

PANSERIN™ 416

PANSERIN™ 416 is a serumfree medium (basic medium) which is, after supplementation of growth factors, suitable for the production of dendritic cells.

Dendritic cells are highly specialized antigen-presenting cells and can initiate and regulate antigen-specific immunoresponses. This ability can be used in order to generate immunoresponses against certain proteins of tumour cells and thus to fight against tumours with the immune system. Dendritic cells have been isolated from a great variety of non-lymphatic and lymphatic tissue of human beings, mice and other species.

For the generation of tumour vaccines, dendritic cells can be produced from the peripheral blood of tumour patients. In clinical studies the principal effectiveness of a vaccination with dendritic cells has been shown.

Antigen Uptake:

In almost any tissue of the body, dendritic cells form a dense network of guardian cells that take up extracellular components by processes such as phagocytosis and endocytosis and thus analyse their environment. Proteins that have been taken up undergo an intracellular decomposition into peptides, are bound to MHC-molecules and transported to the cell surface. Thus antigenic determinants of the peptides are made recognizable to T-cells. Within the scope of the physiological cell regeneration dendritic cells leave the peripheral tissue and migrate with the lymph into a regional lymph node where they interact with T-cells. From an intact tissue dendritic cells reach the lymph node in unactivated condition.

A functioning monitoring system excels in the ability to quickly and specifically recognize damaging processes and to take suitable steps against them. For this purpose, dendritic cells carry receptors on their surface for a variety of danger signals which can be radiated from microorganisms, mediators inherent in the body or activated T-cells. Examples for microbial structures activating dendritic cells are lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria, cytidine guanosine dinucleotide (cpG) – rich bacterial DNA and viral doublestranded RNA. Endogenous mediators, for which dendritic cells have special receptors and which send an activating signal, are cytokines, prostanooids and adenine nucleotides. Activated T-cells can stimulate dendritic cells by means of the CD40-ligand integrated in their cell membrane. The activation of these different receptors induces essential cell changes which are summarized by the term maturation. The ability of phagocytosis gets lost.

PANSERIN™ 416

PANSERIN™ 416 ist ein serumfreies Medium (Basismedium), das nach Supplementierung mit Wachstumsfaktoren für die Gewinnung von dendritischen Zellen geeignet ist.

Dendritische Zellen sind hoch spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen und können antigen-spezifische Immunantworten initiieren und regulieren. Diese Fähigkeit kann genutzt werden, um Immunantworten gegen bestimmte Proteine von Tumorzellen zu generieren und so mit dem Immunsystem Tumore zu bekämpfen. Dendritische Zellen wurden aus einer großen Vielfalt von nicht lymphatischem und lymphatischem Gewebe aus Mensch, Maus und anderen Species isoliert. Für die Generierung von Tumorzellen können dendritische Zellen aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten gewonnen werden. In klinischen Studien wurde die prinzipielle Wirksamkeit einer Vakzinierung mit dendritischen Zellen gezeigt.

Antigenaufnahme:

Dendritische Zellen bilden in fast allen Geweben des Körpers ein dichtes Netzwerk von Wächterzellen, die extrazelluläre Bestandteile durch Prozesse wie Phagozytose und Endozytose aufnehmen und somit ihre Umgebung analysieren. Aufgenommene Proteine werden intrazellulär zu Peptiden zerlegt, an MHC-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert. Antigene Determinanten der Peptide werden somit für T-Lymphozyten erkennbar gemacht. Im Rahmen der physiologischen Zellerneuerung verlassen dendritische Zellen das periphere Gewebe und wandern mit der Lymphe in einen regionalen Lymphknoten, wo sie mit T-Zellen interagieren. Aus intaktem Gewebe erreichen dendritische Zellen den Lymphknoten im nicht-aktivierten Zustand.

Ein funktionierendes Überwachungssystem zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, schädigende Prozesse schnell und spezifisch zu erkennen und geeignete Gegenmaßnahmen einzuleiten. Zu diesem Zweck tragen dendritische Zellen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für eine Vielzahl von Gefahrensignalen, die Mikroorganismen, körpereigene Mediatoren oder aktivierten T-Zellen ausgehen können. Beispiele für mikrobielle Strukturen, die dendritische Zellen aktivieren sind Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien, Cytidin-Guanosin-Dinukleotid (cpG)-reiche bakterielle DNA und virale Doppelstrang-RNA. Endogene Mediatoren, für die dendritische Zellen spezielle Rezeptoren besitzen und von denen ein Aktivierungssignal ausgeht, sind Zytokine, Prostanoiden und Adeninnukleotide. Aktivierte T-Zellen können durch den in ihre Zellmembran integrierten CD40-Liganden dendritische Zellen stimulieren. Die Aktivierung dieser verschiedenen Rezeptoren induziert wesentliche zellbiologische Veränderungen, die mit dem Begriff Reifung zusammengefasst werden. Die Fähigkeit zur Phagozytose geht verloren.



