

**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 Kulturmethode 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.