

**SCHLUSSBERICHT ZU DEN TEILVORHABEN 1 und 2
01.10.1999 bis 30.09.2002**

A. Übergreifende Angaben zum Forschungsverbund FKZ: 01GE9911/7

1. Allgemeine Angaben

Titel: Immuntherapie des Melanoms unter Verwendung Dendritischer Zellen, die mit Genen für Tumorantigene transfiziert wurden

Koordinator: Prof. Dr. med. Gerold Schuler

Dermatologische Klinik mit Poliklinik der Univ. Erlangen-Nürnberg

Hartmannstr.14, D-91052 Erlangen

Tel.: 09131-85-33661 bzw. -32751

Fax.: 09131-85-36175 bzw. -33854

Schuler@derma.imed.uni-erlangen-de

Teilvorhaben : 01 GE 9911/7

Laufzeit: 01.10.1999 - 30.09.2002

B. Angaben zu den Teilvorhaben

Teilvorhaben 01 GE 9911/7 - Universität Erlangen-Nürnberg

Titel: Generation einer RNA-DC Vakzine und Durchführung einer multizentrischen Phase I Studie an Melanompatienten im Stadium IV

Projektleiter: Prof. Dr. med. Gerold Schuler; Prof. Dr. Alexander Steinkasserer

Teilvorhaben 1: Dermatologische Klinik mit Poliklinik der Univ. Erlangen-Nürnberg
Hartmannstr.14, D-91052 Erlangen

Teilvorhaben 2: Prof. Dr. med. Ralph Grassmann

Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität
Erlangen-Nürnberg, Schlossgarten 4, D-91054 Erlangen

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer für das Vorhaben wesentlicher Ereignisse

Teilvorhaben 1

In vitro transkribierte RNA:

Verschiedene Gruppen haben gezeigt, daß die Transfektion von DC mit in vitro transkribierter definierter mRNA bzw. gesamter Tumor-mRNA eine sehr

vielversprechende Methode darstellt um in vivo therapeutisch oder prophylaktisch eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegen Tumoren zu induzieren. Inzwischen ist es gelungen humane Dendritische Zellen (DC), die aus Monozyten generiert wurden, nicht nur mit viralen, sondern ebenso effizient mit nicht-viralen Methoden wie der Electroporation von mRNA zu transfizieren. Mit dieser Methode konnten wir sowohl bei unreifen als auch bei reifen DC Transfektionseffizienzen im Bereich von 70 % bis über 90 % unter Beibehaltung ihrer Viabilität und der DC-typischen Charakteristika erzielen. Die Electroporation von DC in ihrem unreifen Stadium hatte keinen negativen Einfluß auf eine anschließende Maturation der Zellen. Durchflußzytometrisch konnte bereits 3 Stunden nach Electroporation das exprimierte Protein detektiert werden. Kinetische Analysen von DC, die mit verschiedenen mRNAs electroporiert wurden, zeigten unterschiedliche Halbwertszeiten der entsprechenden Proteine. Während Markerproteine wie das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) eine unveränderte Protein-Expression bis zu 96 Stunden zeigte, erreichte die Proteinexpression von DC, die mit definierten mRNA's, codierend für das Influenza Matrix Protein 1 oder die Tumor-Antigene NY-ESO1, Mage-3, MelanA bzw. Survivin, electroporiert wurden, bereits nach 6-10 Stunden das Maximum.

Im Hinblick auf die klinische Anwendung wurde zum einen die Electroporation für eine größere Zellzahl optimiert. Dabei konnten bis zu 40×10^6 DC/ml bei einer Transfektionseffizienz von über 80% eingesetzt werden. Die Ausbeute betrug nach 24 Stunden in vitro Kultur mehr als 60%. Zum anderen wurde die Cyrokonservierung der electroporierten Zellen optimiert und die Zellen bzgl. Ausbeute, phänotypische und funktionelle Charakteristika analysiert. Nach dem Auftauen konnten mehr als 80% der DC wiedergewonnen werden. Diese DC zeigten auch nach 48 Stunden in vitro Kultur den gleichen DC-Phänotyp wie nicht eingefrorene Zellen. Ebenso behielten die aufgetauten DC ihre T-Zell stimulatorische Fähigkeit bei. Für die GMP-Produktion konnten die RNA-Expressionsvektoren für die Tumor-Antigene MAGE-3, MelanA und Survivin fertig gestellt werden. Die entsprechenden in vitro transkribierten RNA's wurden unter GMP-Bedingungen hergestellt und werden seit Mitte des Jahres 2003 für die klinische Studie verwendet. **Dies ist die erste DC-Studie weltweit, welche mit definierten RNA's bei Melanompatienten durchgeführt wird.** Ein ausführlicher Bericht bezüglich RNA Generation und DC-Electroporation findet sich im Anhang A.

DC-Maturation:

Die Vakzinierung mit DC ist ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie. Eine wichtige Eigenschaft der DC ist deren Reifungszustand. Erst kürzlich wurde mehr und mehr klar, dass sich DC nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli nicht nur in ihrem Phänotyp, sondern auch in ihrer stimulatorischen Kapazität unterscheiden. Deswegen haben wir verschiedene beschriebene DC-Reifungsstimuli im Detail verglichen.

Es wurden Parameter wie Morphologie, Stabilität, Resistenz gegen Apoptose, Phänotyp, Zytokinproduktion, MHC-Peptid-Stabilität und T-Zell-Stimulation untersucht. Wir konnten somit verschieden gereifte DC anhand objektiver Kriterien vergleichen. Mit diesen Daten konnte die Qualität der DC für künftige klinische Studien weiter verbessert werden.

Optimierung der DC-Kultur:

Nachdem mittels Impfung mit autologen DC sowohl Tumor-spezifische T Zell-Antworten als auch Tumorregressionen beobachtet werden konnten, sind in Zukunft größere Studien geplant, um die Wirksamkeit dieser neuartigen Behandlungsmethode im Vergleich zu Standardtherapien zu untersuchen. Der Erfolg dieser Therapie hängt aber auch vor allem an der praktischen Durchführbarkeit ab. Die bisherigen Kulturmethoden zur Gewinnung ausreichender Mengen an DC in optimaler Qualität und unter Richtlinien zur Arzneimittelherstellung (GMP) erfordern einen großen logistischen Aufwand und sind sehr arbeitsintensiv. Wir haben daher die Kulturmethode basierend auf den bisherigen Erfahrungen sukzessive optimiert und ein Verfahren entwickelt, womit eine gesamte Leukapherese in einem weitgehend geschlossenen System verarbeitet werden kann. Der Einsatz dieser sogenannten „Cell factories“ hat zu einer dramatischen Reduzierung des Arbeitsaufwandes zur DC-Herstellung geführt (bei gleicher Qualität der hergestellten Zellen) und wird zukünftige Therapiestudien mit DC sehr vereinfachen.

DC-Studien:

Eine optimale Tumorstoffimpfung muß neben Antigen-spezifischen CD8+ T Zellen auch CD4+ T Zellen aktivieren. Bislang wurde zwar über CD8-Antworten nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen berichtet, Antigen-spezifische CD4-Antworten konnten jedoch nicht gezeigt werden. Wir haben daher eine Studie initiiert, in welcher Melanompatienten autologe dendritische Zellen erhielten, die neben HLA-Klasse I restringierten Tumorpeptiden zusätzlich mit HLA-Klasse II restringierten Kontroll- und Tumorpeptiden

beladen wurden. In einer kürzlich veröffentlichten Zwischenauswertung dieser Studie konnten wir potente Th1-Antworten (tumor-spezifische, IFN-gamma-produzierende CD4+ T Zellen) demonstrieren. Diese starken Immunantworten waren bei 8 von 16 voll auswertbaren Patienten mit klinischer Stabilisierung bzw. Verbesserung der Erkrankung korreliert.

