

Arabinosyloxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran) verbessert zellvermittelte Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen gegen Neuroblastome *in vitro* und *in vivo*

ANTONIO PÉREZ-MARTÍNEZ^{1,2}, JAIME VALENTÍN², LUCÍA FERNÁNDEZ³, ENRIQUE HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ², EDUARDO LÓPEZ-COLLAZO², PETRA ZERBES⁴, ELLEN SCHWÖRER⁴, FERNANDO NUÑEZ⁵, INMACULADA GÉNESIS MARTÍN⁵, HANNAH SALLIS⁶, MIGUEL ÁNGEL DÍAZ⁷, RUPERT HANDGRETINGER⁴ a MATTHIAS MANUEL PFEIFFER⁴

¹Abteilung pädiatrische Hämatonkologie des Universitätskrankenhauses La Paz in Madrid, Spanien, ²Gruppe für die Forschung der angeborenen Immunität am Forschungsinstitut des Universitätskrankenhauses La Paz in Madrid, Spanien, ³Klinisches Forschungsprogramm des Nationalen Zentrums für Krebsforschung, Madrid, Spanien, ⁴Kinderuniversitätskrankenhauses in Tübingen, Tübingen, Deutschland, ⁵Labor für Versuchstiere. Institut für Biomedizinische Forschung Albert Solsa, Höchster Ausschuss für wissenschaftliche Forschung, Madrid, Spanien, ⁶Medizinische Fakultät der Universität in Cardiff, Heath Park, Cardiff, Wales und ⁷Abteilung Hämatonkologie und Knochenmark-Transplantation der Kinderuniversitätsklinik Niño Jesús, Madrid, Spanien

Abstrakt

Ziele der Studie. Die zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) spielt bei der natürlichen immunologischen Abwehr bei malignen Tumoren eine grundsätzliche Rolle. Die NK-Zellen erscheinen als neues Mittel der adaptiven onkologischen Behandlung. Arabinosyloxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran) wird als Modifikator der biologischen Reaktion beschrieben, der die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen verbessern kann. Ziel dieser Studie ist es, die Wirkung des Mittels MGN-3/Biobran auf die Aktivierung, Expansion und Zytotoxizität der NK-Zellen gegen Neuroblastomzellen zu untersuchen. **Methoden.** Um magnetische Perlen angereicherte NK-Zellen stimulierten wir mit dem Mittel MGN-3/Biobran. Die Aktivierung der NK-Zellen bewerteten wir mittels Analyse ihrer Phänotypen und verfolgten ihre Expansionsfähigkeit. Die zytotoxische Fähigkeit der aktivierten NK-Zellen wurde *in vitro* gegen Zelllinien K562, Jurkat, A673, NB1691, A-204, RD und RH-30 und *in vivo* gegen Zelllinien NB1691 geprüft. **Ergebnisse.** Die Stimulation der NK-Zellen mit MGN-3/Biobran induzierte eine höhere Expression der mit der Aktivierung assoziierten Rezeptoren CD25 und CD69 als es bei schlafenden Zellen ist ($P < 0.05$). Die Expression der Rezeptoren NKG2D, DNAM, NCR und TLR blieb unverändert. Die Stimulation mit MGN-3/Biobran in der Nacht erhöhte gleichzeitig die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber allen Zelllinien, die *in vitro* geprüft wurden, und verzögerte das Wachstum der Neuroblastomen *in vivo*. Beim Mittel MGN-3/Biobran wird dieser Mechanismus dabei nicht durch Kontaminierung mit Lipopolysacchariden vermittelt. Außerdem unterstützte die Applikation von MGN-3/Biobran das Expandieren der NK-Zellen und ein Absinken der T-Zellen *in vitro*. **Abschlüsse.** Unsere Ergebnisse deuten an, dass MGN-3/Biobran den Spiegel der Aktivierungsmarker der NK-Zellen steuert, die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Neuroblastomen *in vitro* und *in vivo* stimuliert und selektiv auf die Expansion der NK-Zellen wirkt. Diese Ergebnisse können in der Zukunft bei der Behandlung von Neuroblastomen, bei der Entwicklung therapeutischer, auf der Aktivität der NK-Zellen basierender Strategien nützlich sein.

Schlüsselwörter: Arabinosyloxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran), zytotoxische Aktivität, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neuroblastom

Einleitung

Die zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spielt in unserer natürlichen, immunologischen Abwehr gegen die Entwicklung maligner Tumoren eine bedeutende Rolle. Davon zeugt die Tatsache, dass ihre verringerte Aktivität mit einem höheren Risiko der Entwicklung einer Tumorerkrankung bei gesunden Menschen assoziiert wird.[1]. Die hohe zytotoxische Aktivität der NK-Zellen bei Patienten nach Transplantation hämatopoetischer Blutstammzellen wird noch dazu mit einem niedrigeren Rezidivrisiko assoziiert

[2]. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen kann durch gesunden Lebensstil [3-5], Modifikatoren der biologischen Reaktion [6,7], Wachstumshormon [8] und Zytokine [9-12] erhöht werden. Maligne Tumorzellen können die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen durch Abgeben suppressiver Zytokine, bzw. Reduktion der Aktivierungsrezeptoren an den NK-Zellen verringern [13,14]. Die Aktivität der NK-Zellen können auch Gegenstoffe [15,16] und chemotherapeutische Medikamente [17] dämpfen.

Autor: Antonio Pérez-Martínez, MD, PhD, Kinderhämatonkologie des Universitätskrankenhauses La Paz, Paseo de la Castellana 261, Madrid, 28046, Spanien. E-Mail: aperezmartinez@salud.madrid.org

(Studie angenommen: 12. Juni 2014; akzeptiert: 6. November 2014)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.001>

ISSN 1465-3249 Autorenrechte © 2015, Internationale Gesellschaft für Zelltherapie. Herausgegeben: Elsevier Inc. Alle Rechte vorbehalten.

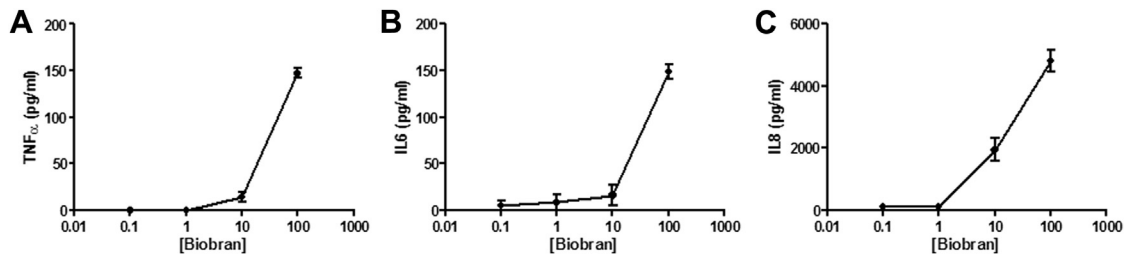


Abb. 1. Zytokinspiegel in kultivierten Supernatanten, bestimmt mithilfe eines Sets mit zytometrischen Perlen Cytometric Bead Array Flex Set (von BD Biosciences) und analysiert mit Durchflusszytometer BD FACSCalibur (von BD Biosciences). (A) Spiegel TNF- α , (B) Spiegel IL-6 und (C) Spiegel IL-8.

Deshalb sollten wir uns bei onkologischen Patienten aber auch bei der gesunden Bevölkerung auf das Erhalten einer hohen zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen konzentrieren.

