

## **Arabinoxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran) stärkt die Zytotoxizität der NK Zellen gegen Krebszellen bei Kindern *in vitro* und *in vivo***

Antonio Perez-Martinez<sup>1</sup>, Jaime Valentin<sup>2</sup>, Lucia Fernandez<sup>3</sup>, Petra Zerbes<sup>4</sup>, Ellen Schworer<sup>4</sup>, Fernando Nunez<sup>5</sup>, Inmaculada Genesis Martin<sup>5</sup>, Hannah Maxwell<sup>6</sup>, Miguel Angel Diaz<sup>7</sup>, Rupert Handgretinger<sup>4</sup>, Matthias Pfeiffer<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Abteilung für pädiatrische Hämatonkologie des Universitätskrankenhauses La Paz, Madrid, Spanien.

<sup>2</sup>Gruppe für die Forschung der angeborenen Immunität, IdiPAZ, Madrid, Spanien.

<sup>3</sup>Klinisches Forschungsprogramm des Nationalen Zentrums für Krebsforschung, Madrid, Spanien.

<sup>4</sup>Kinderuniversitätskrankenhauses, Universität in Tübingen, Tübingen, Deutschland.

<sup>5</sup>Labor für Versuchstiere. Institut für Biomedizinische Forschung Albert Solsa. C.S.I.C./ Artru Duperier 4. Madrid, Spanien.

<sup>6</sup>Medizinische Fakultät der Universität in Cardiffe, Heath Park, Cardiff, CF14 4X, Wales.

<sup>7</sup>Abteilung Hämatonkologie und Stammzellentransplantation des Kinderuniversitätskrankenhauses Niño Jesús, Madrid, Spanien.

Autor Korrespondent: Antonio Perez-Martinez, Zentrum für Kinderhämatonkologie. Paseo de la Castellana 261, Madrid, 28046, Spanien. Telefon: +34917277223, Fax: +34917277042

E-Mail: [aperezmartinez@salud.madrid.org](mailto:aperezmartinez@salud.madrid.org)

Diese Arbeit wurde mitfinanziert aus dem Grant der spanischen Nationalen Agentur zur Harmonisierung der medizinischen Leistungen Nr. FIS PI12/01622, weiter von der Stiftung der spanischen Gesellschaft für Kinderhämatonkologie 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 zugunsten Matthias Pfeiffer.

## **ABSTRAKT**

Die Zytotoxizität der NK-Zellen (der sog. natürlichen Killerzellen) ist entscheidend für das Bewältigen von Virusinfektionen und Malignitäten. Arabinoxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran) wurde als potenter Verstärker der zytotoxischen Aktivität der natürlichen Killerzellen beschrieben. Diese Zellen, aktiviert und zahlenmäßig expandiert, sind immer häufiger genutzte Modalität der allgemein akzeptierten immunologischen Therapie bei der Krebsbehandlung. Die aktuelle Studie stellte sich das Ziel, die Wirkung des Stoffes MGN-3 Biobran auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber soliden Tumoren bei Kindern und auf den Prozess der Aktivierung und Mengen-Expansion der NK-Zellen zu untersuchen. Wir führten deshalb eine Studie *in vitro* und auch *in vivo* durch. Im Vergleich mit nicht stimulierten Zellen induzieren die, mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen eine höhere Expression der Aktivierungsmarker CD69 ( $p < 0.05$ ). Die Expression der Rezeptoren NKG2D, DNAM, NCR und TLR nach Stimulierung mit dem Mittel MGN-3/Biobran blieb unverändert. Die Stimulation mit MGN-3/Biobran erhöhte gleichzeitig die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Zellen der Linien K562, Jurkat, A673, A204, RD und RH30 *in vitro* und verzögerte das Wachstum von Neuroblastomen *in vivo*. Noch dazu verursachte die Zuführung von MGN-3/Biobran im Prozess der Expansion ein Ansteigen der Anzahl der NK-Zellen und ein Senken der Anzahl der T-Zellen. Die Angaben wiesen nach, dass MGN-3/Biobran die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber soliden Tumoren bei Kindern stimuliert und selektiv eine Mengen-Expansion der NK-Zellen-Anzahl verursacht. Diese Ergebnisse können für eine zukünftige, auf die Wirkung der NK-Zellen bauende Therapiestrategie nützlich sein.

**Schlüsselwörter:** Arabinoxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), zytotoxische Aktivität, solide Tumore bei Kindern.

## **Zusammenfassung**

Arabinoxylan aus Reiskleie (MGN-3/Biobran) erhöht die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumoren bei Kindern *in vitro* und auch *in vivo*. MGN-3/Biobran induziert gleichzeitig selektiv die zahlenmäßige Expansion der NK-Zellen. Diese Ergebnisse können für eine zukünftige, auf die Wirkung der NK-Zellen bauende Therapiestrategie nützlich sein.