Immunomonitoring im Rahmen der Vakzination mit peptidbeladenen autologen dendritischen Zellen beim malignen Melanom:

Die Impftherapie mit dendritischen Zellen ist nicht nur in der Melanomtherapie ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Nachdem in den ersten Studien hauptsächlich die Verträglichkeit und die Praktikabilität der Impfung untersucht wurden, gilt nun das Hauptinteresse der Wirksamkeit der Therapie im zeitlichen Verlauf.

Um einen Gesamteindruck vom Erfolg der Impfung zu bekommen sind zum einen die Klinik des betreffenden Patienten aber auch seine Immunantworten von Bedeutung. Wir versuchen nun mit unterschiedlichen Methoden die Reaktionen des Immunsystems zu erkennen und daraus Rückschlüsse für die weitere Therapie zu ziehen.

Eine Methoden, die im Rahmen des Immunomonitoring angewendet wird, ist die Elispot Technologie, mit deren Hilfe man die spezifische Zytokinproduktion von T-Zellen zu bestimmten Zeitpunkten bestimmen kann. Im Elispotverfahren können verschiedene Zytokine (IFN-gamma, TNF-alpha, IL2, IL4, IL5 und IL10) bestimmt werden, die in ihrem Muster dann erneut eine Aussage über den Erfolg der Impfung ergeben.

Doch nicht nur die Produktion von Zytokinen gibt einen Hinweis auf ein aktiviertes Immunsystem, sondern ebenso wichtig ist die Aktivierung von CD8+ Zellen, die in der Lage sind Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Diese aktivierten CD8+ Zellen können mit Hilfe eines standardisierten Zytotoxizitätstest (chromium release assay) nachgewiesen werden.

Durch die Entwicklung neuer und die Verbesserung alter Therapieverfahren sind Beobachtungen der behandelten Patienten mittlerweile über mehr als ein Jahr möglich, so daß auch zeitlich die Möglichkeit für das Immunsystem gegeben ist zu reagieren. Mit dem Wissen über die Durchführbarkeit eines andauernden chronologischen Immunomonitorings wird man bald in der Lage sein Aussagen über die notwendige

Dauer, die Impfabstände, die Vorbehandlung des Patienten und den besten Inkludierungszeitpunkt zu machen, um somit diese Therapie noch effektiver gestalten zu können.

Teilvorhaben 2

Wesentlicher Focus des Teilprojektes 2 war es den Gentransfer in menschliche DC durch Influenzaviren im Hinblick auf die Herstellung und Evaluierung rekombinanter Vektoren für eine Anwendung in der Immuntherapie zu optimieren. Ausgangspunkt dieser Arbeiten waren unsere zuvor erhobenen Befunde, nach denen sich Melanom-assoziierte Antigene (Mage-3 Protein, MelanA), sich sehr effizient durch dieses Vektorsystem in DC exprimieren lassen. Transduzierte DC erwiesen sich als potente Stimulatoren von allogenen T-Zellen, die auch die Fähigkeit zur Expansion von spezifischen Gedächtnis-T-Zellen in Abwesenheit von exogenen zugeführten Zytokinen aufweisen. Bei vergleichenden Untersuchungen, in denen die Expression und Replikationsfähigkeit von Rekombinanten in Relation zu der Länge des zu exprimierenden heterologen Fragments untersucht wurden, zeigte sich eine inverse Korrelation. Die kürzeste Insertion (Melan-A, 621 b), wurde am besten, mittlere Insertionen etwas schlechter (Mage-3 1228 b, GFP 971b) und die Tyrosinase mit einer Länge von 2478 b kaum exprimiert. Die Expressionsraten korrelierten mit der Passagierbarkeit der Virusstämme. Dieser Befund eröffnet eine weitere Möglichkeit, Expression und Replikation der Rekombinanten spezifisch an die Bedürfnisse in DC anzupassen. Darüber hinaus führten wir kinetische Untersuchungen zur Virusproduktion in infizierten DC durch. Mittels der sensitivsten Nachweismethode, der Ko-Kultivierung ließ sich noch nach mehr als 24 Stunden infektiöses Virus nachweisen, nicht aber im Überstand der Kulturen. Es wäre abzuklären, ob es sich dabei um Inputviren handeln kann. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die wesentlichen Teile des experimentellen Programms erfolgreich durchgeführt wurden.

Stand der Arbeiten im Vergleich zum geltenden Arbeits-, Zeit- und Finanzierungsplan, Gründe für eventuelle Änderungen

Die durchgeführten Studien waren im Vergleich mit dem geltenden Arbeits-, Zeit- und Finanzierungsplan nicht wesentlich verzögert.

Haben sich die Aussichten für das Erreichen der Vorhabensziele geändert? Wenn ja, welche Probleme sind entstanden?
Nein
Haben sich die Vorhabensziele geändert? Wenn ja, warum?
Nein
Sind inzwischen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bekannt geworden, die für das Vorhaben von Bedeutung sind?, Wenn ja, welche?
Nein
Sind für Vorhabensergebnisse - Patente angemeldet worden? - Patente erteilt worden? - Erfindungen in Anspruch genommen worden? - Neuerungen und/oder Verbesserungen bereits gemachter Erfindungen angefallen? Wenn ja, bitte spezifizieren
Patentanmeldung (Nr. 00123687.6-2105) beim europäischen Patentamt: Titel: Influenza virus vector for human dendritic cells. Patentanmeldung (Nr. 60/299, 817) beim amerikanischen Patentamt: Titel: Improved transfection of eukaryotic cells with linear poly-nucleotides by electroporation Patentanmeldung (Nr. 01115076.0) beim europäischen Patentamt: Titel Improved transfection of eukaryotic cells with linear poly-nucleotides by electroporation
Liste eigener Publikationen von Vorhabensergebnissen
Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol. 2003 Apr;15(2):138-47. Dendritic cell-based immunotherapy Thomas G. Berger and Erwin S. Schultz. Current Topics in Microbiology and Immunology 2003;276:163-197. Nimmerjahn F, Kobelt D, Steinkasserer A, Menke A, Hobom G, Behrends U, Bornkamm GW, Mautner J. Efficient generation and expansion of antigen-specific CD4+ T cells by recombinant influenza viruses. Eur J Immunol. 2003 Dec;33(12):3331-41. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid Induction of Tumor-specific Type 1 T Helper Cells in Metastatic Melanoma Patients by Vaccination with Mature, Cryopreserved, Peptide-loaded Monocyte-derived Dendritic Cells. J Exp Med. 2002;195(10):1279-88. Berger TG, Feuerstein B, Strasser E, Hirsch U, Schreiner D, Schuler G, Schuler-Thurner B. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. J Immunol Methods. 2002 Oct 15;268(2):131-40. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic

cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. **Int J Cancer**. 2001 Jul 15;93(2):243-51.

Jenne L, Schuler G, Steinkasserer A. Viral vectors for dendritic cell-based Immunotherapy. **Trends in Immunology** (2001); 22(2):102-107.

Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. **Cell**. 2001 Aug 10;106(3):271-4.

Jenne J, Thumann P, Steinkasserer A. Interaction of large DNA viruses with dendritic cells. **Immunobiology** 2001; 204: 639-649.

Strobel I, Berchtold S, Gotze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. **Gene Therapy** 2000 Dec;7(23):2028-35.

Strobel I, Krumbholz M, Menke A, Hoffmann E, Dunbar PR, Bender A, Hobom G, A, Schuler G, Grassmann R. Efficient expression of the tumor-associated antigen MAGE-3 in human dendritic cells, using an avian influenza virus vector. **Hum Gene Therapy** 2000 Nov 1;11(16):2207-18.

Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Roder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen TL, Schuler G, Schuler-Thurner B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. **J Immunol Methods**. 2000 Nov 1;245(1-2):15-29.

Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Roder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, von Den Driesch P, Knop J, Brocker EB, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol**. 2000 Sep 15;165(6):3492-6.

Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. **J Exp Med**. 1999 Dec 6;190(11):1669-78.

Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. **J Immunol Methods**. 1999 Feb 1;223(1):1-15.