MGN-3/Biobran ist mit Kohlenhydrate hydrolysierenden Enzymen aus dem Shiitake-Pilz modifizierter Arabinoxylan aus Reiskleie [18]. Es handelt sich um eine Nahrungsergänzung, die nach vorhandenen Publikationen die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumoren bei Erwachsenen *in vitro* und auch *in vivo* erhöht [19,20]. Beschrieben wird ebenfalls sein synergischer, tumorbekämpfender Effekt zusammen mit konventioneller Behandlung auf einige Krebstypen, z.B. Brustkrebs oder hepatozelluläres Karzinom [21-25]. Diese Angaben zeigen eine mögliche potentielle Ausnutzung des Mittels MGN-3/Biobran als Ergänzung bei der Krebsheilung bei Erwachsenen. Bisher wurden aber keine Angaben bezüglich Tumoren bei Kindern publiziert. Unser Ziel war es, die Aufgabe des Mittels MGN-3/Biobran als Stimulator der NK-Zellen gegenüber Tumoren bei Kindern *in vitro* und auch *in vivo* und auch seine Aufgabe beim Expandieren der NK-Zellen bei der Anwendung verschiedener Zytokine-Kombinationen und verschiedenen stimulierenden Zelllinien zu prüfen.

Methoden

Vorbereitung der Zellen

Die Studie wurde vom ethischen Ausschuss unserer Institution genehmigt. Mononukleare Zellen des peripheren Bluts (PBMC) aus Blutproben von gesunden Freiwilligen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Blutschicht wurde dünn auf eine Schicht gleichen Volumens des Separationsmaterials Ficoll-Paque

Plus (GE Healthcare) aufgetragen und bei Zimmertemperatur und Gewicht 400 g 20 Minuten zentrifugiert. Die PBMC wurden entnommen und zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) durchgespült und bei 400 g 10 Minuten zentrifugiert. Die NK-Zellen wurden nachfolgend mit magnetischen Perlen (mit Set zur Isolierung der NK-Zellen - NK cell isolation KIT oder CD56 microbeads; von Miltenyi Biotec) angereichert (siehe online [ergänzendes Bild 1](#) für Rezensenten). Das ganze Blut wurde auf ein Kissen Ficoll aufgetragen und bei Zimmertemperatur und 1800 U/min. 30 Minuten zentrifugiert. Die isolierte Lymphozyt-/Monozytfraktion wurde mit PBS durchgespült und einer Lyse der roten Blutkörperchen (in Ammoniumchloridlösung; Stem Cell Technologies) über 5 Minuten bei Zimmertemperatur unterzogen und nach Einstellen der Reaktion wurden durch Spülen mit PBS die anhaftenden Monozyten im Medium RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies Ltd.), angereichert um 10% fötales Kälberserum in angefeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Die anhaftenden Monozyten wurden 7 bis 10 Tage kultiviert, um eine Differenzierung der Makrophagen zu ermöglichen. Die Makrophagen wurden hier als Biosensoren zur Identifikation der optimalen Dosis des Mittels MGN-3/Biobran benutzt, welches die NK-Zellen stimuliert aber nicht die Makrophagen.

Reagenzienmittel

In der Studie wurden diese monoklonalen Antikörper (mABS) benutzt: CD3PE-Cy7, CD45-FITC, CD69-FITC a CD314 (NKG2D)-APC (alle von Becton Dickinson); CD56-APC, CD25-PE, CD336

Tabelle I. Stimulationswirkung der nächtlichen Inkubation mit Biobran und IL-15 auf die Aktivierung der Rezeptoren der NK-Zellen.

	Schlafend		Stimuliert mit Biobran		Stimuliert mit IL-15		Verhältnis Biobran/ IL-15/ Schlafend	Verhältnis IL- 15/ Schlafend
	MFI	SD	MFI	SD	MFI	SD		
CD69	508.3	889.2	1591.7	741.1	18032.6	14136.6	3.13	35.48
CD25	481	448.9	1537	520.3	1864	2843.8	3.2	3.88
NKG2D	4634.2	5762	5074.3	4761	9914.9	11491	1.09	2.14
DNAM	1960.6	2529	2501.1	1174	3344.8	5391	1.28	1.71
NKp44	1017.7	1473	1808	2780	886.3	2110	1.78	0.87
NKp30	1300.7	1990	1519.8	2508	4971.5	1567	1.17	3.82
NKp46	1134.4	1044	1159.4	1695	1568.8	1187	1.02	1.38
TLR4	2654	2858	1348	2533	1963	2150	0.51	0.74
TLR9	5854	6284	5200	6448	8779	6231	0.89	1.50

Die Angaben drücken MFI (mittlere Fluoreszenzintensität), SD (Standardabweichung) und Verhältnisse bei 3 gesunden Kontrollpersonen aus. Die fett gedruckten Buchstaben indizieren die statistische Bedeutung.

(NKp44)-PE und CD335 (NKp46)-PE (alle von Beckman Coulter); CD337 (NKp30)-PE (von Miltenyi Biotec). Mit Fluorchrom markierte mAbs gegen TLR-4 und TLR-9 erhielten wir von Enzo Life Sciences AG.

Interleukin (IL)-15 erhielten wir von CellGenix und IL-2 (Proleukin) von der Firma Novartis. MGN-3/Biobran gewährte die Firma Daiwa Pharmaceuticals Co Ltd. Als Ligand des Toll-like Rezeptors-4 (TLR-4) wurde Lipopolysaccharid (LPS; von Sigma 0127:B8) und als Inhibitor der LPS induzierten Aktivierung des TLR-4 wurde Polymyxin B (von InvivoGen) benutzt.

Zelllinien

Als Zielzellen der Prüfung der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen *in vitro* wurden die Zelllinien K562 Erythroleukämie, Jurkat T lymphatische Leukämie, A673 Ewing-Sarkom (alle von ATCC), weiter die Zelllinien NB1691 Neuroblastom (gewährt von Dr. A. Davidoff aus der Kinderforschungsklinik Sv.Juda), die Zelllinie A-204 embryonales Rhabdomyosarkom, RD embryonales Rhabdomyosarkom und RH-30 alveoläres Rhabdomyosarkom (alle von DSZM) benutzt. Die Zelllinie aus Luciferase transduzierten Neuroblastomen (NB1691luc), die Dr. A. Davidoff zur Verfügung stellte, wurde *in vitro* und im quantitativen Mausmodell *in vivo* benutzt [26,27]. Als „Feeder“ Zellen für die Aktivierung und die Expansion der NK-Zellen wurden diese Zelllinien benutzt: bestrahlte K562 und K562 mit Expression mit auf Membranzellen gebundenen IL-15 und 4-1BBL (K562-mb15-41BBL, zur Verfügung gestellt von Dr. D. Campan von der Nationalen Universität in Singapur) [28].

Phänotyp-Analyse

Der Oberflächen-Phänotyp wurde für die über Nacht mit MGN-3/Biobran (100 µg/ml) stimulierten NK-Zellen, weiter für die über Nacht mit IL-15 (10 ng/ml) stimulierten NK-Zellen, der schlafenden NK-Zellen und der expandierten NK-Zellen von drei gesunden, erwachsenen Freiwilligen mit Hilfe 6-farbiger Fluoreszenzverfärbungen bestimmt. 5 × 10⁵ frische NK-Zellen aus verschiedenen Bedingungen haben wir bei 4°C über 30 Minuten mit den zugehörigen nicht humanen monoklonen Mausantikörpern gefärbt. Die Zellen wurden anschließend zweimal in kalter PBS durchgespült und in 0,5 ml PBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometer FACSCanto II (Becton Dickinson) analysiert. Für jedes oberflächiges Zellenantigen wurde das Prozent der positiven Zellen und das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Beim Testen der Kontrollgruppe wurden die entsprechenden Isotope der Kontrollantikörper benutzt.