## **EINLEITUNG**

Die zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) spielt bei der natürlichen immunologischen Abwehr bei malignen Erkrankungen eine grundsätzliche Rolle. Eine niedrige zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ist mit einem höheren Risiko der Tumorentwicklung bei gesunden Menschen verbunden [1]. Auch Krebs selbst senkt die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen; durch Freisetzen suppressiver Zytokine, resp. durch Induzieren einer niedrigen Expression der Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen [2-3]. Die hohe zytotoxische Aktivität der NK-Zellen, wie sie nach Transplantation der blutbildenden Stammzellen eintritt, verhindert noch dazu bei den Patienten einen Relaps [4]. Deshalb sollte sowohl bei onkologischen Patienten als auch bei der gesunden Population erstrangig die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen auf hohem Niveau gehalten werden.

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen erhöhen gesunder Lebensstil [5-7], Modifikatoren der biologischen Reaktion (Biologicals) [8-9], Hormone [10], Zytokine [11-14], Abwehrstoffe [15-16] oder chemotherapeutische Medikamente [17]. MGN-3/Biobran ist eine Arabinoxylanverbindung aus Reiskleie, modifiziert mit Enzymen des Shiitake-Pilzes, welche fähig sind, Kohlenhydrate zu hydrolysieren [18]. Modifiziertes MGN-3/Biobran ist eine Nahrungsergänzung, die nach Forschungen die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumoren bei Erwachsenen *in vitro* und auch *in vivo* erhöht [19-20]. Noch dazu hat es nach beschriebenen Eigenschaften zusammen mit konventioneller Behandlung synergischen tumorbekämpfenden Effekt auf einige Krebstypen, z.B. Brustkrebs oder Hapatokarzinom.

Diese Informationen öffneten Möglichkeiten für die Anwendung als Zusatzbehandlung zur konventionellen Therapie onkologischer Patienten. Bisher wurden aber keine Forschungsergebnisse pädiatrischer onkologischer Patienten publiziert.

Unser Ziel war es deshalb, die Aufgabe des Mittels MGN-3/Biobran als Stimulator der Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumoren bei Kindern *in vitro* und auch *in vivo* zu prüfen. Durch den Expansionsprozess, in dem aus mononuklearen Zellen des Peripherbluts eine große Menge NK-Zellen generiert werden, wurde das Interesse an einer Behandlung mit NK-Zellen immer größer. Aus diesem Grund beschlossen wir, auch die Aufgabe von MGN-3/Biobran im Prozess der Expansion der NK-Zellenanzahl zu überprüfen.

## **MATERIALIEN UND METHODEN**

Die Blutproben wurden auf Grundlage einer informierten Einwilligung von gesunden Freiwilligen gewonnen. Die Studie wurde von unserer örtlichen Ethischen Kommission genehmigt.

### **Vorbereitung der Zellen**

Die Blutproben wurden in EDTA-Reagenzgläser gefüllt, durch Dichtegradientenzentrifugation wurden aus ihnen anschließend die mononuklearen Peripherblutzellen (PBMC) isoliert: Die Proben wurden in übereinstimmendes Volumen Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gelegt und 400 g bei Raumtemperatur 20 min. geschleudert. Die gewonnenen PMBC wurden entnommen, zweimal in isotonischer physiologischer Lösung phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend 400 g 10 min. geschleudert. Die NK-Zellen wurden nachfolgend mit Technik magnetische Separation (mit Set cell isolation KIT oder CD56 microbeads von Miltenyi Biotech) isoliert.

## **Reagenzien und Zelllinien**

In der Studie wurden folgende nicht humane monoklonale Antikörper (mAb) benutzt: Fluorochrom gekennzeichnet mAb gegen CD3PE-Cy7, CD45-FITC, CD69-FITC und NKG2D-APC von der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA); Fluorochrom gekennzeichnet mAb gegen CD56-APC, DE25-PE und NKp44-PE von Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA); Fluorochrom gekennzeichnet mAb gegen CD337 (NKp30)-PE von Miltenyi Biotec; Fluorochrom gekennzeichnet mAb gegen TLR4 und TLR9 von Enzo Life Sciences AG, Lausen, Schweiz.

Als Ziel für das Testen der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen *in vitro* wurden diese Zelllinien benutzt: K562 aus Erythroleukämie, Jurkat aus T-Zellen lymphoblastischer Leukämie, A673 aus Ewing-Sarkom (alle von ATCC, Manassas, USA), A-204 aus embryonalem Rhabdomyosarkom, RD aus embryonalem Rhabdomyosarkom und RH30 aus alveoläres Rhabdomyosarkom (alle von DSZM, Braunschweig, Deutschland). Die Zelllinie aus Luciferase transduzierten Neuroblastomen (NB1691luc), die Dr. A. Davidoff (vom Kinderforschungskrankenhaus Sv. Júda) zur Verfügung stellte, wurde als Ziellinie im quantitativen Mausmodell *in vivo* benutzt [26-27]. Als „feeder“ (unterstützende) Zellen für die Aktivierung und die Expansion der Anzahl der NK-Zellen wurden diese Zelllinien benutzt: bestrahlte K562 und K562 transfektiert mit auf Membranzellen gebundenen und exprimierten IL-15 und 4-1BBL (K562-mb15-41BBL), zur Verfügung gestellt von Dr. D. Campan [28].