Schaft N., J. Dörrie, P. Thumann, V.E. Beck, E.S. Schultz, A. Steinkasserer, D. Dieckmann, G. Schuler. Simultaneous electroporation of MAGE-3, MelanA and Survivin RNA into immature and mature dendritic cells; towards an optimal vaccination protocol. (Manuskript in Vorbereitung)

Mature is not mature: important functional differences of dendritic cells by diverse

maturation stimuli. Berger T.G., B. Feuerstein, U. Hirsch, D. Schreiner, C. Maczek, D. Dieckmann, G. Schuler and B. Schuler-Thurner (Manuskript in Vorbereitung)

Die Schlussberichte für die Teilprojekte aus Würzburg, Mainz und Köln werden die einzelnen Projektleiter direkt an das DLR senden.

Anhang A

1. Electroporation of human Dendritic Cells with mRNA

1.2 Transfection efficiency

In order to obtain the optimal conditions for mRNA-electroporation of human DC, the optimal field strength was determined by varying of the voltage in the range of 300-600V using the exponential decay machine Multiporator[®], while the other parameters were kept constant: pulse time (500 μ s), gap of cuvette (0.4 cm), cell concentration of immature DC (10×10^6 /ml), electroporation volume (200 μ l), electroporation medium (OptiMEM). A transfection efficiency of more than 90 % DC was obtained at a voltage of 400V. The increase of voltage resulted in an increase of the mean fluorescence intensity.

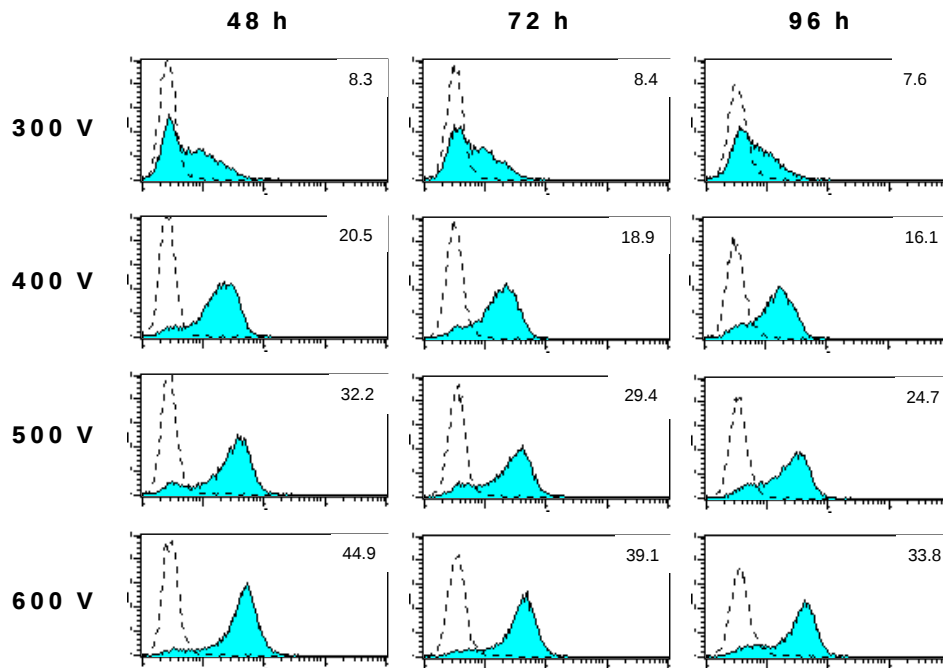


Fig.1: Influence of voltage on EGFP-Expression

Immature DC were electroporated with EGFP mRNA for 500 μ s at the indicated voltage using exponential decay pulse machine Multiporator[®]. Subsequently DC were matured using the maturation cocktail composed of IL-1beta, IL6, TNF-alpha and PGE₂. After the indicated time points transfection efficiency was determined by FACS-analysis of EGFP-fluorescence. The dashed line shows the fluorescence of DC transfected with EGFP mRNA. The number in the figure indicates the mean fluorescence intensity (MFI). The dotted line represents negative control.

1.3 Viability of the electroporated DC

The viability of the electroporated DC (see above) was determined using propidium-jodide. The increase of voltage resulted in a very slight increase of cell death.

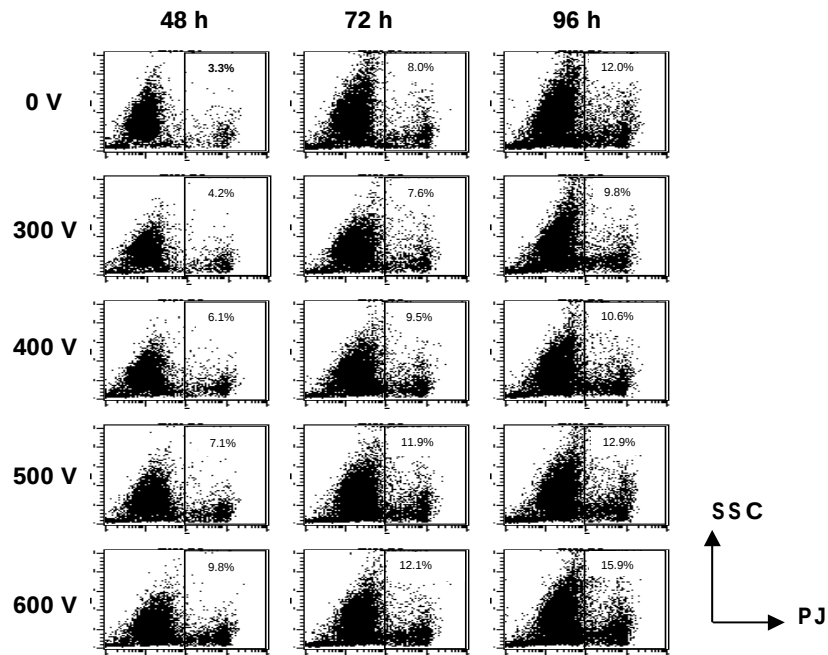


Fig.2.: Influence of voltage on cell viability

Immature DC were electroporated as described in Fig.1. After the indicated time the viability was determined by propidium-jodide. The numbers in the figures indicate the percentage of dead cells.

1.4 Titration of mRNA

In order to establish the optimal conditions for mRNA-electroporation of human monocyte-derived DC, titration experiments using increasing concentrations of in vitro transcribed RNA (IVT-RNA) were performed (1-20 μg IVT-RNA per 2×10^6 mature DC). A minimum of 5 μg mRNA was sufficient to obtain transfection efficiencies more than 90%. Increasing amounts of mRNA resulted in an increased mean fluorescence intensity.