Prüfungen der Zytotoxizität und der Stimulierung der NK-Zellen

Die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen wurde mit konventionellem 2-Stunden-Test auf Freiwerden von

MGN-3/Biobran verbessert die Zytotoxizität der NK-Zellen 3

Europium-2,2':6',2"-Terpyridin-6,6"-dicarboxyl-Säure (Perkin-Elmer Wallac) geprüft, wie in [29] beschrieben wurde. Als Zielzellen wurde Zellen aus den Ziellinien K562, Jurkat, A673, NB1691, A-204, RD und RH-30 benutzt. Die Zielzellen wurden mit einem die Fluoreszenz verbesserndem Ligand (Bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2"-Terpyridin-6,6"-Dicarboxylat) markiert. Dieser hydrophobe Ligand durchdringt schnell die Zellmembran. In der Zelle verursacht die Hydrolyse der Esterbindungen, dass der Ligand hydrophil wird und so unfähig, die Zellmembrane zu durchdringen. Die Zytolyse verursacht aber ein Freiwerden des Ligands und dessen endgültiges Reagieren mit dem Europium. Dessen Ergebnis ist ein stabiles fluoreszentes Chelat, das fluorometrisch (mit Leser F200 Reader von TECAN Group Ltd.) bewertet werden kann. Für das Berechnen der spontanen und spezifischen Zytotoxizität wurden diese Formeln angewendet:

% spezifisches Freiwerden

$$= \frac{(\text{experimentelles Freiwerden} - \text{spontanes Freiwerden})}{(\text{maximales Freiwerden} - \text{spontanes Freiwerden})} \times 100$$

% spontanes Freiwerden

$$= \frac{(\text{spontanes Freiwerden} - \text{Untergrund})}{(\text{maximales Freiwerden} - \text{Untergrund})} \times 100$$

Die von gesunden Freiwilligen gewonnenen NK-Zellen wurden über Nacht mit 100 µg/ml MGN-3/Biobran, 10 ng/ml IL-15, 40 IU/ml oder 1000 IU/ml IL-2, resp. Kombination MGN-3/Biobran und 40 IU/ml IL-2 stimuliert. Die Kultivierung verlief im Kultivierungsmedium (RPMI 1640 angereichert um 10% durch Wärme inaktiviertes fötales Kälberserum, 100 IU/ml Penizillin, 100 ng/ml Streptomycin und 2mmol/l Glutamin) in angefeuchteter Atmosphäre 5% CO₂ und 95% Luft. Die Zytotoxizität wurde mit oben beschriebener Methode bewertet.

Mausmodell

12-Wochen-Mäusen NOD-scid IL-2Rgnull wurden intravenös Neuroblastomzellen NB-1691luc in einer Menge von 2 × 10⁵ gespritzt. Für das Isolieren der NK-Zellen haben wir mononukleare Zellen der Peripherbluts gesunder Freiwilliger benutzt. Die NK-Zellen wurden nachfolgend durch Selektion magnetischer Perlen (mit Set cell isolation KIT von Miltenyi Biotec) angereichert. Die erhaltenen NK-Zellen waren > 90 % CD3-CD56+. Benutzt wurden frische NK-Zellen, resp. über Nacht in 100 µg/ml Mittel MGN-3/Biobran aktivierte NK-Zellen. Die intravenöse Therapie der NK-Zellen begann 7 Tage nach Einspritzen der Tumorzellen und wurde über 4 Wochen zweimal wöchentlich durchgeführt. Im Rahmen zweier unabhängiger Experimente (je 4 Mäuse in jeder Gruppe) haben wird die nicht behandelte Gruppe (Kontrollgruppe) mit der Gruppe verglichen, der 1 × 10⁶ schlafende NK-Zellen (NK-Gruppe) und der Gruppe, der 1 × 10⁶ NK-Zellen,

4 A. Pérez-Martínez und Koll.

über Nacht in 100 µg/ml Mittel MGN-3/Biobran stimuliert wurden (Gruppe NK-Biobran), gereicht wurden. Die bioluminiszente Abbildung wurde am 7., 14., 28. und 42. Tag ab Therapiebeginn nach Spritzen von 100 µl in phosphatgepufferter physiologischer Lösung mit Konzentration 15 mg/ml aufgelöstem Luciferin realisiert.

Fünf Minuten nach Einbringen des Substrats wurden die Tiere mittels Isofluran in Narkose gebracht (Anästhesie in Konzentration 3% eingeführt und nachfolgend auf Niveau 1,5 % gehalten) und in das Gerät zur fluoreszenten und bioluminiszenten Abbildung (Xenogen IVIS Lumina II (Quantitative), Xenogen Corporation, Hopkinton, MA) geschoben. Die angefertigten Bilder unterschiedlicher Exposition wurden mit Software Xenogen Living Image Software (Version 3.2) analysiert. Für die grafische Darstellung der bioluminiszenten Abbildung wurde ein rechteckiger Bereich ausgewählt, der die gesamte Brustkorb- und Bauchhöhle der Maus erfasste und der Gesamtfluss (Photonen pro Sekunde) wurde in Lage auf dem Rücken und auch auf dem Bauch bei 180-Sekunden-Exposition gezählt. Dieser Wert wurde in Beziehung zu vergleichbarem Wert des Fonds (von Kontrollmaus ohne Tumor, nur Luciferin gespritzt) kalibriert. Alle Versuche erfolgten im Einklang mit den Anweisungen unseres Instituts für den Umgang mit Tieren und nach Kriterien, die in den Anweisungen der einzelnen Nationalen Gesundheitsinstitutionen für die Anwendung und den Umgang mit Labortieren festgelegt sind.

Aktivierung und Expansion der NK-Zellen

Zur Expansion kam es innerhalb 14 Tagen in den Kulturen mit und auch ohne 100 µg/ml Mittel MGN-3/Biobran und Zytokinen (100 IU/ml IL-2 oder 100 IU/ml IL-2 plus 10 ng/ml IL-15), resp. in den zusätzlich mit bestrahlten Feeder in Form von Zellen K562, resp. K562-mb15-41BBL angereichert wurden[28]. Kurz, die von 5 gesunden, erwachsenen Freiwilligen gewonnenen mononuklearen Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) isoliert. Diese Zellen wurden auf Laborplatte mit 6 Plätzen mit oder ohne Mittel MGN-3/Biobran und menschlichen Zytokinen (IL-2, IL-2 + IL-15), resp. im Verhältnis 1:1,5 zusammen mit einer subletalen Dosis bestrahlter Feederzellen der Linien K562, resp. K562-mb15-41BBL inkubiert. Kultivierungsmedium war RPMI 1640 angereichert um 10% frisch eingefrorenes menschliches Plasma AB, L-Glutamin und Penizillin-Streptomycin (Biochrom). Frisches Medium wurde alle 2 Tage hinzugefügt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen entnommen und auf Phänotyp und *in vitro* Zytotoxizität der NK-Zellen analysiert.

Cytometric bead array und Analyse der

Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Kontaminierung des Mittels MGN-3/Biobran mit Agonisten des Toll-like Rezeptors

Durch Technik Cytometric bead array Flex Set (von BD Biosciences) wurden unter Einhalten des Herstellerprotokolls freigewordene Tumornekrosefaktoren (TNF)-α, IL-6 und IL-8 detegiert und anschließend mit

Durchflusszytometrie mit Durchflusszytometer BD FACSCalibur (BD Biosciences) in den menschlichen Makrophagen nach Einwirken von Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml), resp. auch des Mittels MGN-3/Biobran (in Konzentrationen 10, 100, 1000 a 10000 µg/ml) analysiert. Die Konzentration 100 µg/ml des Mittels Biobran wurde als höchste bestimmt, die keine Entzündung induzierte (Ansteigen TNF-α, IL-6 und IL-8, Abb. 1). MGN-3/Biobran wurde auf potentielle agonistische Wirkung gegenüber den Toll-like Rezeptoren TLR-2, -3, -4, -5, -7, -8 und 9 von InvivoGen getestet. Angesichts dessen, dass auch LPS Spuren im Mittel MGN-3/Biobran die Zytotoxizität der NK-Zellen, signalisiert durch TLR-4, erhöhen könnten, führte die Firma BioChem GmbH einen Test auf Anwesenheit von Kontaminanten Lipopolysaccharid/Endotoxin als Ligand TLR-4 im Mittel MGN-3/Biobran (100 µg/ml) durch. Außerdem quantifizierten wir die Anwesenheit von LPS/Endotoxin auch durch chromogenische Prüfung (mit Set ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit von der Firma GenScript). Nachfolgend führten wir Prüfungen der *in vitro* Zytotoxizität gegen Zelllinie K562 und NB1691 unter Benutzung von LPS (10 ng/ml) als Stimulator der NK-Zellen und Polymyxin B (100 mkg/ml) als Inhibitor der indizierten Aktivierung TLR4 durch. Danach führten wir dann noch zum Vergleich eine Prüfung der Zytotoxizität gegen die Zelllinie NB1691 bei Applikation von MGN-3/Biobran als Stimulator der NK-Zellen und Polymyxin B als Inhibitor durch.