IL-15 erhalten von CellGro/CellGenix, Freiburg, Deutschland. MGN-3/Biobran stellte Diawa Pharmaceuticals Co. Ltd. Tokio, Japan, zur Verfügung. Lipopolysaccharid (LPS, Sigma 0127:B8) wurde als Ligand Toll like Rezeptor-4 (TLR4) und Polymyxin B (InvivoGen, San Diego, USA) als Inhibitor der LPS-induzierten TLR4 Aktivierung benutzt.

## **Fenotyp-Analyse**

Der Oberflächen-Phänotyp der über Nacht mit MGN-3/Biobran (100 µg/ml) stimulierten NK-Zellen, der über Nacht mit IL-15 (10 ng/ml) stimulierten NK-Zellen, der nicht stimulierten NK-Zellen und der expandierten NK-Zellen wurde an drei gesunden, erwachsenen Freiwilligen mit Hilfe sechs Immunofluoreszenzverfärbungen bestimmt. Frische NK-Zellen einer Menge von  $5 \times 10^5$  aus unterschiedlichen Bedingungen wurden mit den entsprechenden, nicht humanen monoklonalen Antikörpern, die im Dunkeln 30 Minuten bei einer Temperatur von 4° mit Fluorochrom konjugiert wurden, gefärbt. Die Zellen wurden zweimal in kalter PBS gewaschen und in 0,5 ml PBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometer FACSCanto II (Becton Dickinson) analysiert. Es wurden Prozentanteil und mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Die Kontrolle erfolgte durch Färben der NK-Zellen mit Kontrollantikörpern abweichenden Isotyps.

### **Analyse der Zytotoxizität und Stimulierung der NK-Zellen**

Die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen wurde, wie schon beschrieben, mit konventioneller 2-Stunden Europium-TDA-Prüfung (Perkin-Elmer Wallac, Turku, Finnland) verfolgt [29]. Die Zielzellen stammten aus den Zelllinien K562, Jurkat, A673, NB1691, A-204, RD, RH-30. Ganz kurz, die Zielzellen wurden mit Fluoreszenz verstärkendem Esterligand (BATDA) markiert. Dieser hydrophobe Ligand drang schnell in die Zellmembran ein. In der Zelle verursachte die Hydrolyse der Esterbindungen, dass der Ligand hydrophil wurde und unfähig, die Zellmembran zu durchdringen um aus ihr zu entweichen. Eine eventuelle Zytolyse verursachte aber sein Freisetzen in Supernatant, der mit Europium reagierte und eine stabile fluoreszierendes Chelat (eu-TDA) bildete, das anschließend fluorometrisch gemessen wurde (Zähler Infinite F200 von TECAN Group Ltd, Männedorf, Schweiz). Für das Berechnen der spontanen und spezifischen Zytotoxizität wurden folgende Formeln angewendet:

% der spezifisch freigesetzten Liganden =  $(\text{Anzahl der experimentell freigesetzten Liganden} - \text{Anzahl der$

spontan freigesetzten Liganden) / (maximale Anzahl der freigesetzten Liganden - Anzahl der spontan freigesetzten Liganden) x 100.

% der spontan freigesetzten Liganden = (Anzahl der spontan freigesetzten Liganden - Fond) / (maximale Anzahl der freigesetzten Liganden - Fond) x 100.

Die NK-Zellen gesunder Freiwilliger wurden über Nacht mit 100 µg/ml MGN-3/Biobran, resp. 10 ng/ml IL-15 (CellGro® / CellGenix) stimuliert. Die Kulturen wurden im Kultivierungsmedium (RPMI 1640 mit Zusatz durch Wärme inaktivierten Rinderfetalsersums im Volumen 10 %, 100 IU/ml Penicillin, 100 ng/ml Streptomycin und 2 mM/L-Glutamin) in angefeuchteter Atmosphäre 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft kultiviert. Die zytotoxische Aktivität wurde mit oben genannter Methode gemessen.

### **Mausmodell**

Zwölf Wochen alten Mäusen NOD-scid IL2R<sup>gnull</sup> wurden intravenös  $2 \times 10^5$  Zellen des Neuroblastoms NB-1691lue in den Körper gebracht. Die NK-Zellen, die wir nachfolgend für die Behandlung benutzten, isolierten wir aus mononuklearen Peripherblutzellen (PMBC) gesunder Freiwilliger mit der Technik magnetische Separation (mit Set NK cell isolation KIT oder CD56 microbeads von Miltenyi Biotech). Die erhaltenen NK-Zellen waren > 90 % CD3-CD56<sup>+</sup>. Die NK-Zellen wurden entweder direkt oder nach nächtlicher Aktivierung mit MGN-3/Biobran in Konzentration 100 µg/ml benutzt. Mit der intravenösen Behandlung mit NK-Zellen begannen wir nach 7 Tagen ab Administration der Tumorzellen und schritten zweimal wöchentlich über 4 Wochen fort. In zwei unabhängigen Experimenten (je 4 Individuen in jeder Gruppe) verglichen wir nicht behandelte Individuen (Kontrollgruppe) mit Individuen, denen  $1 \times 10^6$  nicht stimulierte NK-Zellen (Gruppe NK) verabreicht wurden, und mit Individuen, die  $1 \times 10^6$  über Nacht mit MGN-3/Biobran in Konzentration 100 µg/ml stimulierten NK-Zellen erhielten (Gruppe NK-Biobran). Die Kontrolle durch biolumineszente Abbildung führten wir am 7., 14., 28. und 42. Tag ab Behandlungsbeginn