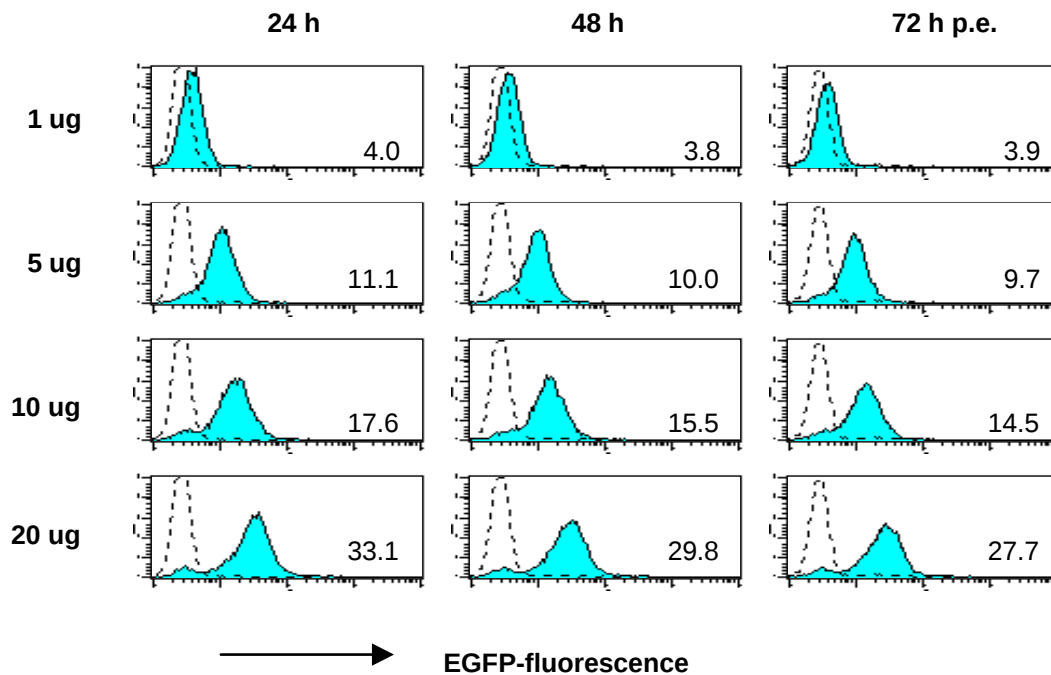


Fig. 3: Titration of mRNA

Mature DC were electroporated with EGFP mRNA. After the indicated time points EGFP-fluorescence was analyzed by FACS (dashed line). The number in the figure indicates the mean fluorescence intensity (MFI). The dotted line shows the fluorescence of DC transfected with an irrelevant mRNA.

1.5 Comparison exponential decay versus rectangular pulse machine

Comparison of two machines delivering different form of pulse (Exponential decay vs rectangular pulse) showed no significant difference in transfection efficiency. Similar transfection efficiencies were obtained both with immature as well mature DC.

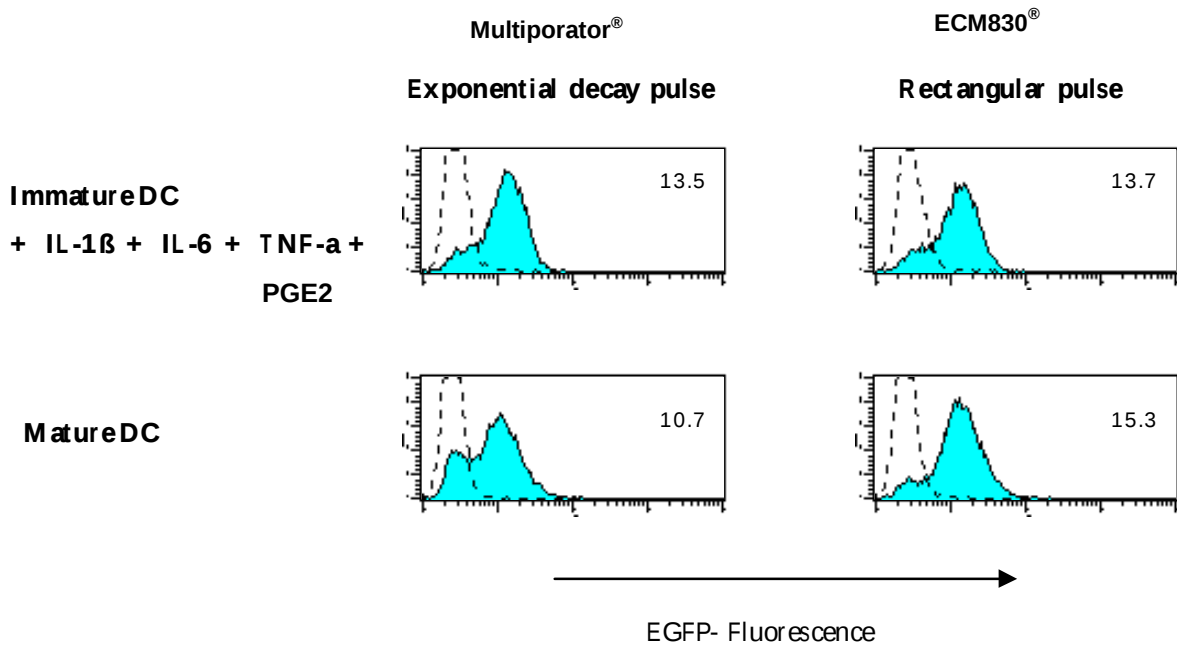


Fig.4: mRNA-Electroporation of immature and mature DC using electroporators delivering different pulse forms.

Immature and mature DC were electroporated with EGFP mRNA for 500 μ s at the indicated voltage using exponential decay pulse machine Multiporator® or rectangular pulse machine ECM830®. In the case of immature DC the 4-component-cocktail was added for maturation. After 2 days transfection efficiency was determined by FACS-analysis of EGFP-fluorescence. The dashed lines show the fluorescence of DC transfected with EGFP mRNA. The number in the figure indicates the mean fluorescence intensity (MFI). The dotted line represents fluorescence of DC transfected with an irrelevant mRNA.

1.6 Cell yield after electroporation of immature DC and mature DC

The recovery of cells was higher when DC were electroporated in their mature rather than in their immature stage. Up to 70% of the mature DC were recovered immediately after electroporation. Similar results were obtained both with exponential decay and rectangular pulse form electroporators. Approximately 15 % of electroporated DC were lost during a culture period of 48h. Electroporation of immature DC resulted in a recovery of approximately 53 % of the cells when counting immediately after electroporation. After addition of maturation mix the cell number decreased very slowly during 48 h in vitro culture.

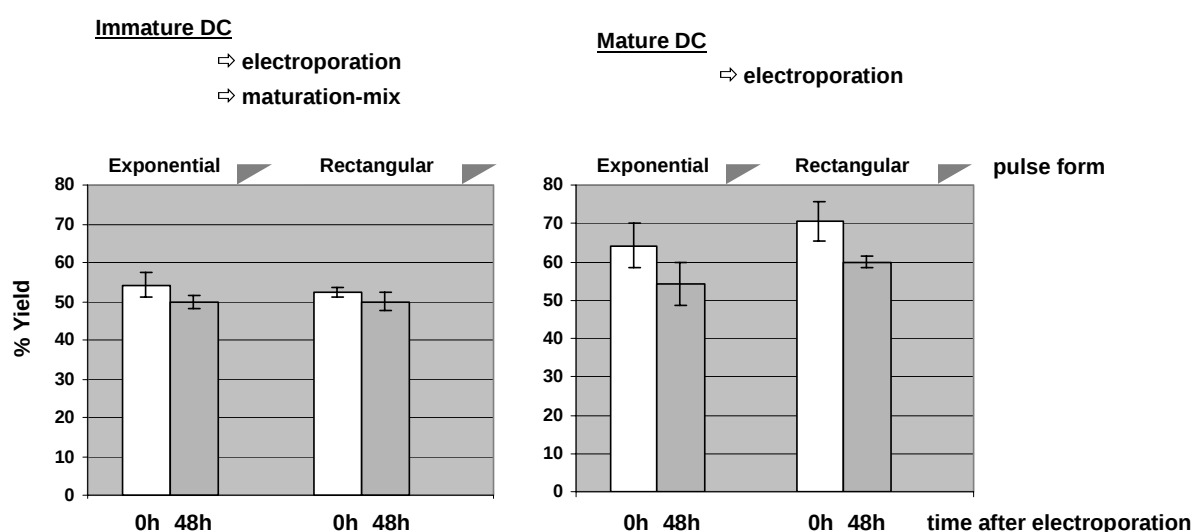


Fig.5: Recovery of DC after electroporation.

Immature and mature DC were electroporated with EGFP mRNA for 500 μ s at the indicated voltage using exponential decay pulse machine Multiporator[®] or the rectangular pulse machine ECM830[®]. In the case of immature DC the 4-component-cocktail was added for maturation. The recovery of viable cells was determined by trypan blue exclusion immediately or 48h after electroporation.

1.7 Phenotypical analysis

In order to test if the electroporation process affects the maturation of DC, DC were electroporated in their immature stage and then the maturation cocktail was added. Phenotypical analysis of CD83 and CD25 two days after electroporation showed that electroporated DC retained the potential to mature. Similar results were obtained both with exponential decay and rectangular pulse delivering machine.