Statische Analyse

Die Ergebnisse sind als durchschnittliche $\pm$ SD (Standardabweichung) angegeben. Für den Vergleich der Wirkung von MGN-3/Biobran auf den Phänotyp, die Zytotoxizität und das Expansionsmaß der NK-Zellen wurde der nichtparametrische Wilcoxon Test angewendet. Im Mausmodell wurde die Überlebensrate durch Kaplan-Meier-Schätzer mit einer Variablen geschätzt und unter Anwendung des Logranktestes verglichen. Die statistische Bedeutung wurde mit $P < 0,05$ bestimmt.

Ergebnisse

Phänotypisierung der NK-Zellen

Die Stimulierung der NK-Zellen mit MGN-3/Biobran führte zu einer erhöhten Expressionsrate der CD69 und CD25 vom Durchschnitt 9%-88%, resp. 6%-90% (dabei erhöhte sich die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) 3,1-, resp. 3,2-fach). Der Prozentsatz und MFI der übrigen überprüften Rezeptoren blieben unverändert. Bei mit IL-15 stimulierten NK-Zellen, die als positive Kontrolle benutzt wurden, erhöhte sich die durchschnittliche Expressionsrate der einzelnen Marker wie folgt: CD25 6%-92%, Verhältnis MFI 3,9-fach erhöht, CD 69 9%-98%, Verhältnis MFI 35,5-fach erhöht, NKG2D 92%-97%, Verhältnis MFI 2,1-fach erhöht, DNAM 81%-96%, Verhältnis MFI 1,7-fach erhöht und NKp30 54 bis 81, Verhältnis MFI 3,8-fach erhöht. Tabelle I und Abb. 2. Die Abbildungen A und B zeigen die Reaktion der Aktivierungsrezeptoren an den NK-Zellen auf die nächtliche Stimulierung mit MGN-3/Biobran und IL-15.

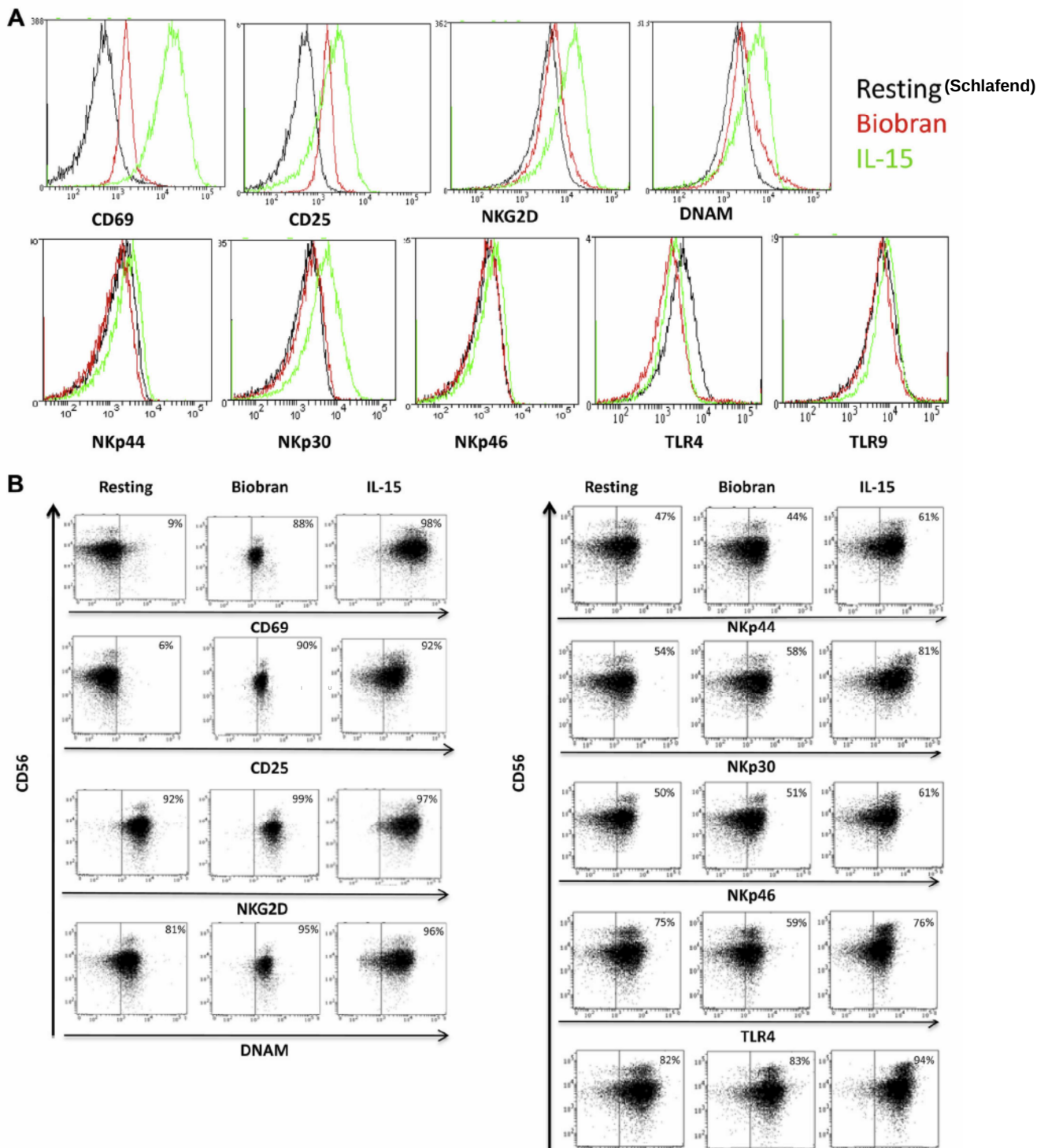


Abb. 2. (A) Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Aktivierungsrezeptoren der NK-Zellen: schlafend (schwarze Kurve), mit MGN-3/Biobran stimuliert (rote) und mit IL-15 stimuliert (grüne) an 3 kontrollierten gesunden Individuen (B) Prozentsatz der exprimierten Aktivierungsmarker an den schlafenden, mit MGN-3/Biobran bzw. IL-15 stimulierten NK-Zellen.