The company

Das Unternehmen

Am Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach
Phone +49 (0) 85 43 - 60 16-30, Fax +49 (0) 85 43 - 60 16-49
e-mail: info@pan-biotech.de, http://www.pan-biotech.de

PAN™
BIOTECH G m b H

Peptides bound to MHC-molecules are presented in a higher density and with greater stability. The cytoskeleton structure is reorganized and a changed expression of chemokine receptors enables the dendritic cells to get from the focus of inflammation into the draining lymph node. Co-stimulating molecules on the surface of dendritic cells and the release of cytokines, e.g. interleukin-12, finally allow the dendritic cells an efficient interaction with T-cells.

Induction of an Immunoresponse:

In the lymph node, dendritic cells interact with various lymphocyte populations. Above all T-cells, which haven't yet had any antigen contact, feel the cell surface of dendritic cells and are activated if the T-cell receptor recognizes the presented antigen. This central process for the acquired (antigen-specific) immunoresponse is called "Priming". Cytotoxic T-cells develop from CD8 cells and these cytotoxic T-cells are able to kill those cells which they recognize with their T-cell receptor.

Tumour Vaccination with Dendritic Cells:

Tumour cells express specific proteins which can be recognized as antigenic determinants by T-cells. As a rule, however, this is not sufficient for the immune system to generate an effective immunoresponse against tumour cells; there is rather a tolerance. On the one hand this is because tumour-associated antigens are often also found in sound tissue in a low density; on the other hand tumour cells have numerous strategies to escape an immunoresponse. In a number of animal experiments, however, it could be clearly shown that this tolerance for tumours can be broken by a vaccination with dendritic cells.

Generation of Dendritic Cells:

Dendritic cells are derived from hematopoietic precursor cells in the bone marrow. Three different subpopulations with each characteristic features and functions are described for the human being: myeloid dendritic cells, plasmacytoid and Langerhans cells of the skin. For tumour vaccinations, myeloid dendritic cells are mainly of interest as they are especially capable of taking up and presenting antigens. Dendritic cells with myeloid characteristics can be produced by an *in vitro* culture of monocytes in the presence of the cytokines interleukin-4 (IL-4) and granulocytes-macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF). Alternatively dendritic cells can be generated from CD34+ hematopoietic stem cells of the peripheral blood.

An MHC-Moleküle gebundene Peptide werden in höherer Dichte und mit größerer Stabilität präsentiert. Die Zytoskelettstruktur wird neu organisiert und eine veränderte Expression von Chemokin-Rezeptoren ermöglicht den dendritischen Zellen vom Entzündungsherd in den drainierenden Lymphknoten zu gelangen. Kostimulierende Moleküle an der Oberfläche dendritischer Zellen und die Freisetzung von Zytokinen, wie z. B. Interleukin-12 erlauben den dendritischen Zellen schließlich eine effiziente Interaktion mit T-Zellen.

Induktion einer Immunantwort:

Im Lymphknoten interagieren dendritische Zellen mit verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Vor allem T-Lymphozyten, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatten, tasten die Zelloberfläche von dendritischen Zellen ab und werden aktiviert, falls es zu einer Erkennung des präsentierten Antigens durch den T-Zell-Rezeptor kommt. Dieser für die erworbene (antigenspezifische) Immunantwort zentrale Vorgang wird als „Priming“ bezeichnet. Aus CD8 Zellen entwickeln sich zytotoxische T-Lymphozyten die befähigt sind, diejenigen Zellen, die sie mit ihren T-Zell-Rezeptor erkennen, zu töten.

Tumorzellvaccinierung mit dendritischen Zellen:

Tumorzellen exprimieren spezifische Proteine, die von T-Zellen als antigene Determinanten erkannt werden können. In der Regel reicht dies jedoch nicht aus, damit das Immunsystem eine effektive Immunantwort gegen Tumorzellen generiert; vielmehr besteht eine Toleranz. Dies liegt zum einen daran, dass Tumor-assoziierte Antigene in geringer Dichte oft auch im gesunden Gewebe vorkommen; zum anderen verfügen Tumorzellen über zahlreiche Strategien, einer Immunantwort zu entgehen. In einer Reihe von Tierversuchen konnte jedoch eindrucksvoll gezeigt werden, dass diese Toleranz gegenüber von Tumoren durch eine Vakzinierung mit dendritischen Zellen durchbrochen werden kann.

Generierung von dendritischen Zellen:

Dendritische Zellen leiten sich von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Drei verschiedene Subpopulationen mit jeweils charakteristischen Merkmalen und Funktionen sind beim Menschen beschrieben: myeloide dendritische Zellen, plasmazytoide und Langerhans-Zellen der Haut. Für Tumorzellvaccinierungen sind vor allem myeloide dendritische Zellen von Interesse, da diese in besonderem Maße zur Antigenaufnahme und -präsentation befähigt sind. Dendritische Zellen mit myeloiden Charakteristika können durch eine *in vitro* Kultur von Monozyten in Anwesenheit der Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) gewonnen werden. Alternativ lassen sich dendritische Zellen aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen des peripheren Blutes generieren.