mit NK-Zellen nach i.p. Einspritzen von 100 µl Luciferin, aufgelöst in PBS einer Konzentration 15 mg/ml durch.

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 die Kammer des Geräts Xenogen IVIS Lumina II (Quantitative fluoreszente und biolumineszente Abbildung, Xenogen Corporation, Hopkinton, MA) geschoben. Wir machten Aufnahmen mit verschiedenen Expositionszeiten und analysierten diese anschließend mit Hilfe der Software Xenogen Living Image® (Version 3.2). Für die grafische Darstellung der biolumineszenten Abbildung wurde für jede Maus ein Interessenbereich (ROI) rechteckiger Form gewählt, der Brustkorb und Bauch abdeckte und der Gesamtfluss (Photonen pro Sekunde) für die Lage auf dem Rücken und auch auf dem Bauch wurde bei 180-Sekunden-Exposition gezählt. Dieser Wert wurde in Beziehung zu vergleichbarem Wert des Fonds (von Kontrollmaus ohne Tumor, mit eingespritztem Luciferin) kalibriert. Alle Versuche erfolgten im Einklang mit den Anweisungen der zuständigen örtlichen Tierschutzausschüsse und der Anwendung von Labortieren im Sinne der Kriterien nach Anweisungen für die Betreuung und Anwendung von Labortieren vom Nationalen Gesundheitsinstitut.<sup>1</sup>

### **Aktivierung und Mengen-Expansion der NK-Zellen**

Die Mengen-Expansion wurde in 14-Tage-Kulturen mit/ohne Inhalt 100 µg/ml MGN-3/Biobran und Zytokinen (100 IU/ml IL-2 Preleukine® von Novartis Pharmaceuticals), resp. 100 IU/ml IL-2 plus 10 ng/ml IL15 von Cellgenix GmbH, Freiburg, Deutschland), resp. in gemeinsamer Kultur mit Inhalt sog.

<sup>1</sup>Nationales Gesundheitsinstitut - es handelt sich um eine föderale Agentur, die unter das Gesundheitsministerium der Vereinigten Staaten fällt. Jedes, Labortiere benutzende biomedizinisches Institut muss nach Anordnung dieser Agentur einen sog. Ausschuss für die Betreuung und Benutzung von Labortieren haben.  
(Bem.d.Übersetzers)

„feeder“ (unterstützter) Zellen K562 oder K562-mb15-41BBL erreicht [29]. Zusammengefasst, die mononuklearen Peripherblutzellen (PBMC) wurden von drei gesunden, erwachsenen Freiwilligen durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die PBMC wurden anschließend in Laborpalette mit 6 Plätzen und flachem Boden mit/ohne MGN-3/Biobran und humanen Zytokinen (IL2, IL2+IL15), resp. mit subletal bestrahlen, unterstützenden Zellen K562 oder K562-mb15-41BBL im Verhältnis 1:1,5 inkubiert. Kultivierungsmedium war RPMI 1640 (von Biochrom, Deutschland) ergänzt mit frisch eingefrorenem menschlichem Plasma Gruppe AB im Umfang 10 %, L-Glutamin, Pencillin-Streptomycin (Biochrom). Frisches Medium wurde alle 2 Tage hinzugefügt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen entnommen und auf Fenotypisierung und *in vitro* Aktivität der NK-Zellen analysiert.

### **Aktivierungsmechanismen: Agonistische Kontaminierung des Toll like Rezeptors (TLR) bei Applikation MGN-3/Biobran**

Der potentielle agonistische Effekt der MGN-3/Biobran Verbindungen in TLR2,-3-4-5-7-8 und 9 wurde im Labor Dr. Chevrier (InvivoGen) überprüft. Weil nur die Aktivität TLR4 beobachtet wurde, haben wir die Anwesenheit der Lipopolysaccharid- (LPS) Endotoxizität, Liganden mit TLR-4, bei Applikation des Mittels MGN-3/Biobran (100 mkg/ml) im mikrobiologischen Labor von Dr. Leis (BioChem GmbH, Tübingen, Deutschland) durch kinetische turbidimetrische Prüfung mit *Limulus polyphemus* bestimmt. Außerdem, LPS, Endotoxin, haben wir auch mit Hilfe chromogenetischer Prüfung quantifiziert (ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit, GenScript). Das Freisetzen IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$  und IL-12 in humanen Makrophagen wurde mittels zytometrischer Kugelanalyse (System von Becton Dickinson) nach Exposition Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/ml), als positive Kontrolle, und des Mittels MGN-3/Biobran (in Konzentrationen 10, 100, 1000 und 10000 mkg/ml) detektiert. Die Analysen der *in vitro* Zytotoxizität wurden auf Zelllinie K562 und NB1691 unter Benutzung LPS (10