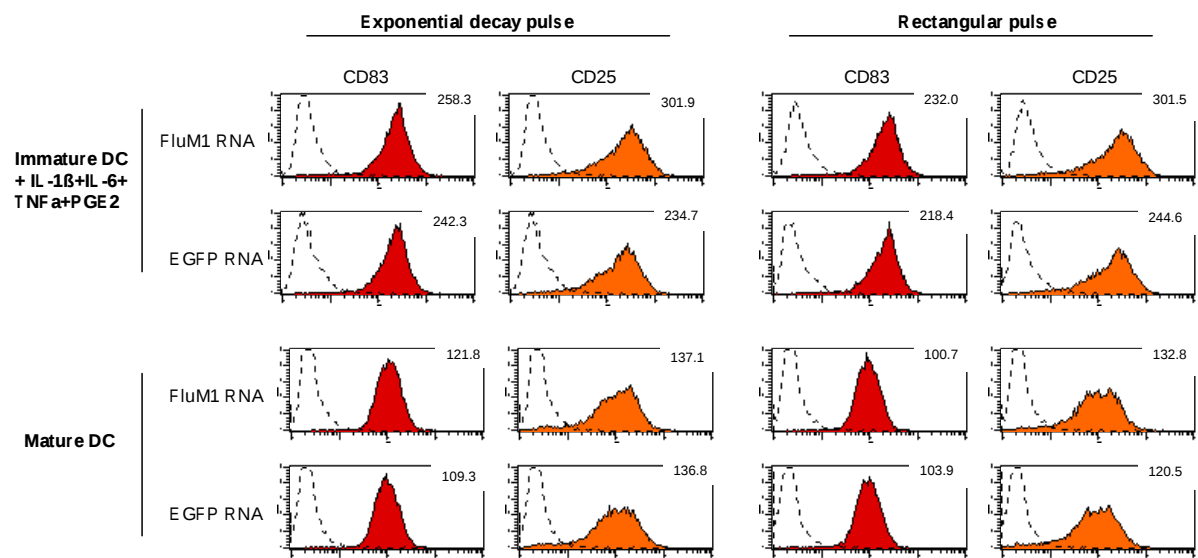


Fig. 6: Phenotypical analysis 2 days after electroporation.

Immature and mature DC were electroporated as described above using 2 different machines delivering exponential decay or rectangular pulse. In the case of immature DC the 4-component-cocktail was added for maturation. After 2 days the phenotype of the cells was analyzed by FACS. The dashed lines show the red-fluorescence of DC stained with the monoclonal antibodies specific for the indicated surface antigen. The number in the figure indicates the mean fluorescence intensity (MFI). The dotted line represents the isotype control.

1.8 Scale-up of cell numbers

In order to optimize electroporation condition for clinical use different cell numbers were tested: 8×10^6 DC/200 μ l, 16×10^6 DC/400 μ l and 32×10^6 DC/800 μ l per cuvette. As shown in Fig.7A up-scaling of DC-number didn't affect transfection efficiency. As shown in Fig. 7B more than 60% of the cell could be collected immediately after the electroporation procedure. After a culture period of 24h the cell number decreased slightly.

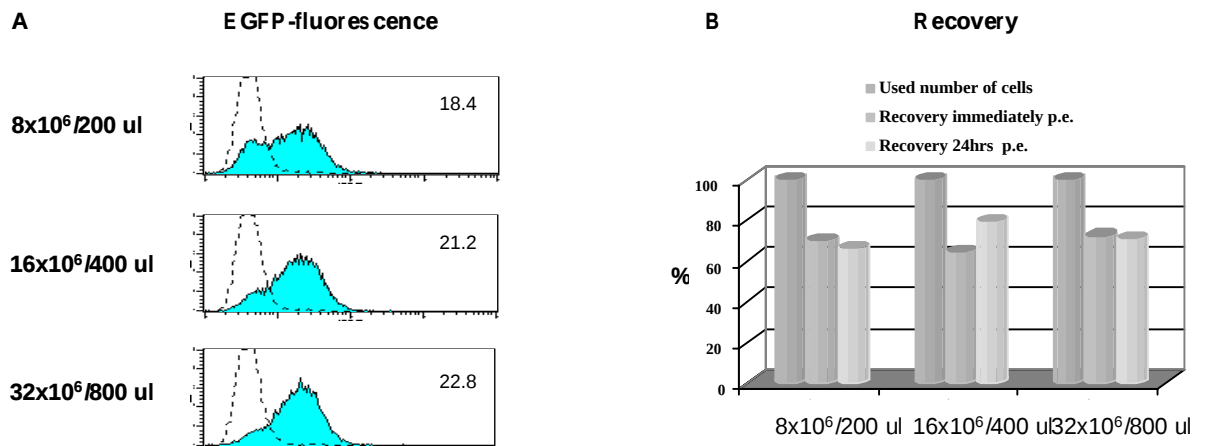


Fig.7: Scale-up of cells per electroporation cuvette.

Mature DC were electroporated with EGFP mRNA in a 0.4 cm-gap-cuvette at 400 V for 500 μ s using the exponential decay pulse machine Multiporator[®]. After 24h transfection efficiency was determined by FACS-analysis of EGFP-fluorescence (A). The dashed lines show the fluorescence of DC transfected with EGFP mRNA. The dotted lines represent negative controls. (B) Recovery of cells (%) shown immediately post-electroporation (p.e.) and 24h after electroporation.

2. Electroporators delivering pulse times in the ms-range

Most of the commonly used electroporation systems (e.g. Gene Pulser II from Bio-Rad, Easyject Plus from EquiBio, ECM600 from BTX) deliver pulse forms which decay exponentially over a short period of milliseconds.

2.1 Standard procedure

Immature DC (d6) or mature DC (d6 + 1d matured with the maturation-cocktail) were harvested, washed once in Opti-MEM (without phenol-red) (Gibco) and adjusted to a final cell concentration of 10×10^6 /ml in Opti-MEM (Gibco) or OptiMix (EquiBio). 20 µg of IVT mRNA were used in per 0.4-cm-gap electroporation cuvette and 200µl cell suspension was added. After an incubation for 3 minutes at room temperature the pulse was triggered at a voltage of 250 V and 150µF using Gene Pulser II or Easyject Plus. The cell suspension was transferred to 6-well-plates (1×10^6 DC/ well/3 ml culture medium supplemented with GM-CSF and IL-4/ well). Some of the immature, electroporated cells were matured using the maturation cocktail.

2.2 Optimisation of mRNA-electroporation for human dendritic cells

2.2.1 Optimal electroporation field strength

In order to obtain the optimal conditions for mRNA-electroporation of human DC, the optimal field strength was determined by varying of the voltage in the range 60V-100V-160V-200V-260V-300V using the Gene Pulser II while the other parameters were kept constant: capacity (150µF), gap of cuvette (0.4 cm), cell concentration of mature DC (10×10^6 /ml), electroporation volume (200 µl), electroporation medium (OptiMix).

Using the Gene Pulser II a voltage of 200 V was sufficient to obtain a transfection efficiency of more than 75 % for mature DC. Increase of the voltage resulted in an increase of the mean fluorescence intensity. On the other hand increase of the voltage resulted in a lower viability of the cells.

