

Polysaccharide mit Antitumor-Aktivität aus Pilzen

Schon lange ist bekannt, daß bakterielle Infektionen durch Verstärkung der Immunantwort das Wachstum von Tumoren verlangsamen können. Es hat sich gezeigt, daß auch bestimmte Inhaltsstoffe aus Pilzen und höheren Pflanzen ähnlich wirken, das Immunsystem noch weit stärker als bakterielle Antigene aktivieren und dadurch ein neues Therapieprinzip ergeben können.

Während Medikamente aus Mistel und Sonnenhut bereits Eingang in die abendländische Medizin gefunden haben, sind Präparate aus höheren Pilzen bei uns noch weitgehend unbekannt. In der orientalischen Volksmedizin besitzen verschiedene Pilzarten dagegen eine lange Tradition in der Tumorbehandlung.

Neben einer beeindruckenden cancerostatischen Potenz wurden den Wirkstoffen aus Pilzen namentlich in der asiatischen Literatur und Patentliteratur gerade in neuester Zeit eine Vielzahl weiterer pharmakologischer Aktivitäten zugeschrieben: Sie zeigen angeblich antihypertensive, vasodilatatorische, antidiabetische, antithrombotische, blutplättcheninhibierende, thrombolytische, antihyperämische, antiarrhythmische, antiinflammatorische, analgetisch-antipyretische und antirheumatische Eigenschaften. Weiterhin sollen Extrakte aus gewissen Pilzen Komplikationen bei Staroperationen verringern, die Deformierbarkeit der Erythrocyten erhöhen, Proteinaemie und Proteinurie sowie andere Nierenstörungen günstig beeinflussen und die Bildung von Granulomen inhibieren. Pilzextrakte induzieren die Knochenneubildung nach Brüchen, zeigen *in vivo* antiparasitische, antibakterielle und antivirale Eigenschaften; sie verstärken angeblich nicht nur die Wirkung von 3'-Azido-3'-deoxythymidin auf die Replikation des Human Immunodeficiency Virus in verschiedenen menschlichen blutbildenden Zelllinien, sondern werden auch bereits für die klinische HIV-Therapie erprobt.

Bei derart herausragenden pharmakologischen Eigenschaften ist es verständlich, daß

die Wirkstoffe aus Pilzen sehr intensiv untersucht wurden: Vor allem Lentinan [1] aus dem japanischen Speisepilz Shiitake (*Lentinus edodes*) sowie Schizophyllan [2] aus dem ungenießbaren Spaltblättling (*Schizophyllum commune*) gelten als besonders aktiv und befinden sich in Japan seit Jahren im klinischen Einsatz. Unverständlich bleibt daher, warum diese Untersuchungen nicht auch in Europa zu entsprechenden Anwendungen geführt haben. Was weiß man also über Struktur und Wirkung der sogenannten Pilzglucane?

Isolierung

Seit dem ersten Nachweis von Wirkstoffen mit Antitumor-Aktivität in Pilzen (*Boletus edulis*) wurden Tausende von Basidiomyceten untersucht. Zwischen 14 % und 63 % der wäßrigen Extrakte aus Fruchtkörpern von mehr als 1000 getesteten Spezies zeigten tumorhemmende Eigenschaften, und sogar entsprechend gereinigte Extrakte aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) waren aktiv. Einige dieser Wirkstoffe waren niedermolekulare Verbindungen oder Proteine (z. B. Poricin). Obwohl nicht alle Resultate zugänglich sind, sind aber offenbar die meisten Extraktstoffe Glycoproteine oder Polysaccharide mit Molmassen zwischen 10^4 und 10^6 Dalton; Verbindungen mit ähnlichen Strukturen und Aktivitäten sind als Bestandteile der Zellwand vieler Pflanzen und Mikroorganismen und als Reservopolysaccharide bekannt.