ng/ml) als Stimulator der NK-Zellen und Polymyxin B (100 mkg/ml) als Inhibitor der indizierten Aktivierung TLR4 gerichtet. Dann haben wir die Zytotoxizität gegenüber Zelllinie NB1691 bei Stimulierung mit Mittel MGN-3/Biobran und gleichzeitigem Blockieren des Mechanismus TLR-4 auf der Oberfläche der MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen mit Polymyxin B analysiert.

### **Statische Analyse**

Wenn nicht anders aufgeführt, sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung der mittleren  $\pm$  Standardabweichung aufgeführt. Zum Vergleich der Wirkung des MGN-3/Biobran auf die NK-Zellen wurden nicht parametrische Tests angewendet. Im Mausmodell wurde das Überleben mit Kaplan Meier Methode errechnet. Die statistische Signifikanz wurde als  $p < 0.05$  definiert.

## **ERGEBNISSE**

### **NK Fenotypisierung**

In Tabelle 1 und auf Bild 1a ist die Reaktion der Aktivierungsrezeptoren an den NK-Zellen auf die nächtliche Stimulierung mit MGN-3/Biobran und IL-15 abgebildet. MGN-3/Biobran erhöhte die Expression CD69 bei MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen von mittleren 8 % auf 11 % (die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) stieg 1,6-fach) (Bild 1b). Der Prozentsatz der Expression und MFI der übrigen überprüften Rezeptoren blieb unverändert (Tabelle 1). Mit Interleukin 15 stimulierte NK-Zellen erhöhten die mittlere Expression CD25 markant (von 3 auf 5 % und 1,91-facher Anstieg MFI), CD69 (von 8 auf 77 % und 2,9-facher Anstieg MFI), NKG2D (von 77 auf 91 % und 1,9-facher Anstieg MFI), NKp44 (von 2 auf 12 %) und NKp30 (von 4 auf 32 %).

### ***In vitro* Analyse der Zytotoxizität**

Folge der nächtlichen Stimulation mit MGN-3/Biobran war ein markanter Anstieg der Zytotoxizität gegenüber allen getesteten Zelllinien bei einem Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen 8:1 (K562, Jurkat, A673), resp. 10:1 (A-204, RD, RH-30) gegenüber der Zytotoxizität nicht stimulierter NK-Zellen (Bild 2a, K562 80 % gegen 69 %,  $p = 0.03$ , Jurkat 40 % gegen 19 %,  $p = 0.03$ , A673 34 % gegen 13 %,  $p = 0.02$ , A204 34 % gegen 18 %,  $p = 0.03$ , RD 45 % gegen 22 %,  $p = 0.002$ , RH-30 34 % gegen 18 %,  $p = 0.02$ ). Die Stimulation mittels IL-15 führte in noch größerem Maße zur Lyse der folgenden Zelllinien: K562 (100 %), Jurkat (60 %) und A673 (58 %) (Bild 2b). 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. Das Zufügen von MGN-3/Biobran zur niedrigen Dosis IL-2 verstärkte den Stimulationseffekt 40 IU/ml Interleukin 2 in einem solchen Maße, dass die Zytotoxizität mit der vergleichbar war, die 1000 IU/ml IL-2 generierten (Bild 2c).

### ***In vivo* Modell**

Nachfolgend erweiterten wir unsere Forschung auf *in vivo* Xenograftmodell des mit Luciferase transfektierten Neuroblastoms, um zu ermitteln, ob die Stimulationswirkung von MGN-3/Biobran auf die NK-Zellen *in vitro* klinische Bedeutung haben kann. Bild 3a zeigt ventrale und dorsale Biobilder von drei repräsentativen Mausgruppen, die physiologische Lösung phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Kontrollgruppe),  $1 \times 10^6$  nicht stimulierte NK-Zellen, resp.  $1 \times 10^6$  MGN3 stimulierte NK-Zellen erhielten. In der Kontrollgruppe und in der Gruppe nicht stimulierter NK-Zellen wurde eine dramatische Progression der Tumorzellen NB1691 festgestellt, während in der Gruppe, die  $1 \times 10^6$  MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen erhielt, eine markante Inhibition des Neuroblastomwachstums verzeichnet wurde. Ebenso konnten wir beobachten, dass MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen das Überleben der Mäuse bedeutend erhöhen

konnten NOD/scid/IL2R $\gamma$ null-hu ( $p < 0.05$ ; Bild 3b).