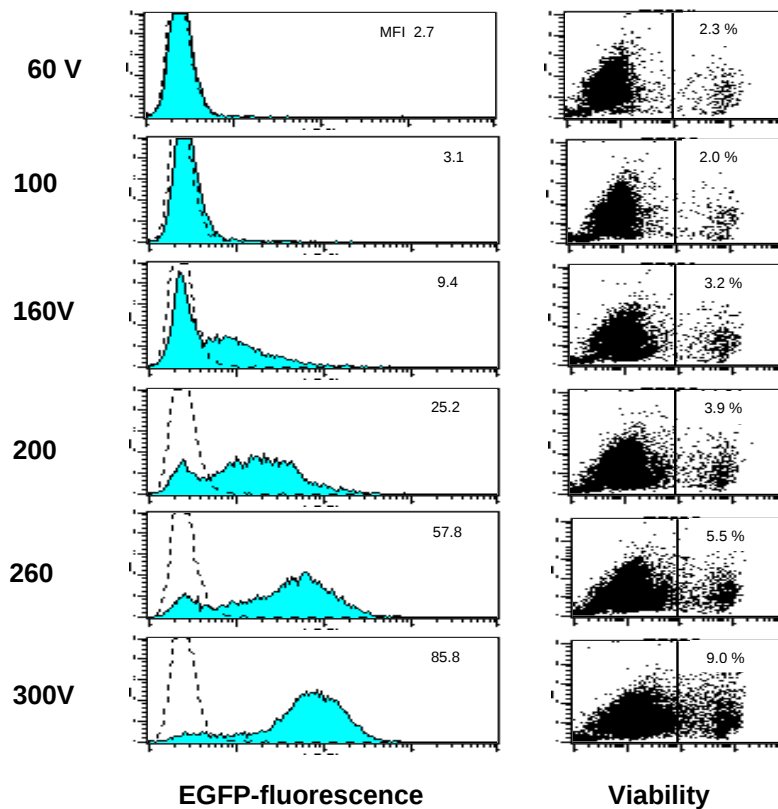


Fig.8: Effect of voltage on transfection efficiency of mature DC

Mature DC were electroporated with mRNA at 150 μ F at the indicated voltage using the Gene Pulser II. After 48 hrs the transfection efficiency was determined by FACS-analysis of EGFP-fluorescence and viability by propidiumjodide staining.

2.2.2 Optimal electroporation buffer

Electroporation buffers with low conductivity strongly prolong the pulse time and are not suitable for electroporators delivering ms-pulses. On the other side electroporation buffer with high conductivity like PBS or standard culture media are also not optimal. Until yet the best electroporation buffer for efficient transfection of DC (routinely more than 70 %) combined with high viability was OptiMEM (without phenol-red) from Gibco and OptiMix from EquiBio. Both media are serum-free. OptiMEM contains growth factors, whereas OptiMix is a optimised eukaryotic cell electroporation buffer and contains ATP as well glutathione.

2.2.3 Comparison of Gene Pulser II vs Easyject Plus

Two electroporation machines - Gene Pulser II (BioRad) and Easyject Plus device (EquiBio)-delivering exponential pulse decay at the ms-range were compared. Transfection efficiencies more than 70 % were obtained both with the Gene Pulser II and the Easyject Plus device.

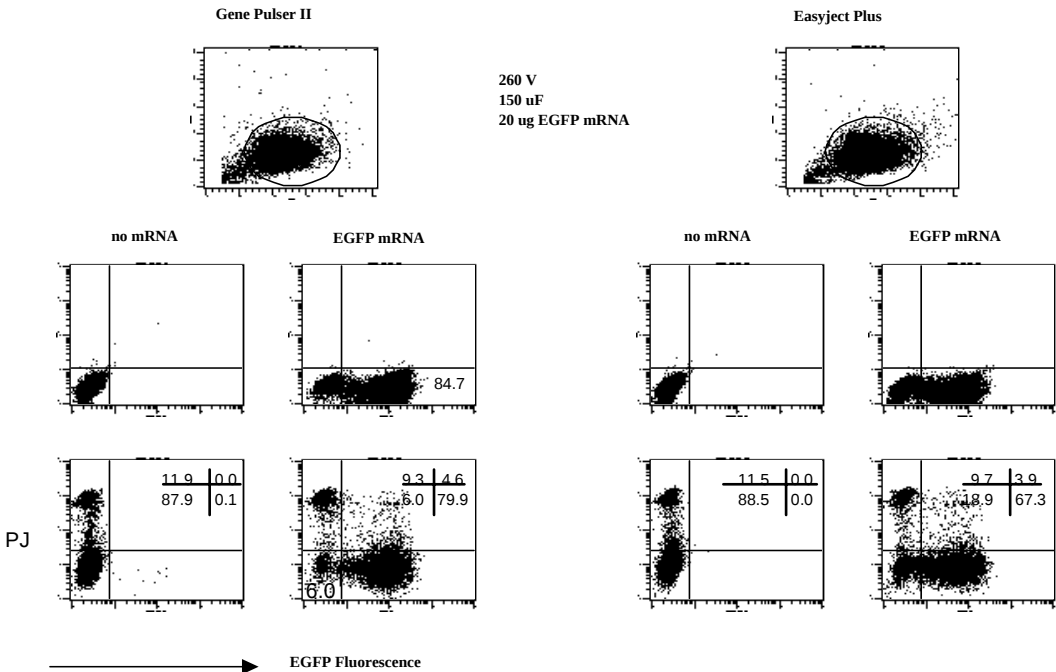


Fig. 9: Transfection efficiency of mature DC using Gene Pulser II or Easyject Plus
Mature DC were electroporated with EGFP mRNA at 150 μ F and 260 V. After 24 hrs the transfection efficiency was determined by FACS-analysis of the EGFP-fluorescence. The viability of the electroporated cells was determined using propidium iodide.

2.3 Freezing of DC electroporated in the mature stage

2.3.1 Recovery

In view of clinical use the possibility of freezing of electroporated DC was tested. Freezing and thawing of DC were performed as previously described by Feuerstein et al. 2000. As shown in Fig.10 a recovery of more than 80% of DC was obtained after a culture period of 24h.

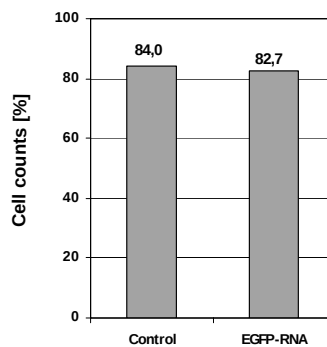


Fig. 10: Recovery of electroporated DC after cyro-preservation

Mature DC (12×10^6 / 200 μ l) were electroporated with EGFP mRNA at 150 μ F and 260 V using Gene Pulser II. After 24 h the transfection efficiency was determined by FACS-analysis of the EGFP-fluorescence. The viability was determined by trypan-blue-exclusion.

2.3.2 Phenotypical analysis

Phenotypical analysis of CD83, CD25, CD86, CD80, CD40, HLA-DR, HLA class I expression showed that freezing and thawing of mRNA-electroporated DC didn't alter the phenotype of mature DC as analyzed 48h p.e. (data not shown).

2.3.3 Wash-out

The culture of electroporated DC without addition of cytokines (so-called "wash-out") did not alter the phenotype (CD83, CD25, CD86, CD80, CD40, HLA-DR, HLA class I) of mature DC as analyzed 48h p.e.

2.3.4 Allo-MLR

Freezing and thawing of mRNA-electroporated DC did not affect the allo-stimulatory capacity of DC.

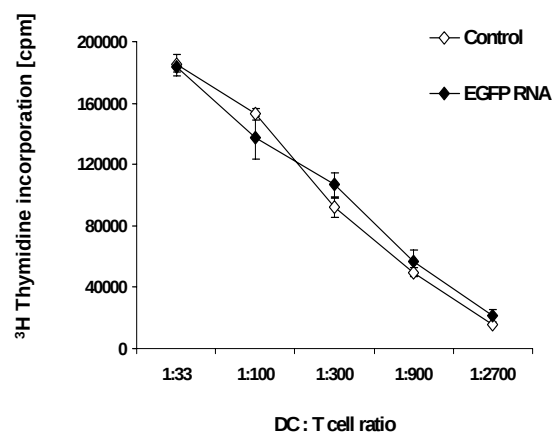


Fig. 11: Allo-MLR of mRNA-electroporated DC after cryopreservation

Mature DC were electroporated with EGFP mRNA at 150 μ F and 260 V using Gene Pulser II. Freezing and thawing of DC were performed as previously described by Feuerstein et al. 2000. MLR was performed by culturing graded numbers of DC with purified allogeneic T cells (2×10^5). At day 4 the cells were pulsed with ³H-thymidine and incorporation was determined 16 h later. The mean $\pm$ s.d. of triplicates are shown. Counts of T cells or DC alone were below 500 cpm.