The company Das Unternehmen

Am Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach
Phone +49 (0) 85 43 - 60 16-30, Fax +49 (0) 85 43 - 60 16-49
e-mail: info@pan-biotech.de, http://www.pan-biotech.de

PAN™
BIOTECH GmbH

By the addition of growth factors, e.g. Klt3-ligand, dendritic cells in the blood, which normally make up only approx. 0,1 - 0,5 % of the mononuclear cells, can be expanded many times over.

After activation, dendritic cells reach their full capacity for the T-cell stimulation. For the maturation of the dendritic cells, cytokines (TNF alpha), LPS or monocyte-conditioned medium are used.

Production and serumfree cultivation of dendritic cells from mononuclear cells of peripheral blood (PBMC)

PAN-Biotech has developed an optimised medium for the serumfree cultivation of dendritic cells. PANSERIN™ 416 (basic medium) is supplemented by the growth factors delivered with it and thus allows the serumfree cultivation of dendritic cells.

Separation of Blood with Separating Medium (Pancoll 1,077 g/ml)

The blood samples should be processed as soon as possible after production in order to achieve optimal results. A storage of the blood samples for 24 hours at ambient temperature causes among other things a reduced output of lymphocytes, a change of the surface markers and a reduced response on mitogen stimulation.

- 1) Add Pancoll (3 ml) into a suitable, sterile centrifuge tube under sterile conditions.
- 2) Carefully coat the separating medium with the diluted blood sample (4 ml). **Important: Don't mix** the blood sample with Pancoll!
- 3) Centrifugation at 400 x g for 30 - 40 minutes at 18 - 20 °C.
- 4) After the centrifugation, carefully take off the upper phase (containing serum and platelets) with a pipette without mixing the interphase with the lymphocytes.
- 5) Transfer the lymphocyte band into a new centrifuge tube with a new pipette. Here it is important to take off the whole material of the interphase with as little volume as possible.
- 6) Add at least 3 volumes of a physiological saline solution (6 ml) to the lymphocytes.
- 7) Carefully suspend the lymphocytes with a pipette.
- 8) Centrifugation at 60 - 100 x g for 10 minutes at 18 - 20 °C.
- 9) Reject the supernatant.
- 10) Repeat washing step (point 6 - 9).

Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie z. B. Klt3-Ligand können dendritische Zellen im Blut, die normalerweise nur etwa 0,1 - 0,5 % der mononukleären Zellen ausmachen, um ein Vielfaches expandiert werden.

Dendritische Zellen erlangen nach Aktivierung ihre volle Kapazität zur T-Zellstimulation. Zur Reifung der dendritischen Zellen werden Zytokine (TNF alpha) LPS oder Monozyten-konditioniertes Medium verwendet.

Gewinnung und serumfreie Kultivierung dendritischer Zellen aus mononucleären Zellen aus periphärem Blut (PBMC)

PAN-Biotech hat für die serumfreie Kultivierung von dendritischen Zellen ein optimiertes Medium entwickelt. PANSERIN™ 416 (Basismedium) wird mit den mitgelieferten Wachstumsfaktoren ergänzt und ermöglicht damit die serumfreie Kultivierung von dendritischen Zellen.

Auftrennung von Blut mit Trennmedium (Pancoll 1,077 g/ml)

Die Blutproben sollten so bald als möglich nach der Gewinnung verarbeitet werden um optimale Ergebnisse zu erzielen. Eine Lagerung der Blutproben für 24 Stunden bei Raumtemperatur bewirkt unter anderem eine verminderte Ausbeute an Lymphozyten, eine Veränderung der Oberflächenmarker und eine verminderte Antwort auf Mitogen-Stimulation.

- 1) Unter sterilen Bedingungen Pancoll (3 ml) in ein geeignetes, steriles Zentrifugenröhrchen vorlegen.
- 2) Vorsichtig mit der verdünnten Blutprobe (4 ml) die Trennlösung überschichten. **Wichtig:** Blutprobe und Pancoll **nicht vermischen!**
- 3) Zentrifugation bei 400 x g für 30 - 40 Minuten bei 18 - 20 °C.
- 4) Nach der Zentrifugation obere Phase (enthält Serum und Platelets) vorsichtig mit einer Pipette abnehmen, ohne die Interphase mit den Lymphocyten zu vermischen.
- 5) Mit einer neuen Pipette die Lymphocyten-Bande in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen. Wichtig dabei ist, das gesamte Material der Interphase mit möglichst wenig Volumen zu entnehmen.
- 6) Mindestens 3 Volumina einer physiologischen Salzlösung (6 ml) zu den Lymphocyten geben
- 7) Mit einer Pipette die Lymphocyten vorsichtig suspendieren.
- 8) Zentrifugation bei 60 - 100 x g für 10 Minuten bei 18 - 20 °C
- 9) Überstand verwerfen.
- 10) Waschschrift wiederholen (Punkt 6-9).



The company Das Unternehmen

Am Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach
Phone +49 (0) 85 43 - 60 16-30, Fax +49 (0) 85 43 - 60 16-49
e-mail: info@pan-biotech.de, http://www.pan-biotech.de

PAN™
BIOTECH GmbH