### **Aufgabe des Mittels MGN-3/Biobran in der Mengen-Expansion der NK-Zellen**

Nach zwei Wochen Kultivierung stieg die Gesamtanzahl der Zellen, insbesondere der NK-Zellen markant in allen Kulturen, wo in die Kultivierungsmedien MGN-3/Biobran zugegeben wurde. Bei T-Zellen sank demgegenüber bei Anwesenheit von MGN-3/Biobran im Kultivierungsmedium die Expansion der T-Zellen (Bild 4A). Zusammengefasst, das Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kulturen IL2 und IL2+IL15 generierte eine bis zu 1,8 - bis 1,2-fache Expansion der Gesamtzellenanzahl in der Kultur ohne „feeder“ (unterstützenden) Zellen, eine 1,3- bis 1,2-fache Expansion der Gesamtzellenanzahl in Kulturen mit unterstützenden Zellen K562 und 1,4- bis 1,2-fache Expansion in Kultur mit unterstützenden Zellen K562mbII15-41bbl. Das Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kulturen IL2 und IL2+IL15 generierte eine bis zu 2,1 - bis 0,9-fache, 2,6- bis 1,3-fache, resp. 2,5- bis 1,4-fache Expansion der NK-Zellen in Kultur ohne unterstützende Zellen, in Kultur mit unterstützenden Zellen K562, resp. in Kultur unterstützenden Zellen K562mbII15-41bbl. Das Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kulturen IL2 und IL2+IL15 generierte eine bis zu 1,7 - bis 1,2-fache, 0,2- bis 0,6-fache, resp. 0,7- bis 0,7-fache Expansion der T-Zellen in Kultur ohne unterstützende Zellen, in Kultur mit unterstützenden Zellen K562, resp. in Kultur unterstützenden Zellen K562mbII15-41bbl. Das Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kulturen IL2 und IL2+IL15 generierte eine bis zu 6,1 - bis 2,4-fache, 0,4- bis 0,6-fache, resp. 0,7- bis 1-fache Expansion der NKT-Zellen in Kultur ohne unterstützende Zellen, in Kultur mit unterstützenden Zellen K562, resp. in Kultur unterstützenden Zellen K562mbII15-41bbl. Das Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kulturen IL2 und IL2+IL15 generierte eine bis zu 0,2 - bis 2,1-fache, 0,5- bis 0,8-fache, resp. 1,3- bis 0,8-fache Expansion der B-Zellen in Kultur ohne unterstützende Zellen, in Kultur mit unterstützenden Zellen K562, resp. in Kultur unterstützenden Zellen K562mbII15-41bbl.

Die zytotoxische Aktivität der mengenexpandierten NK-Zellen änderte sich nach Zufügen von MGN-3/Biobran unwesentlich (Bild 4B). Demgegenüber verstärkte Hinzufügen von IL-15 die Zytotoxizität im Vergleich mit nur IL-2 und dies sogar bei Benutzung transfektierter K562.

### **Stimulationsmechanismus der NK-Zellen mit MGN-3/Biobran**

Weil Toll like Rezeptoren (TLRs) fähig sind, humane NK-Zellen zu stimulieren, testeten wir die Kontaminierung der TLR Liganden unter Anwesenheit von MGN-3/Biobran. Bei allen getesteten TLR-Liganden beobachteten wir nur eine Kontaminierung mit Lipopolysaccharid (LPS) (5078 EU/ml bei 100 mkg/ml Mittel MGN-3/Biobran). Um die Aufgabe der Kontaminierung LPS als Stimulierungsfaktor zu prüfen, konzentrierten wir uns auf das reale Freisetzen von Zytokinen an humanen Makrophagen. Wir beobachteten, dass nur eine hohe Konzentration MGN-3/Biobran (10 g/ml) das Freisetzen der Zytokine IL-8, IL-6, TNF-a und IL-10 erhöhte (in Mengen 4776, 164, 132 und 4 mkg/ml). Diese Messwerte waren bedeutend niedriger als die, die bei der Stimulierung gleicher Zytokine (IL-8, IL-6, TNF-a und IL-10) mit Lipopolysaccharid (LPS) beobachtet wurden (10 ng/ml) (7487, 362, 208 und 37 mkg/ml). In vitro-Analysen der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber NB1691 zeigten, dass mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte NK-Zellen bei Verhältnissen von 8, 4, 2 und 1:1 die Zytotoxizität von NK-Zellen in Ruhe erhöhten (auf Werte 31, 20, 15, 12 % gegenüber der vorherigen 19, 14, 13, 9 %). Die Stimulierung mit LPS hoben wir aber mit Polymyxin B auf und die Zellen kehrten in den Ruhezustand zurück (23, 12, 7 und 6 %). Anschließend überprüften wir die Zytotoxizität von, mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen gegenüber NB1691. Wir beobachteten eine erhöhte Zytotoxizität der NK-Zellen (43, 27, 25 und 24 % beim Verhältnis 8, 4, 2 und 1:1), nicht antagonisiert mit Polymyxin B (45, 29, 23 und 27 % beim Verhältnis 8, 4, 2 und 1:1).