Allein aus Glucose aufgebaute Polymere dieses Typs werden als Polyglucane oder einfacher als Glucane (mit anderen Zuckern allgemeiner als Glycane) bezeichnet. Die meisten sind in Wasser nur mäßig löslich, besser dagegen – allerdings unter Änderung der Sekundärstruktur – in verdünnter Natronlauge. Obwohl hoch gereinigte Polysaccharide wie Lentinan, Schizophyllan, Pachyman (aus *Porria cocos*) oder das Glycan aus *Aleurodiscus amorphus* stickstofffrei sind, enthalten die meisten der in der Literatur beschriebenen Extraktstoffe 4 bis 65 % Protein. Einige davon sind möglicherweise noch Mischungen

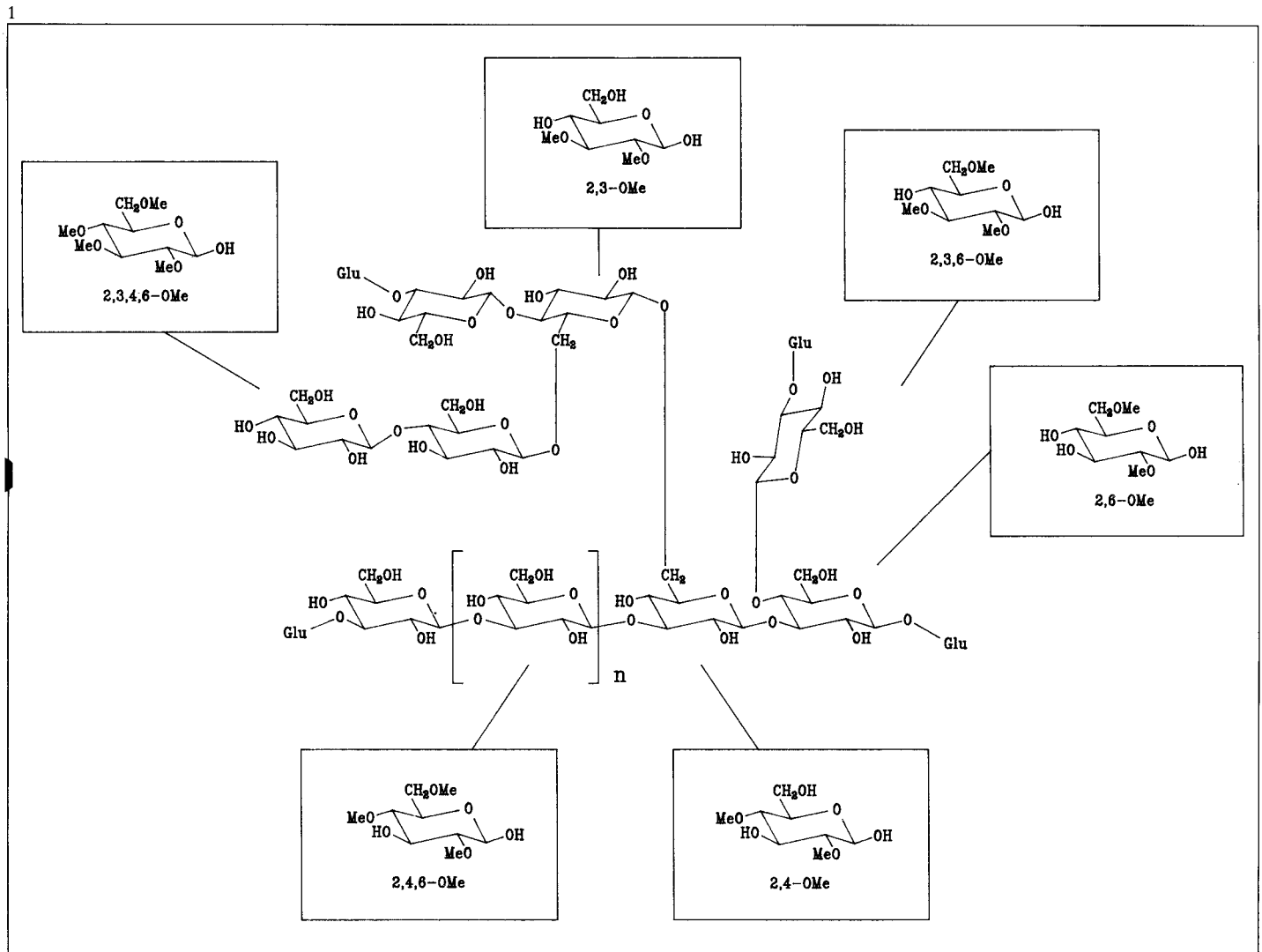
gewesen, aber zumindest für einen Fall (*Coriolus versicolor*) wurde eine kovalente Peptid-Zucker-Bindung durch verschiedene chromatographische und enzymatische Methoden nachgewiesen. Mit der Ausnahme von PSK („Polysaccharid Kureha“, Krestin aus *Coriolus versicolor*) sind diese Glycopeptide in der Immuntherapie bislang von untergeordneter Bedeutung und werden in dieser Zusammenfassung nur am Rande erwähnt.