III. ELECTROPORATION WITH mRNA ENCODING TUMOR ANTIGENS

1. NY-ESO1 mRNA

1.1 Intracellular NY-ESO1 protein expression

Intracellular FACS-staining with NY-ESO1 specific monoclonal antibodies were performed in order to detect the expressed protein in NY-ESO1 mRNA-transfected DC. Significant expression of NY-ESO1 protein could be detected in mature, maturing or immature DC. Maximal protein expression in mature DC could be detected 24h p.e. Kinetic analysis revealed that protein expression decreased slightly over time.

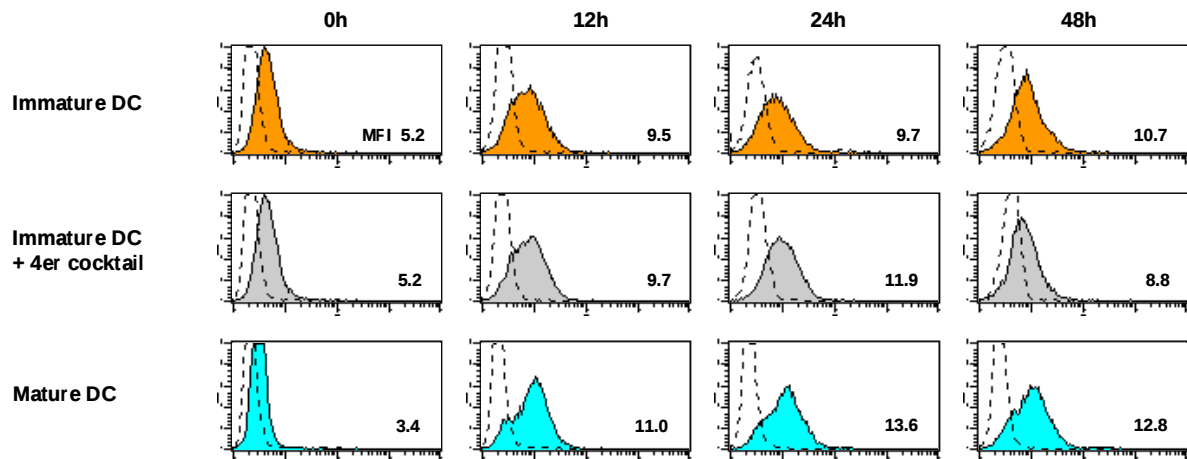


Fig.12: Intracellular FACS-staining of NY-ESO1 protein

Immature or mature DC (2×10^6 / 200 μ l) were electroporated with NY-ESO1 mRNA or irrelevant mRNA (EGFP) at 150 μ F and 250 V using Gene Pulser II. After electroporation in the case of immature DC the 4-component-cocktail was added for maturation. After a culture period of 24h intracellular FACS-staining were performed using Fix&Perm. The cells were incubated for 15 min at 4°C with the fixing reagent. Subsequently, cells were stained with NY-ESO1 specific mAb ES121 for 20 min at 4°C following staining with GAM-PE for 20 min at 4°C.

2. MAGE-1 mRNA

2.1 Intracellular MAGE-1 protein expression

Intracellular FACS-staining with MAGE-1 specific monoclonal antibodies were performed in order to detect the expressed protein in MAGE-1 mRNA-transfected DC. In the case of the immature DC maturation-mix were added for maturation. After a culture period of 24 hrs intracellular FACS-staining was performed. As shown in Fig.13 efficient expression of MAGE-1 protein could be detected in mature DC.

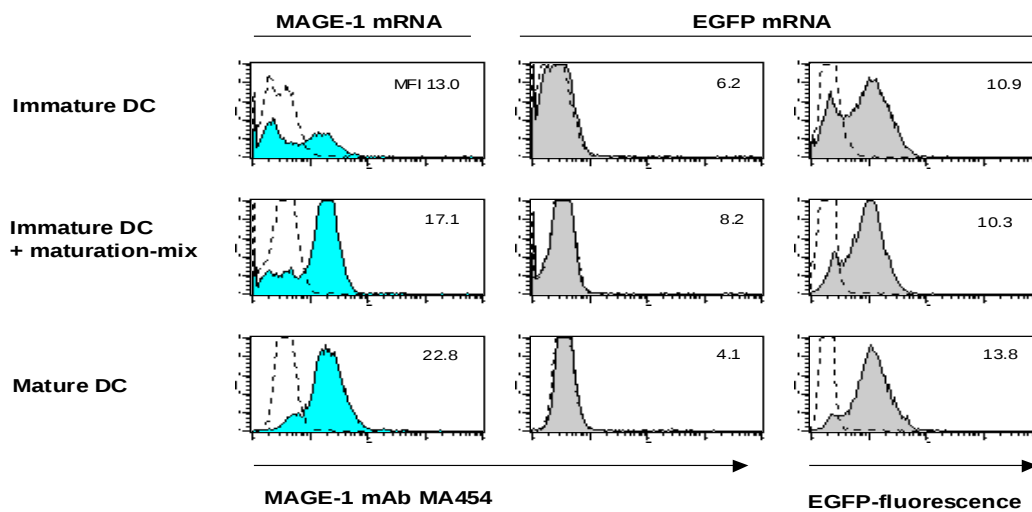


Fig. 13: Intracellular FACS-staining of mRNA-electroporated DC

Immature and mature DC (2×10^6 / 200 μ l) were electroporated with MAGE-1 mRNA or irrelevant mRNA (EGFP) at 150 μ F and 250 V using Gene Pulser II. After electroporation in the case of immature DC the 4-component-cocktail was added for maturation. After a culture period of 24 hrs intracellular FACS-staining were performed using Fix&Perm. The cells were incubated for 15 min at 4°C with fixing reagent. Subsequently cells were stained with MAGE-1 specific mAb MA454 for 20 min at 4°C following staining with GAM-PE for 20 min at 4°C.

2.1 Antigen presentation to a MAGE-1.A1 specific CD8+ CTL

The HLA-A1 restricted MAGE-1 peptide EADPTGHSY (aa 161-169) is one of best known MAGE-1 epitopes expressed in Caucasians. In order to test the capacity of MAGE-1 mRNA-transfected DC to generate and present this epitope to specific T cells, Elispot-Assay were performed. As shown in Fig. 14 MAGE-1 mRNA electroporated DC were able to stimulate this specific CTL clone. Mature DC were more potent CTL stimulators than immature DC.

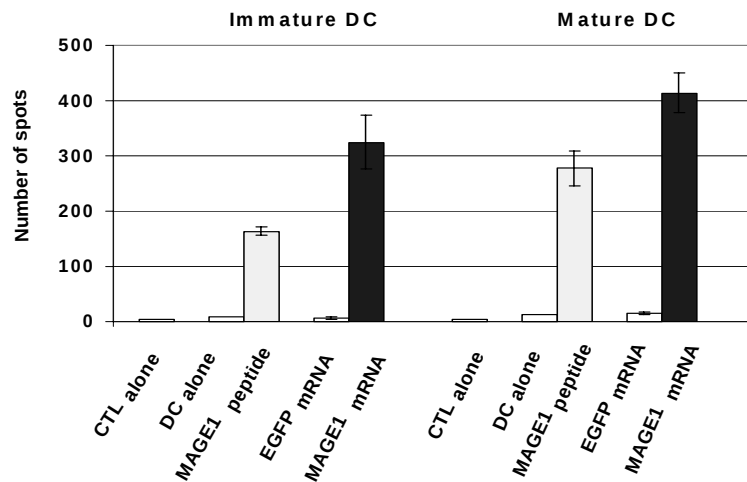


Fig. 14: MAGE-1 mRNA transfected DC were able to stimulate specific CTL

Immature and mature DC (2×10^6 / 200 μ l) were electroporated with MAGE-1 mRNA or irrelevant mRNA (EGFP) at 150 μ F and 250 V using Gene Pulser II. Electroporated DC (1×10^5) were cocultured with MAGE-1 specific CTL line (1×10^4) for 20 h. The capacity of the CTL line to release IFN- γ was immunochemically visualized by the ELISPOT technique.

