaats om de veiligheid en werkzaamheid van elke vaccinpartij aan te tonen. Het in deze dissertatie beschreven onderzoek was gericht op het ontwikkelen van nieuwe *in vitro* testen ter vervanging en vermindering van deze dierproeven.

Difterie- en tetanusvaccins zijn zogeheten toxoïdvaccins. Bijna een eeuw na hun ontwikkeling worden deze vaccins nog op vergelijkbare wijze gemaakt. Difterie en tetanus worden veroorzaakt door toxines die door bacteriën uitgescheiden worden. Door deze toxines te behandelen met formaldehyde kunnen deze onschadelijk worden gemaakt. Deze onschadelijk gemaakte toxines (toxoïden) kunnen worden gebruikt om in mensen (maar ook in dieren) immuniteit op te wekken tegen de zeer giftige toxines. Toxoïdvaccins behoren tot de meest succesvolle vaccins, met zeer goede effectiviteit en veiligheid.

De behandeling met formaldehyde zorgt voor een grote verscheidenheid aan chemische modificaties van verschillende delen van de toxinemoleculen. In hoofdstuk 2 van dit proefschrift worden de belangrijkste chemische modificaties van met formaldehyde behandeld difterietoxine in kaart gebracht. In hoofdstuk 4 beschrijven we een niet eerder beschreven reactie van formaldehyde met twee lysineresiduen. Deze fundamentele onderzoeken naar de werkingsmechanismen van het inactivatieproces kunnen als basis dienen voor het analyseren van met formaldehyde behandelde antigenen.

Voor het vervangen van dierproeven door een *in vitro* test hebben we geprobeerd om een belangrijke stap van het immuunsysteem na te bootsen. Een vroege stap in het opwekken van immuniteit is het activeren van CD4+ T-helper cellen. Dat gebeurt door activatie via een

antigeen-presenterende cel (APC). De APC neemt het antigeen (bijvoorbeeld een toxoïd) op en breekt dit met behulp van enzymen af tot kleinere peptiden. Deze peptiden worden vervolgens via de major histocompatibility complex class II moleculen (MHC-II) aan T-helper cellen gepresenteerd en zorgen met name voor CD4 T-celactivatie. Een kritische stap in dit proces is de enzymatische afbraak van het antigeen door de APC. Als het antigeen wordt afgebroken tot kleinere peptiden kan het gepresenteerd worden door APC's, maar als het te snel wordt afgebroken tot losse aminozuren dan blijft er niks over dat gepresenteerd kan worden. De hypothese aan de basis van dit onderzoek was dat voor een optimale immuunrespons een optimale afbraaksnelheid van het antigeen nodig is. Afwijkingen van het antigen, ontstaan door bijvoorbeeld veranderingen in het productieproces (met name bij de belangrijke behandeling met formaldehyde) of tijdens de opslag, zouden kunnen leiden tot een verandering in afbraaksnelheid. De enzymen betrokken bij de afbraak zouden bijvoorbeeld een bepaalde knipplaats niet meer kunnen herkennen, of door een ontvouwing van een deel van het antigeen zou er een nieuwe knipplaats beschikbaar kunnen komen. In hoofdstuk 3 is gekeken naar de invloed van formaldehydebehandeling van modeleiwitten op de afbraak door één van de belangrijkste enzymen in een APC: cathepsin S. Tegen de verwachting in werden de eiwitten sneller door cathepsin S afgebroken nadat ze door formaldehyde behandeld waren, maar de effecten waren wel specifiek voor de locatie binnen het eiwit. Sommige formaldehydemodificaties zorgden voor langzamere enzymatische afbraak, maar de meeste modificaties zorgden juist voor snellere afbraak van de modeleiwitten. In hoofdstuk 5 en hoofdstuk 6 is deze strategie verder toegepast voor het analyseren van tetanus- en difterietoxoïden. De in deze hoofstukken ontwikkelde test, gebaseerd op enzymatische antigeenafbraak met cathepsin S, bleek zeer gevoelig voor het detecteren van structurele veranderingen in de antigenen. Het was zelfs mogelijk de test uit te voeren in de aanwezigheid van colloïdale aluminiumzouten. Deze aluminiumzouten worden als adjuvans gebruikt voor het verbeteren van de immuunrespons, maar bemoeilijken de meeste conventionele analysemethoden.

In combinatie met andere *in vitro* testen geeft deze enzymatische degradatietest nieuwe inzichten in de kwaliteit van vaccins. Het vervangen van dierproeven is met deze *in vitro* testen binnen handbereik, en difterie- en tetanusvaccins zijn zeer geschikte kandidaten om dit als eerste voor elkaar te krijgen. De nieuwe test zou in de toekomst ook vanaf de ontwikkeling van nieuwe op eiwitantigeen gebaseerde vaccins toegepast kunnen worden; het voorkómen van een *in vivo* test is immers makkelijker dan hem achteraf vervangen.