Struktur

Das 1969 von Chihara entdeckte Lentinan wird aus den Heißwasserextrakten des Shiitake-Pilzes durch eine Folge fraktionierter Fällungen und chromatographischer Schritte gewonnen. Auf ähnliche Weise wurden antitumoraktive Polysaccharide in Ausbeuten von ca. 5 g/kg aus den Fruchtkörpern oder Flüssig-Kulturen vieler anderer Spezies isoliert.

Periodat-Oxidation, Smith-Abbau, Analyse der nach Permethylierung und Hydrolyse erhaltenen Glucose-methylether sowie Bioassay haben gezeigt, daß Lentinan ein Gerüst (1→3)- β -verknüpfter Glucoseeinheiten besitzt, das an jedem fünften Glucopyranosylrest durch (1→3)- β - und (1→6)- β -verknüpfte Glucosereste verzweigt ist (mittlere Molmasse $4 \cdot 10^5$ – $8 \cdot 10^5$). Eine ebenfalls aktive weitere Polysaccharid-Fraktion aus *Lentinus edodes* wurde als unverzweigtes lineares (1→3)- β -Glucan identifiziert, während inaktive Fraktionen (1→4)- β - und (1→6)- β -verknüpft sind.

Das von *Schizophyllum commune* extrazellulär produzierte Schizophyllan ist Poly[3→[O- β -D-glucopyranosyl-(1→3)-O- β -D-glucopyranosyl-(1→3)-O- β -D-glucopyranosyl]r] mit einer (1→6)- β -verknüpften D-Glucose-Seitenkette an jedem dritten Glucoserest in der Hauptkette (mittlere Molmasse 450 000); es bildet weiße bis blaßgelbe, geschmack- und geruchlose Plättchen und löst sich leicht in Dimethylsulfoxid und Wasser, schwer in Methanol oder Aceton.



Die Struktur von Pachyman aus *Poria cocos* ist der des Lentinans ähnlich, während das peptidgebundene Polysaccharid PSK ein (1→4)-β-Glucan mit (1→6)-β-Glucopyranosyl-Verzweigungen an jeder vierten Glucoseeinheit ist; das aus dem Kulturfiltrat dieses Pilzes erhaltene Coriolan soll dagegen eine an C-6 mit D-Glucopyranose verzweigte (1→3)-D-Glucopyranosyl-Kette besitzen.

Nach ¹³C-NMR-Messungen besitzen alle antitumoraktiven Polyglucane eine reguläre, meist helikale Struktur, während die inaktiven niedermolekularen Glucane vorzugsweise in einer statistisch ungeordneten Form vorliegen.

Nach Röntgenstrukturanalysen und theoretischen Modellen sind für Lentinan nur zwei spiegelbildliche Tripelhelix-Modelle plausibel, in denen jeweils drei Polysaccharidketten durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden; davon ist in Analogie zu der bekannten

Struktur der (1→3)-β-D-Xylane die rechtehändige Tripelhelix (Abbildung 3a, b) die wahrscheinlichere.

Schizophyllan besitzt eine ähnliche helikale Struktur mit einer Steigung von 0,9 nm. Auf der Basis von Drehwerten und der Messung von Wärmekapazität und Viskosität wurde abgeleitet, daß die Seitenketten einer Schraubenlinie folgen, wie Abbildung 3b andeutet.

Drei solcher Ketten umgeben die innere Helix als Zwischenschicht und tragen dadurch zur Versteifung der stabförmigen Tripelhelix bei.

Wie sich zeigt, tritt die Antitumor-Aktivität der Glucane erst bei Molmassen oberhalb von 50 000 auf und ist streng mit der Tertiärstruktur verbunden. In Wasser schmelzen die Helices, bilden beim Abkühlen jedoch erneut Aggregate. Die Fähigkeit der Selbstorganisation – und parallel dazu auch die Antitumor-Wirkung – geht jedoch oberhalb von ca. 150 °C

irreversibel verloren; auch das aus Pachyman durch Periodatoxidation und Smith-Abbau erhaltene einsträngige Pachymanan ist nahezu inaktiv. Versuche, die Antitumoraktivität der Glucane durch Partialhydrolyse oder chemische Derivatisierungen zu erhöhen, hatten ebenfalls nur sehr begrenzten Erfolg.