## **DISKUSSION**

Unsere vorläufigen Ergebnisse zeichnen *in vitro* und *in vivo* einen positiven Effekt des Mittels MGN-3/Biobran auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumoren bei Kindern ab. Wir beobachteten auch, dass Hinzufügen von MGN-3/Biobran in Kultivierungsmedium die Mengen-Expansion/Aktivierung der NK-Zellen erhöhte und die Mengen-Expansion der T-Zellen senkte. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ermittlungen bei Tumoren bei Erwachsenen [30-31]. Die klinische Studie mit Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wies nach, dass die Ergänzung der Interventionstherapie mit dem Mittel MGN-3/Biobran den antineoplastischen Effekt und das Überleben stärkt [21]. Unlängst wurden Angaben veröffentlicht, dass MGN-3 die angeborene Immunität bei Patienten mit multiple Myelom stimuliert; es wurden erhöhte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen, erhöhter Pegel myeloider dendritischer Zellen und erhöhte Zytokinkonzentration, ausgeschieden mit Hilfe Th1 Lymphozyten beobachtet [32]. Nach unseren Erfahrungen verbesserte die Stimulierung der NK-Zellen von gesunden Spendern mit MGN-3/Biobran *in vitro* und auch *in vivo* die zytotoxische Aktivität dieser Zellen gegenüber verschiedenen Zelllinien von Kindertumoren. Wir konnten *in vitro* das Vernichten der Zelllinien von Leukämie, Neuroblastom, Ewing-Sarkom, embryonalem Rhabdomyosarkom und alveolärem Rhabdomyosarkom nachweisen. Im Weiteren testeten wir die Tätigkeit von mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen am Modell eines Neuroblastoms bei Mäusen NOD/scid/IL2R $\gamma$ null, eines Modells, welches das Wachstum humaner Neuroblastome ohne jegliche Aktivität endogener NK-Zellen ermöglicht. Bei Mäusen, die mit NK-Zellen, die mit MGN-3/Biobran stimuliert waren, behandelt wurden, beobachteten wir eine markante Inhibition des Neuroblastomwachstums. Interessanter Effekt bei diesen mit NK-Zellen, die mit MGN-3/Biobran stimuliert wurden, behandelten Mäusen war ein markantes Ansteigen des Überlebens. Diese Angaben sind im Einklang mit publizierten Angaben über Malignitäten bei Erwachsenen [20-25].

Die Wirkungsmechanismen des Präparats MGN-3/Biobran, die sich in Erhöhung der Aktivität der NK-Zellen zeigt, bleiben unbekannt. Weil die Agonisten TLR fähig sind, humane NK-Zellen zu stimulieren, gingen wir von der Voraussetzung aus, dass eine Kontaminierung mit Lipopolysaccharid (LPS) bei Anwendung des Mittels MGN-3/Biobran durch Hervorrufen eines Signals auf TLR die Zytotoxizität der NK-Zellen erhöhen könnte. Auch wenn wir nur eine geringe Menge LPS beobachten konnten, kann konstatiert werden, dass durch deren Neutralisierung mit Polymyxin B nicht der stimulierende Effekt von Biobran auf die Aktivität der NK-Zellen aufgehoben wurde. Nach unseren Angaben, aktiviert MGN-3/Biobran wahrscheinlich die NK-Zellen in Ruhe, ist aber nicht fähig, Zellen zu aktivieren, die einer Mengenexpansion mit IL-15 unterzogen wurden und dies, obwohl es diese Expansion gleichzeitig nachweislich verstärkt. Dies deutet die Anwesenheit eines Mechanismus an, der teilweise mit IL-15 kollidiert. Andere vorgeschlagene Theorie ist die Existenz einer apoptotischen Wirkung, die durch Aktivierung der TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  freisetzenden NK-Zellen vermittelt wird. [30, 33]. Unlängst wurde auch der synergische Effekt zusammen mit Chemotherapie auf die Zellen eines Karzinoms der Brust durch Verstärken der Apoptose und Inhibieren der Zellproliferation beschrieben [34]. Es wurde auch eine Erhöhung der Aktivierungsmarker CD69 auf mit MGN-3/Biobran stimulierte NK-Zellen von gesunden Spendern beobachtet. Eine Erhöhung CD69 an den NK-Zellen korreliert dabei mit der Erhöhung ihrer Zytotoxizität [35-37]. Wir setzen voraus, dass sich am Generieren des positiven Beitrags, der bei Behandlung mit MGN-3/Biobran beobachtet wird, offensichtlich mehrere immunologische Mechanismen beteiligen. Es wurden nämlich auch Interaktionen des Präparats MGN-3/Biobran mit anderen immunen Zellen verzeichnet [38-39].

Ständig werden neue Behandlungsmethoden entwickelt, wie z.B. Adoptivtransfer *in vitro*-aktivierter NK-Zellen, die eine erhöhte krebsbekämpfende Aktivität aufweisen. Jüngste Studien wiesen nach, dass NK-Zellen *ex vivo* unter Anwendung verschiedener Methoden, z.B. mit Hilfe unterstützender feeder Zellen

K562-mb15-41BBL, in Riesenmengen vermehrt werden können [28]. So expandierte NK-Zellen wiesen *in vitro* gegen eine ganze Skala Zelllinien und Malignitäten, die Erwachsene und Kinder befallen, tumorbekämpfende Aktivität auf [40-42]. 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 wichtig sein, zum Beispiel für eine umfangreiche Expansion klinischer NK-Zellen mit hoher Zytotoxizität, insbesondere alogenen Ursprungs, wo die T-Zellen wegen Vorbeugung einer Erkrankung durch eventuelle Reaktion des Transplantats auf den Empfänger eliminiert werden sollten.