Zytotoxische Prüfung in vitro

Die nächtliche Stimulation mit MGN-3/Biobran verursachte einen markanten Anstieg der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber allen getesteten Zelllinien bei einem Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen 8:1 (K562, NB1691, Jurkat, A673) resp. 10:1 (A-204, RD, RH-30) im Vergleich zu den schlafenden NK-Zellen (Abb. 3A, K562 80% gegenüber 69%, $P = 0.03$, NB1691 41% gegenüber 23%, $P = 0.03$, Jurkat 40% gegenüber 19%, $P = 0.03$, A673 34% gegenüber 13%, $P = 0.02$, A204 34% gegenüber 18%, $P = 0.03$, RD 45% gegenüber 22%, $P = 0.002$, RH-30 34% gegenüber 18%, $P = 0.02$). Die Stimulation mit IL15 führte zu einem noch höheren Prozent der Lyse der Linien K562 (100%), NB1691 (61%), Jurkat (60%) und A673 (58%) (Abb. 3B). Zur Überprüfung der synergischen Wirkung von IL-2 und MGN-3/Biobran verglichen wir die Stimulation mit hoher Dosis IL-2 (1000 IU/ml) mit der Stimulation mit niedriger Dosis IL-2 (40 IU/ml) und niedriger Dosis IL-2 + MGN-3/Biobran. Die Anreicherung der niedrigen Dosis IL-2 mit MGN-3/Biobran verbesserte den Stimulationseffekt 40 IU/ml IL-2 und erreichte vergleichbare Zytotoxizität wie 1000 IU/ml IL-2. (Abb. 3C). Um das Sicherheitsprofil der mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen zu prüfen, führten wir einen Test der Zytotoxizität an negativen Kontrollmustern (autologe CD56 negative Zellen) durch. Diese zeigten die Absenz der Zytotoxizität (ergänz. Abb. 2 und ergänz. Tabelle I für die Rezensenten).

In vivo Modell

Um zu überprüfen, ob der Stimulationseffekt des Mittels MGN-3/Biobran auf NK-Zellen *in vitro* klinische Bedeutung hat, erweiterten wir unsere Forschung auf ein *in vivo* Xenograftmodell des mit Luciferase transfektierten Neuroblastoms. Auf Abb. 4A sind ventrale und dorsale Bioabbildungen von 3 repräsentativen Mausgruppen denen phosphatgepufferte physiologische Lösung (Kontrollgruppe), 1×10^6 schlafende NK-Zellen, resp. 1×10^6 MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen eingegeben wurden. In der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit den schlafenden NK-Zellen kam es zu einer dramatischen Progression der Tumore NB1691, wobei in der Gruppe, der 1×10^6 MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen gereicht wurden, eine markante Inhibition des Neuroblastomwachstums beobachtet wurde (Abb. 4B und ergänz. Tabelle II für die Rezensenten). Bei mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen haben wir im Modell mit Mäusen NOD/scid/IL2R γ null-hu zusätzlich eine markant höhere Überlebensrate beobachtet ($P < 0.05$; Abb. 4C).

Aufgabe des MGN-3/Biobran beim Expandieren der NK-Zellen

Nach 2 Wochen Kultivierung zeigte sich, dass die NK-Zellen intensiver in der mit MGN-3/Biobran angereicherten Kultur expandieren (ergänz. Tabelle III). Bei den mit MGN-3/Biobran angereicherten Kulturen trat noch dazu eine Verringerung der T-Zellen Expansion ein (Abb. 5A). Das Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kulturen mit IL-2 und IL-2 + IL-15 verursachte keine statistisch

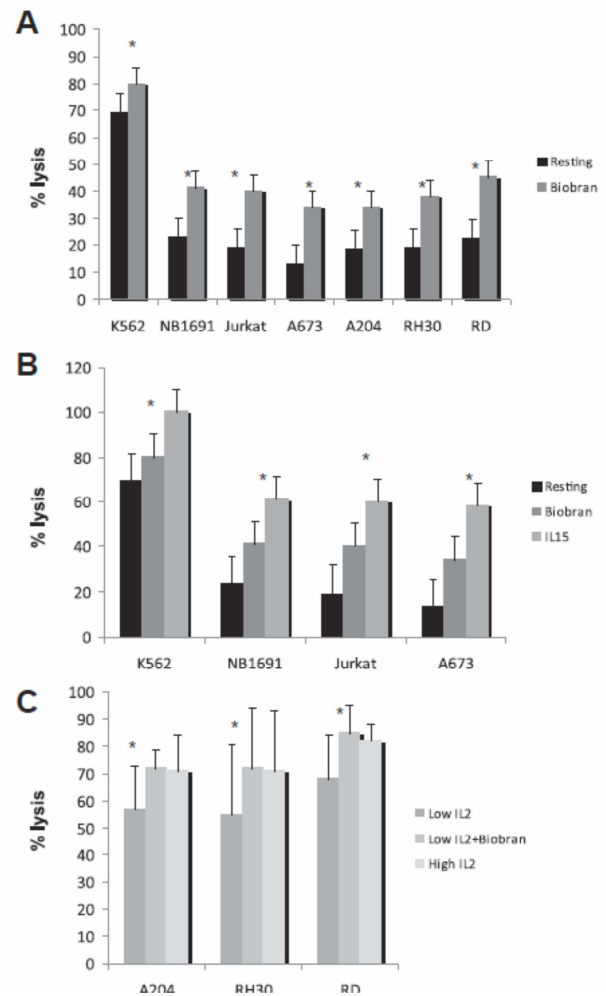


Abb. 3. (A) Zytotoxische Aktivität der mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen gegenüber den Zelllinien K562, NB1691, Jurkat, A673 (Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen 8:1), A-204, RD und RH-30 (Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen 10:1). (B) Zytotoxische Aktivität der mit IL-15 und MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen gegenüber den Zelllinien K562, NB1691, Jurkat, A673 (Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen 8:1). (C) Zytotoxische Aktivität der mit IL-2 und MGN-3 stimulierten NK-Zellen gegenüber A-204, RD und RH-30 (Effektorzellen zu Zielzellen 10:1). Die Angaben enthalten die Ergebnisse von 3 gesunden Freiwilligen in 3 unabhängigen Versuchen. *Das Ergebnis ist statistisch bedeutsam.

bedeutenden Differenzen in den NKT- und in den B-Zellen. Die zytotoxische Aktivität der expandierten NK-Zellen änderte sich nach Zufügen von MGN-3/Biobran in das Kultivierungsmedium unwesentlich (Bild 5B). Demgegenüber verstärkte Hinzufügen von IL-15 die Zytotoxizität im Vergleich mit nur IL-2 und dies sogar bei Benutzung transfektierte K562.

Stimulationsmechanismus der NK-Zellen mit MGN-3/Biobran

Weil menschliche Zellen auch mit Toll-like Rezeptoren (TLR) stimuliert werden können, testeten wir das Auslösen der TLR unter Einfluss von MGN-3/Biobran unter Anwendung humaner Makrophagen als Biosensoren, um die optimale Dosis des Mittels MGN-3/Biobran zu finden, welche die NK-Zellen stimuliert und gleichzeitig noch nicht die Makrophagen stimuliert. Es zeigte sich, dass nur hohe Spiegel des Mittels MGN-3/Biobran