Die Wirkung der Polyglucane auf das Immunsystem ist vorwiegend durch ihre T-Zell-adjuvante Aktivität bedingt

Anders als bei Lipopolysacchariden ist die Adjuvans-Aktivität der Glucane auf die Immunantwort mehr auf die T-Zellen als auf die B-Zellen orientiert. Der Antitumoreffekt des Lentinans wird deshalb durch Hydrocortison inhibiert, das die Reifung der T-Zellen unterdrückt: Lentinan und einige andere antitumorwirksame Polysaccharide verstärken bei Mäusen T-Zell-abhängige Reaktionen, Polysaccharide ohne tumor-regredierende Akti-

Abb. 1. Analyse eines verzweigten Glucans durch Permethylierung nach Hakomori: Durch Hydrolyse erhält man ein Gemisch unterschiedlicher Glucose-methylether, das durch gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie identifiziert wird. Qualitative und quantitative Zusammensetzung erlauben Rückschlüsse auf die Primärstruktur des Glucans.

Abb. 2. Primärstruktur wichtiger (1→3)-β-D-Glucane [3]. Lentinan besitzt ein Gerüst (1→3)-β-verknüpfter Glucoseeinheiten, das an jedem fünften Glucopyranosylrest durch (1→3)-β- und (1→6)-β-verknüpfte Glucosereste verzweigt ist (n = 3, mittlere Molmasse $4 \cdot 10^5 - 8 \cdot 10^5$). Die Struktur von Pachyman (n = 50) aus *Poria cocos* ist der des Lentinans ähnlich. Schizophyllan ist ein Poly[3→[O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-O-β-D-glucopyranosyl]→1]] mit einer (1→6)-β-verknüpften D-Glucose-Seitenkette an jedem dritten Glucoserest in der Hauptkette (n = 1, mittlere Molmasse 450 000).

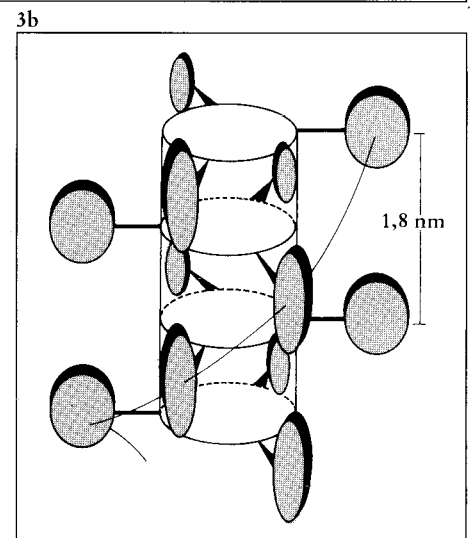
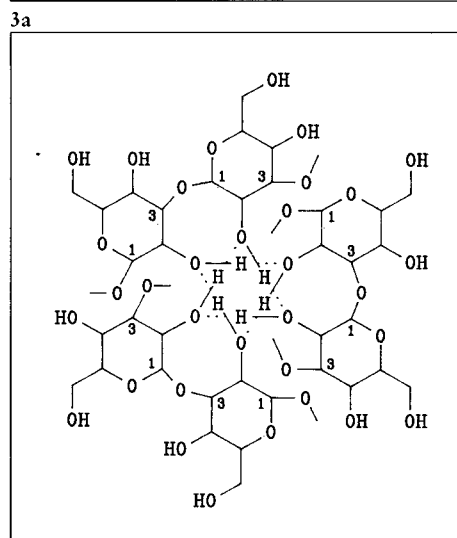
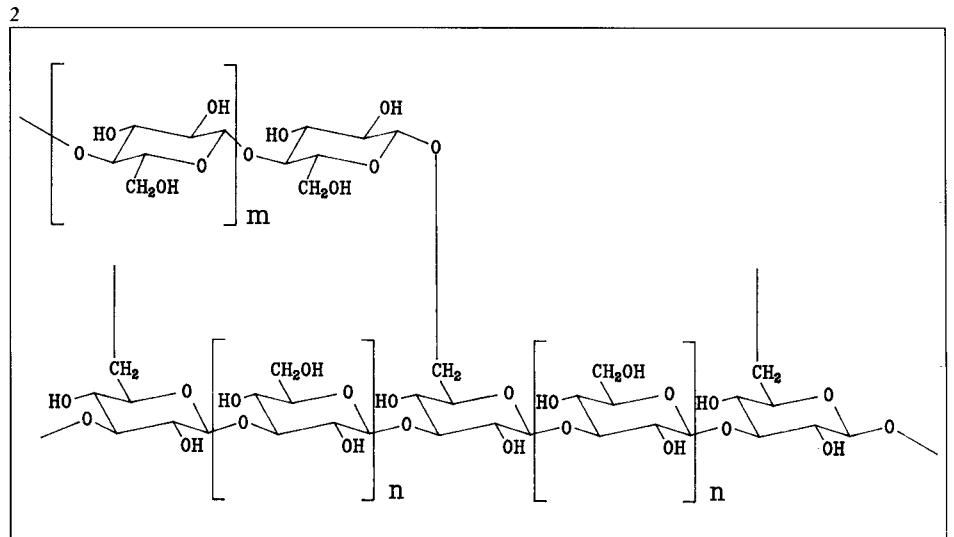
Abb. 3. a) Projektion jeweils der ersten beiden Zuckerreste der Lentinan-Tripelhelix (nach Bluhm [4]).