Wichtige Information ist, dass MGN-3/Biobran in Kombination mit einer niedrigen Dosis IL-2 die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen in gleichem Maße wie eine hohe Dosis IL-2 erhöhte. MGN-3/Biobran und eine niedrige Dosierung IL-2 funktionieren synergisch. Damit öffnet sich ein Weg zur Eliminierung der, mit hohen Dosen IL-2 zusammenhängenden Toxizität.

Angaben aus, an erwachsenen Patienten durchgeführten Studien unterstützen die Anwendung des Mittels MGN-3/Biobran als Alternative oder Hilfsbehandlung verschiedener immunotherapeutischer Methoden. Auch wenn unsere Angaben die Unterstützung weiterer Studien benötigen, deuten sie den Beitrag des Mittels MGN-3/Biobran für immunotherapeutische, auf Aktivität der NK-Zellen basierende Methoden bei pädiatrischen onkologischen Patienten an. Es sind weitere Studien erforderlich, vor allem in pädiatrischer klinischer Umgebung, welche die Aufgabe des Mittels MGN-3/Biobran bei seiner Kombination mit chemo-immunologischen Protokollen klären könnten.

**Danksage:**

Wir danken der Gesellschaft Daiwa Pharmaceutical Co. LTD, Tokio, Japan für das Gewähren des Mittels MGN-3/Biobran.

**Interessenkonflikt:**

Die Autoren verfügen über nichts, was veröffentlicht werden müsste.

Die Autoren erklären, dass diese Handschrift das Original ist, es davor nicht veröffentlicht wurde und gegenwärtig auch nicht woanders zur Publizierung beurteilt wird.

**Legende zu den Bildern/Tabellen:**

**Tabelle 1.** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Rezeptoren der NK-Zellen an nicht stimulierten NK-Zellen, resp. an mit MGN-3/Biobran stimulierten NK-Zellen einer gesunden Kontrollgruppe.

**Bild 1.** (A) Mittlere Fluoreszenzintensität der Aktivierungsrezeptoren der NK-Zellen: in Ruhe (weiß) und mit MGN-3/Biobran oder IL-15 stimulierte (schwarz) an 3 gesunden Individuen der Kontrollgruppe. (B) Expression CD69 an NK-Zellen in Ruhe und mit MGN-3/Biobran stimulierten.

**Bild 2.** (A) Mit MGN-3 stimulierte zytotoxische Aktivität der 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) Mit IL-15 und MGN-3 stimulierte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber den Zelllinien K562, NB1691, Jurkat, A673 (Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen 8:1). (C) Mit IL-2 und MGN-3 stimulierte zytotoxische Aktivität gegenüber A-204, RD und RH-30 (Effektorzellen zu Zielzellen 10:1). Die Angaben stammen von drei gesunden Freiwilligen und drei unabhängig durchgeführten Versuchen. \*zeigt die statistische Bedeutung.

**Bild 3.** (A) Die Tumorzellen NB1691 enthüllenden Luciferasen illustrieren Neuroblastomballast bei Mäusen, denen gegeben wurde: PBS (Kontrollgruppe),  $1 \times 10^6$  frisch isolierte nicht stimulierte NK-Zellen, resp. mit  $1 \times 10^6$  MGN-3 stimulierte NK-Zellen (acht intravenös zweimal wöchentlich über 4 Wochen eingespritzten Injektionen). Abgebildet sind drei, jede Gruppe vertretende Individuen in ventraler

und dorsaler Lage. (B) Das Tumolvolumen war in der Mausgruppe, die MGN-3 stimulierte NK-Zellen erhielt, im Verhältnis zu den Ausgangswerten gegenüber der Kontrollgruppe und auch der Gruppe die NK-Zellen in Ruhe erhielt, bedeutend kleiner. Die Kaplan Meier Kurve indiziert das Überleben der Individuen in jeder Gruppe. \*zeigt die statistische Bedeutung.

**Bild 4.** (A) Menge aller Zellen, der NK-Zellen, T-Zellen, NKT-Zellen und B-Zellen nach 14 Tagen Mengenexpansion in Kultivierungslösung von 3 gesunden Spendern, mit/ohne MGN-3/Biobran und Zytokine (IL-2 resp. IL-2 plus IL15), resp. gemeinsam mit bestrahlten unterstützenden Zellen mit Inhalt der Zellen K562 oder K562-mb15-41BBL. \*zeigt die statistische Bedeutung. (B) Zytotoxische Aktivität der mengenexpandierten NK-Zellen nach Zufügen von MGN-3/Biobran in das Kultivierungsmedium.