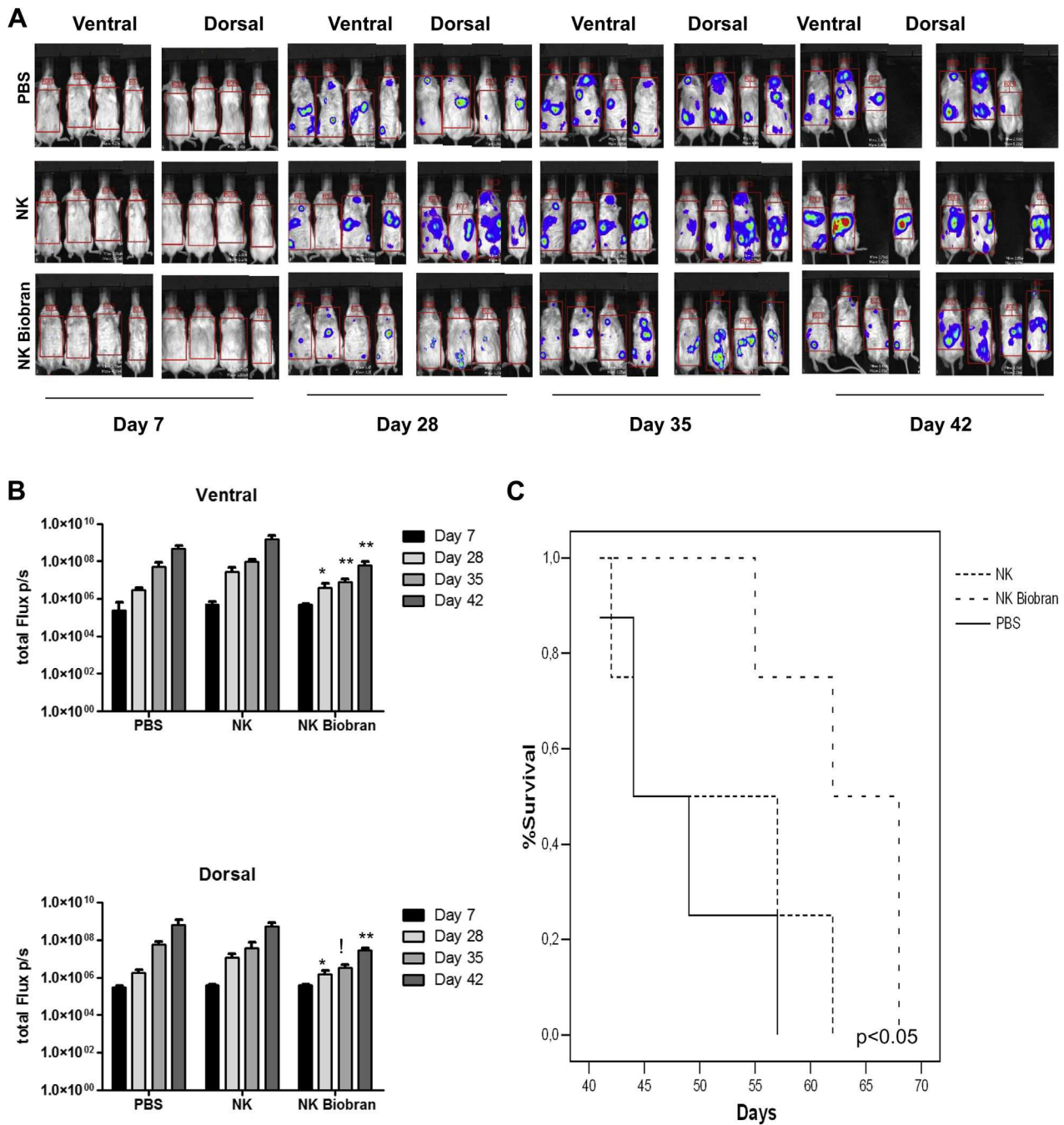


Abb. 4. (A) Die Luciferase ausstrahlenden Bilder der Tumore NB1691 illustrieren das Neuroblastomvolumen bei Mäusen, denen phosphatgepufferte physiologische Lösung (Kontrollgruppe), 1×10^6 frisch isolierter schlafender NK-Zellen, resp. 1×10^6 MGN-3-stimulierter NK-Zellen gereicht wurden (in 8 intravenösen Injektionen, die über 4 Wochen zweimal wöchentlich gegeben wurden). Abgebildet sind jeweils drei repräsentative Individuen jeder Gruppe in ventraler und dorsaler Darstellung mit Markierung des Interessenbereichs. (B) Das Vielfache des Tumolvolumens in Beziehung zu den Ausgangswerten war in der Mausgruppe, der MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen gespritzt wurden, markant niedriger als in der Kontrollgruppe, resp. in der Gruppe, der schlafende NK-Zellen gegeben wurden. (C) Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen die Überlebensrate der Mäuse der einzelnen Gruppen. Die Angaben sind statistisch bedeutend im Vergleich mit der Kontrollgruppe. * Die Angaben sind statistisch bedeutend im Vergleich mit der Gruppe, der schlafende NK-Zellen gegeben wurden. **Die Angaben sind statistisch bedeutend im Vergleich mit beiden Gruppen.

(10 mg/ml) verursachten ein Freiwerden von IL-8, IL-6 und TNF- α (4776, 164, resp. 132 pg/ml) siehe Abb. 1. Noch dazu waren diese Messwerte bedeutend niedriger als die, die bei der Stimulierung mit Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml) (7487, 362, resp. 208 pg/ml) beobachtet wurden.

Mit Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) beobachteten wir Spuren einer Kontaminierung des Mittels MGN-3/Biobran mit Lipopolysaccharid (Eu/ml = 1,68). Um die Rolle der Kontaminierung des Mittels MGN-3/Biobran im Stimulationsmechanismus zu prüfen, führten wir *in vitro* Tests der Zytotoxizität gegenüber NB1691 durch.