Abb. 3. b) Tripel-Helix von Schizophyllan. Der Helix-Kern wird durch den inneren Zylinder, die Seitenketten aus D-Glucosemolekülen werden durch schraffierte Scheiben dargestellt.

vität, mehrere Immunpotentioren wie BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*, ein Stamm von *Mycobacterium bovis*), Lipopolysaccharide, Dextransulfat oder Concanavalin A und chemische Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin oder Prostaglandin E_1 dagegen nicht.

Vor allem wird die in tumortragenden Wirten herabgesetzte Aktivität der T-Helferzellen wiederhergestellt, woraus (bei Mäusen) eine verstärkte Induktion alloreaktiver cytotoxischer T-Lymphocyten und eine verstärkte Freisetzung von Kolonie-stimulierendem Faktor (CSF) durch T-Zellen resultiert.

Im Alter von 5–8 Wochen haben Mäuse und Ratten eine hohe Aktivität Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), während bei Tieren, die älter als 12 Wochen sind, gewöhnlich keine Aktivität mehr gefunden wird. Wie mit



der ^{51}Cr -Methode gemessen wurde, bewirkten 100 μg Lentinan/Maus jedoch auch bei erwachsenen CBA/J und BALB/c-Mäusen eine signifikante Verstärkung der NK-Aktivität. Die ausgezeichnete Wirkung von Lentinan auf die NK-Aktivität bei Krebspatienten legt einen ähnlichen Mechanismus am Menschen nahe.

Die für die NK-Aktivierung erforderliche Lentinan-Dosis ist allerdings deutlich höher als die für die Antitumoraktivität oder andere immunologische Reaktionen erforderliche. Daher ist der Anteil der NK-Zellen an der Antitumoraktivität des Lentinans derzeit noch ungewiß.

Makrophagen und B-Zell-Aktivierungsfaktoren

Lentinan verstärkt nicht nur die antigenspezifische humorale und zelluläre Immunantwort, sondern ist auch in der Lage, anti-

genuspezifische Immunantworten gegen neoplastische Zellen auszulösen. Man hat beobachtet, daß Lentinan und seine antitumoraktiven Analoga cytotoxische peritoneale Makrophagen nach intraperitonealer oder intravenöser Injektion induzieren können, während die inaktiven Polyglucane allenfalls eine schwache Aktivierung bewirken. Wiederum werden peritoneale Exsudat-Zellen (PEC) durch Lentinan und andere Glucane aus Pilzen nur unter *in vivo*-Bedingungen cytotoxisch, während die meisten anderen Immunpotentioren dies auch *in vitro* bewirken. Dies ist allerdings von der durch Lentinan erhöhten Reaktivität der Makrophagen auf den Makrophagen-Aktivierungsfaktor (MAF, Interferon) zu trennen, die *in vivo* zu einer erhöhten Bildung cytotostischer und cytotoxischer Makrophagen führt. *In vitro* besaßen mit Lentinan behandelte Makrophagen zwar ebenfalls erhöhte Reaktivität gegen MAF, waren jedoch weder cytotoxisch noch cytotostisch.