3. MAGE-3 mRNA

3.1 Intracellular MAGE-3 protein expression

Intracellular FACS-stainings using MAGE-3 specific monoclonal antibody were performed in order to detect the expressed protein in MAGE-3 mRNA-transfected DC. As shown in Fig. 15 efficient expression of MAGE-1 protein could be detected in mature DC 24h p.e.

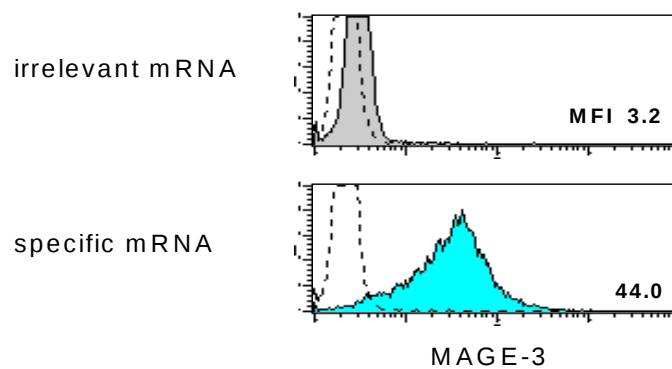


Fig. 15: Intracellular FACS-staining of mRNA-electroporated DC

Mature DC (2×10^6 / 200 μ l) were electroporated with MAGE-3 mRNA or irrelevant mRNA (EGFP) at 150 μ F and 250 V using Gene Pulser II. After a culture period of 24 h intracellular FACS-staining were performed using Fix&Perm. The cells were incubated for 15 min at 4°C with fixing reagents. Subsequently cells were stained with MAGE-3 specific mAb57b for 20 min at 4°C following staining with GAM-PE for 20 min at 4°C.

3.2 Antigen presentation to CD4+ CTL

In order to test whether or not mRNA-electroporated DC are capable to generate HLA-classII-restricted peptides and to stimulate CD4+ CTL, MAGE-3 mRNA-electroporated DC were cocultured with an MAGE-3 specific HLA-DP4 CTL clone for 24h. The IFN- γ ELISA assay showed that no stimulation of the DP4-CTL clone could be detected neither with immature nor with maturing or mature DC. This it will be necessary to specifically modify the mRNA in order to generate class II responses.

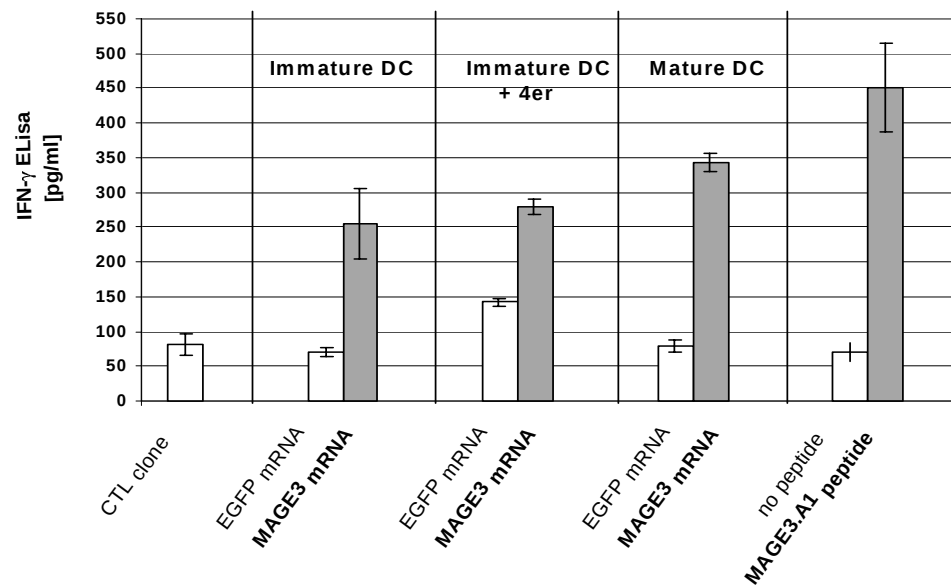
3.3 Antigen presentation to CD8+ CTL

Several HLA-A restricted epitopes of the MAGE-3 protein are known. Theoretically mRNA-transfected DC should be able to generate all of these epitopes. In order to test this, MAGE-3 mRNA-transfected DC were cocultured with antigen-specific CTL clone following detection of IFN- γ release using ELISA-assays.

3.3.1 MAGE-3.A1 specific CD8+ CTL

The HLA-A1 restricted MAGE-3 peptide EVDPIGHLTY (aa 168-176) is one of best known MAGE-3 expressed in Caucasians. In order to test the capacity of MAGE-3 mRNA-transfected DC to generate and present this epitope to specific CD8 CTL ELISA-assays were performed. Immature as well maturing or mature DC were capable to process and present the MAGE-3.A1 epitope to the specific CTL clone. As shown in Fig.16A mature mRNA-transfected DC were more potent stimulators of CTL clone than immature or maturing DC when using the DC 24h p.e. However, as shown in Fig16B, immature DC were similar potent stimulators in comparison to mature DC when using the DC 6h p.e.

A



B

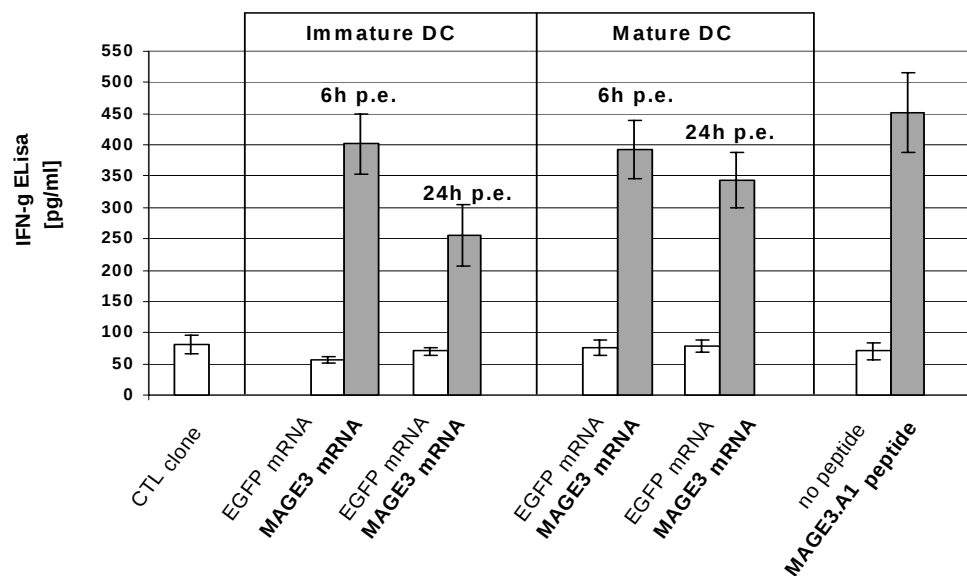


Fig. 16: MAGE-3 mRNA transfected DC were capable to stimulate specific CD8+ CTL clone.

Immature or mature DC (2×10^6 / 200 μ l) were electroporated with MAGE-3 mRNA or irrelevant mRNA at 150 μ F and 250 V using Gene Pulser II. After electroporation in the case of immature DC the 4-component-cocktail were added for maturation. Electroporated DC (15×10^3) were cocultured with MAGE-3 specific CTL line (2×10^3) for 24 h. The capacity of the CTL clone to release IFN- γ was determined by ELISA-technique. Results are shown as mean spot numbers $\pm$ SEM of triplicates.