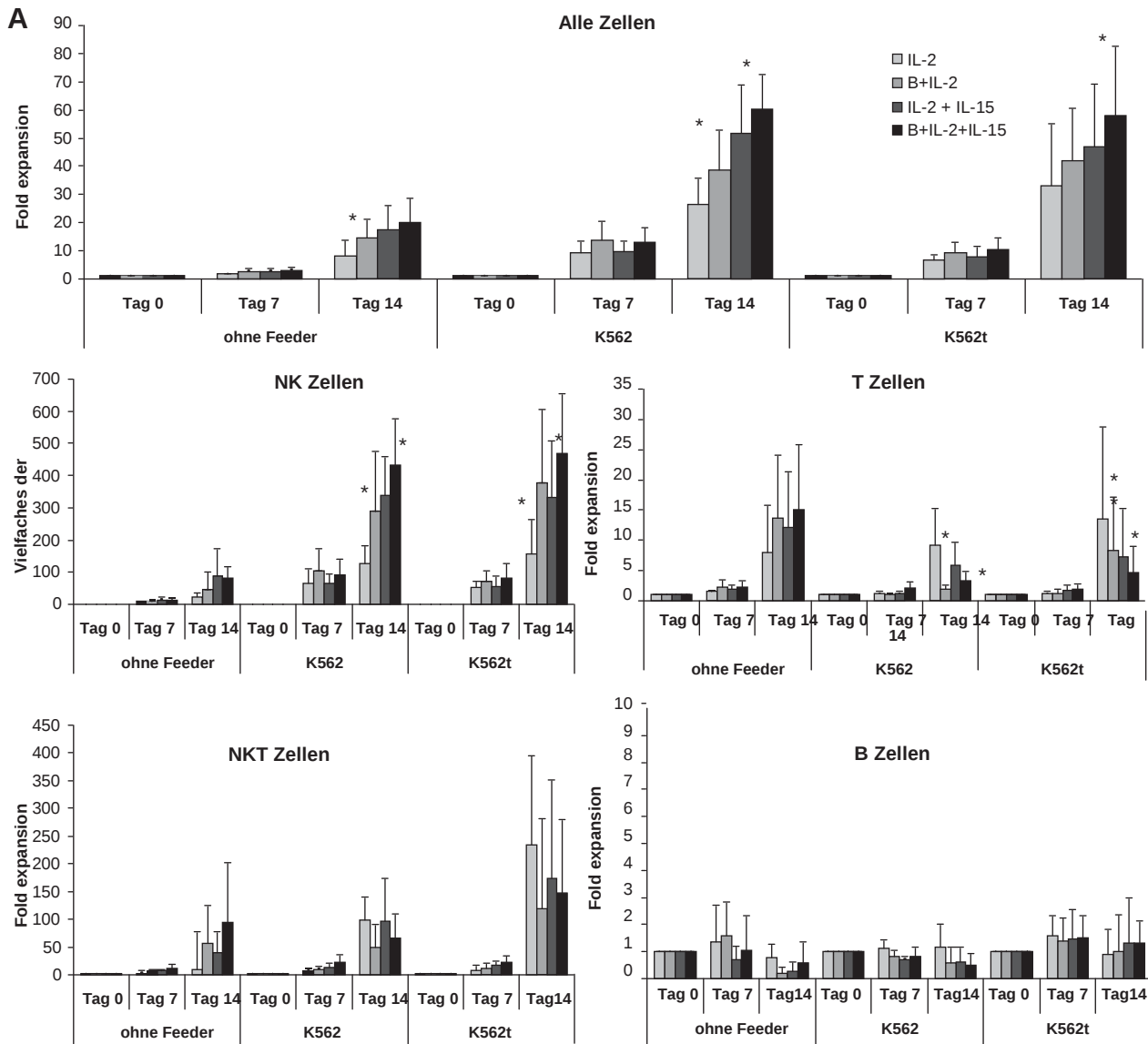


Abb. 5. (A) Kinetik aller Zellen zusammen und der NK-Zellen, T-Zellen, NKT-Zellen, resp. B-Zellen einzeln von 5 gesunden Freiwilligen nach 14 Tagen Expandieren in Kultivierungsmedien mit oder ohne Mittel MGN-3/Biobran und Zytokinen (IL-2 oder IL-2 + IL-15), resp. höchstens angereichert mit bestrahlten Feederzellen der Linien K562, resp. K562-mb15-41BBL. *Ergebnis ist statistisch bedeutend. (B) Zytotoxische Aktivität der expandierten NK-Zellen nach Zufügen von MGN-3/Biobran in das Kultivierungsmedium.

Die Tests wiesen eine erhöhte zytotoxische Aktivität der mit LPS stimulierten NK-Zellen gegenüber schlafenden NK-Zellen aus. Die Applikation von Polymyxin B konnte die Wirkung der LPS-Stimulierung aber aufheben (Abb. 6A). Demgegenüber blieb die Stimulationswirkung des Mittels MGN-3/Biobran auf die NK-Zellen nach Applikation von Polymyxin B ungeändert (Abb. 6B). Der Stimulationsmechanismus der NK-Zellen wird also nicht durch die Kontaminierung des Mittels MGN-3/Biobran mit LP-Saccharid vermittelt.

Diskussion

Die publizierten Ermittlungen deuten an, dass die Anwendung des Mittels MGN-3/Biobran bei der Behandlung von Krebs bei einigen erwachsenen onkologischen Patienten die Ergebnisse verbessern kann [30,31]. Die klinische Forschung an erwachsenen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom zeigte, dass

die Ergänzung unterstützender Therapien, einschließlich transarterieller Chemoembolisation, perkutanen Ethanol-Injektionen, Radiofrequenzablation und Kryoablation um MGN-3/Biobran die gesamte Überlebensrate verbessern konnte [21]. Die Publikation führt ebenfalls an, dass die Ergänzung der Behandlung mit MGN-3 die angeborene Immunität bei vielen Patienten mit Myelom dadurch erhöhte, dass die Zytotoxizität der NK-Zellen, die Anzahl der myeloiden Dendritzellen und die Konzentration der Th1 Zytokine erhöht wurden [32]. Bisher stehen keine publizierten Angaben hinsichtlich der Ausnutzung des Mittels MGN-3/Biobran bei pädiatrischen Tumoren zur Verfügung.

Unsere Studie zeigt, dass die Stimulierung der NK-Zellen mit MGN-3/Biobran *in vitro* und auch *in vivo* die zytotoxische Aktivität dieser Zellen gegenüber verschiedenen Zelllinien von pädiatrischen Tumoren verbesserte. Wir wiesen ein erhöhtes Maß der NK-Zellen vermittelten Zerstörung

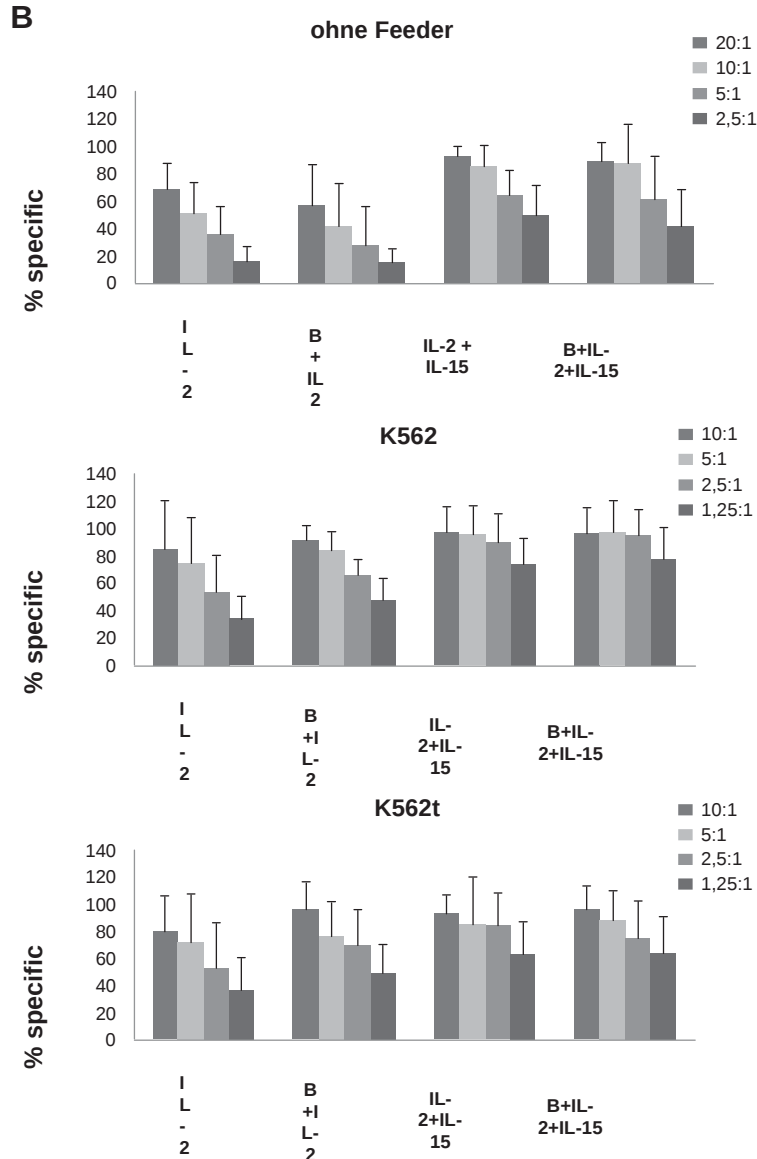


Abb. 5. (Fortsetzung).

der Zelllinien akuter Leukämie, Neuroblastome, Ewing-Sarkome, embryonaler Rhabdomyosarkome und alveolärer Rhabdomyosarkome *in vitro* nach Stimulation mit MGN-3/Biobran nach. Ebenso beobachteten wir eine starke Inhibition des Neuroblastomwachstums und eine markante Verbesserung der Überlebensrate bei Anwendung MGN-3/Biobran stimulierter NK-Zellen im Mausmodell (NOD/scid/IL-2R γ null) mit Neuroblastom. Diese Angaben sind im Einklang mit früher publizierten Angaben über Malignitäten bei Erwachsenen. [20-25].