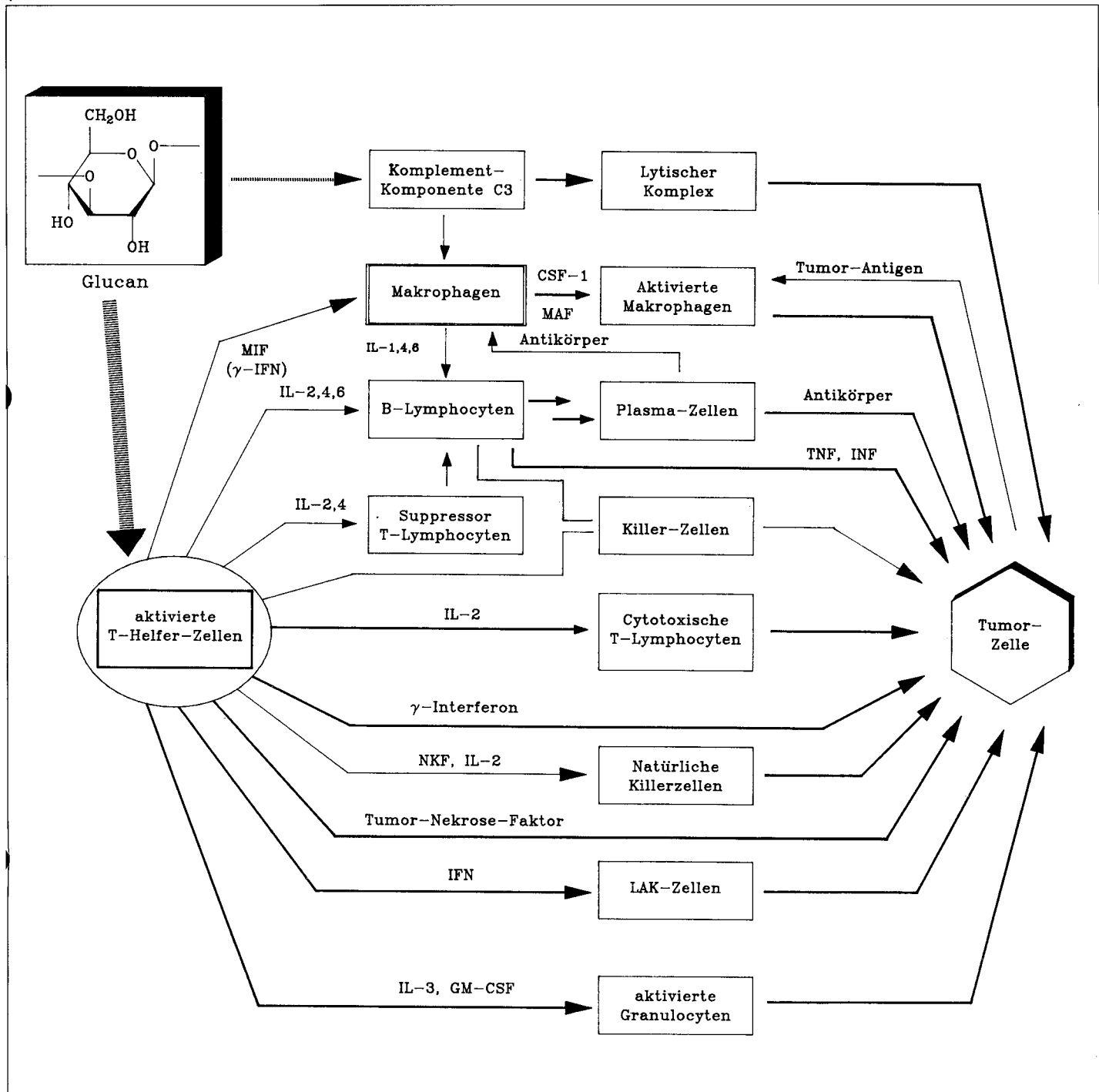


Abb. 4. Interaktion von Lentinan mit der zellulären und humoralen Immunabwehr. Undifferenzierte Knochenmark-Stammzellen reifen unter dem Einfluß verschiedener Zytokine zu Makrophagen und Vorläufer-Lymphocyten. Letztere werden zu B-Zellen und Plasmazellen (den Trägern der humoralen Immunantwort) oder nach einer Passage durch die Thymusdrüse zu T-Zellen. Diese differenzieren sich weiter zu T-Helferzellen, Suppressorzellen und ver-