Mechanismus und Dosis, bei denen MGN-3/Biobran die Aktivität der NK-Zellen erhöht, bleiben unbekannt. Wir schätzen ein, dass hinter der nützlichen Wirkung, welche nach unseren Beobachtungen, die Behandlung der NK-Zellen mit MGN-3/Biobran hat, eine ganze Reihe Immunitätsmechanismen steht. Da hohe Dosen des Mittels MGN-3/Biobran eine Modifikation der Makrophagen von Phase M0 in M1 mit nachfolgendem Freiwerden von IL-6, IL-8 und TNF- α verursacht, zogen wir eine niedrige Dosis MGN-3/Biobran in Betracht, um die Aktivierung der NK-Zellen, die durch eine Entzündung hervorgerufen würde, zu eliminieren. Weil NK-Zellen auch durch agonistische Toll-

like Rezeptoren (TLR) stimuliert werden können, musste auch berücksichtigt werden, dass auch eine Kontaminierung des MGN-3/Biobran mit Lipopolysaccharid (LPS) durch Signalisierung der TLR-4 die Zytotoxizität der NK-Zellen erhöhen könnte. In unserer Studie wurde eine leichte Kontaminierung mit LPS beobachtet. In jedem Fall hob die Neutralisierung des LPS mit Polymyxin B nicht die stimulierende Wirkung von MGN-3/Biobran auf und es kann eingeschätzt werden, dass eine Kontaminierung mit LPS nicht bestimmender Mechanismus für die Stimulierung der NK-Zellen durch MGN-3/Biobran ist. Nach unseren Ermittlungen aktiviert MGN-3/Biobran schlafende NK-Zellen, kann aber nicht weiter mit IL-15 expandierende Zellen aktivieren, auch wenn es die Expansion in dieser Phase augmentiert.

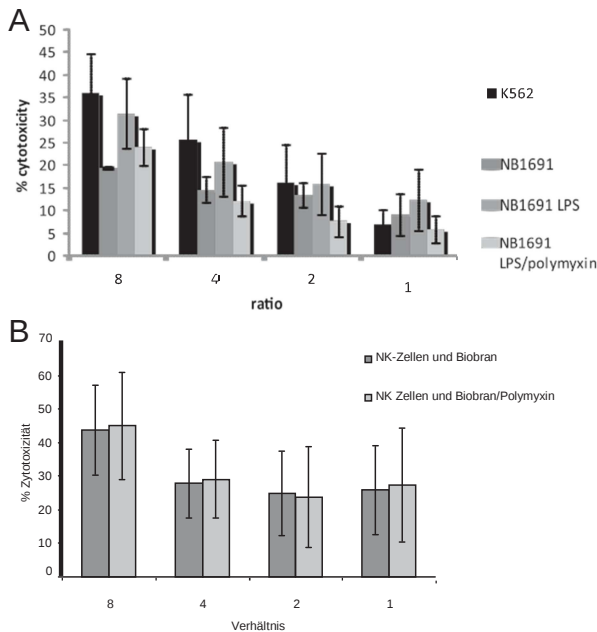


Abb. 6. (A) LPS-Stimulation erhöht die Zytotoxizität schlafender NK-Zellen gegenüber NB1691. Dabei hebt Polymyxin B die LPS-Stimulation bis auf das Niveau des Schlafzustands auf. (B) MGN-3/Biobran stimuliert die NK-Zellen gegenüber NB1691, Polymyxin B antagonisiert dies nicht.

Diese Tatsache deutet die Anwesenheit eines Mechanismus an, der sich teilweise mit IL-15 deckt. Weitere, mögliche Theorie ist die apoptische Wirkung, vermittelt aus aktivierten NK-Zellen durch abgegebene TNF- α und IFN- γ [30,33]. Diese Theorie unterstützen auch unlängst veröffentlichte Angaben darüber, dass das Hinzufügen von MGN-3/Biobran zur Chemotherapie eine synergistische Wirkung hat. Davon zeugten vor allem eine erhöhte Apoptose und Inhibition der Zellproliferation bei Brustkrebs [34]. Weiterer möglicher Mechanismus könnte eine Augmentation der Rezeptoren auf MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen sein. An MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen gesunder Freiwilliger beobachteten wir einen Anstieg der Spiegel mit Aktivierung der assoziierten Rezeptoren CD69 und CD25. Eine Erhöhung der CD69 an den NK-Zellen korreliert dabei mit der Erhöhung ihrer Zytotoxizität [35-37]. Vom Proliferationspotential zeugt auch der Anstieg der Expression der CD25 auf die NK-Zellen [38]. Und letztlich sprechen publizierte Berichte über eine Interaktion des Mittels MGN-3/Biobran mit weiteren Immunitätszellen [39,40].

Gegenwärtig wird bei der Krebsbehandlung adoptiver Transfer *in vitro* aktivierter NK-Zellen genutzt. Neueste Studien zeigen, dass NK-Zellen mithilfe verschiedener Methoden, wie Ausnutzen der Linie K562-mb15-41BBL als Feederzellen, in großen Mengen *ex vivo* expandieren können [28]. Diese expandierten NK-Zellen zeigten tumorbekämpfende Aktivität *in vitro* gegenüber einer Reihe Zelllinien und Malignitäten erwachsener und pädiatrischer Tumoren [41-43]. Wenn wir MGN-3/Biobran verschiedenen Expansionsprotokollen hinzufügten, beobachteten wir eine Verbesserung der Expansion der NK-Zellen bei Erhalten der zytotoxischen Aktivität und Reduktion der Proliferation der T-Zellen.

Diese Angaben könnten bei der Realisierung umfangreicher Expansionen hoch zytotoxischer klinischer NK-Zellen interessant sein, insbesondere in allogener Umgebung, in der T-Zellen eliminiert werden müssen, um Erkrankungen aus Intoleranz zum Transplantat vorzubeugen. Die Anwendung von MGN-3/Biobran in Kombination mit einer niedrigen Dosis IL-2 erhöhte weiter auch die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen in gleichem Maße wie eine hohe Dosis IL-2. Diese Angaben sind in Übereinstimmung mit früheren Studien [44]. MGN-3/Biobran und eine niedrige Dosis IL-2 wirken also synergisch. Deshalb ist dieses Vorgehen als Vorbeugung vor mit der Behandlung mit hoher Dosis IL-2 *in vivo* zusammenhängender Toxizität günstig. Die Angaben aus Studien erwachsener Patienten deuten an, dass die Anwendung von MGN-3/Biobran als Alternative oder Ergänzung verschiedener Immunotherapien bei der Behandlung von Malignitäten günstig sein kann [20,22,24]. Unsere Ergebnisse erweitern diese Ermittlungen auf die Population pädiatrischer Patienten. Davon zeugt das Ansteigen der zytotoxischen Aktivität der mit MGN-3/Biobran angereicherten NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumoren *in vitro* und auch gegenüber Neuroblastomen *in vivo*.

Weiter konnten wir beobachten, dass das Zufügen von MGN-3/Biobran das Maß der Expansion/Aktivierung der NK-Zellen erhöht und in Kombination mit IL-2 die Aktivierung der NK-Zellen für Zwecke der immunotherapeutischen Überwindung von Neuroblastomen erfolgreich beeinflusst. Garantiert sind schon weitere Studien in Kinderkliniken, deren Ziel die Klärung der Aufgabe von MGN-3/Biobran in Kombination mit chemoimmunologischen Protokollen sein wird.

Danksage

Wir möchten der Firma Daiwa Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio, Japan für die Bereitstellung des Mittels MGN-3/Biobran, Dr. J. Torres Canizales für die Hilfe bei den Analysen der Durchflusszytometrie, Dr. J. Diezo Sebastian für die statistische Übersicht und Dr. Aimie Talleur für die Korrektur des englischen Textes danken.

Diese Arbeit wurde mitfinanziert aus dem Grant der spanischen Nationalen Agentur medizinischer Leistungen Nr. FIS PI12/01622, weiter von der Stiftung der spanisches Gesellschaft für Kinderhämatoonkologie und der Stiftung CRIS für den Kampf mit Krebs (<http://www.criscancer.org/en/index.php>) zugunsten von Antonio Perez Martinez und der Deutschen José Carreras-Leukämie-Stiftung und der deutschen Stiftung gegen Kinderkrebs (DKS) zugunsten Matthias Pfeiffer.

Erklärung über den Interessenausschluss: Die Autoren haben keinen Geschäfts-, Eigentums- noch Finanzanteil an den Produkten der Firmen, die in diesem Artikel genannt werden.