schiedenen Effektorzellen. Lentinan stimuliert vornehmlich die T-Helferzellen, die ihrerseits über verschiedene Zytokine wie CSF (Kolonie-stimulierender Faktor), MIF (Migration inhibierender Faktor), NKF (Natürlicher Killer-Faktor), MAF (Makrophagen-Aktivierungsfaktor), TNF (Tumornekrose-Faktor) und verschiedene Interleukine eine Kaskade von Abwehrmechanismen in Gang setzen, die mit der Zerstörung der Tumorzelle endet. Weitere

Einzelheiten über Zusammenhänge im Immunsystem findet man in Lit. [5].

Die Eigenschaft von Polysacchariden, Makrophagen dagegen *in vivo* cytotoxisch werden zu lassen, ist möglicherweise mit ihrer Fähigkeit verbunden, den alternativen Weg des Komplementsystems zu aktivieren. β -Glucane binden sich anscheinend an den gleichen menschlichen Monocyten-Rezeptor, der die Phagozytose bei anderen Aktivator des alternativen Komplementsystems steuert. In Gegenwart von T-Zellen oder B-Zellen bewirkt dies *in vivo* oder *in vitro* eine Verstärkung der DNA-Synthese und Immunglobulin-Produktion bei peripheren einkernigen Zellen und hat durch Inhibierung der Suppressor-T-Zell-Aktivität dadurch einen Effekt auf die frühen Abwehrmechanismen des Immunsystems.

Wirkung auf Lymphokine, Interferon und Prostaglandine

Neoplasmen und Infektionen werden durch Interleukin 2, den natürlichen Killerzellen-Faktor, Makrophagen-Aktivierungsfaktor, T-Zell-Replacing-Faktor, Kolonie-stimulierenden Faktor (CSF) und Interferon kontrolliert, aber auch durch Potentioren der Interleukin 1-Bildung.

Anscheinend bewirkt die verstärkte Bildung von Lymphocyten-Aktivierungsfaktor (Interleukin 1) eine beschleunigte Reifung von Zellen, die auf Interleukin 2 und NK-Faktor ansprechen. Die reifen Zellen werden in cytotoxische T-Lymphocyten und NK-Zellen differenziert. Die durch Lentinan bewirkte Aktivität von Makrophagen auf den Makrophagen-Aktivierungsfaktor scheint ein Resultat der verstärkten Bildung von Effektor-Makrophagen zu sein, obwohl *in vitro* eine Abnahme der unspezifischen Cytotoxizität gegen Tumorzellen berichtet wurde.

In vivo-Anwendung von Lentinan oder Schizophyllan verstärkte die *in vitro* durch Interleukin 2 ausgelöste Induktion Lymphokin-aktivierter Killerzellen ebenso wie die ähnlich induzierte Aktivierung von Killerzellen gegen einen weiten Bereich solider Tumoren bei Mäusen. Als möglicher Mechanismus der Antitumor-Wirkung wurde eine Makrophagen-abhängige CTL-Reaktion vorgeschlagen und kürzlich auch am Menschen für Schizophyllan bewiesen [6]: Wie durch Immunreaktionen festgestellt wurde, war in Lymphknoten von Patienten mit Cervikalkrebs die Zahl der Zellen mit Interleukin-2-Rezeptoren nach einer Schizophyllanbehandlung stark erhöht; die Reaktion lief der Zahl der Glu-

can-Injektionen und der Schwere der Erkrankung parallel und war bei fortgeschrittenem Cervikalkrebs selbst in metastatischen Lymphknoten nachweisbar.

Lentinan stimuliert auch die Produktion von Interleukin 1 (Lymphocyten-Aktivierungsfaktor) in menschlichen Monocyten oder in Lentinan-induzierten Peritoneal-Makrophagen selbst in Konzentrationen von 0.1 $\mu\text{g/ml}$ *in vivo* und *in vitro*. Die Aktivierung von Killer-T-Zellen durch Interferon-Induktion wurde jedoch nur beschleunigt, wenn Responderzellen mit Stimulatorzellen und gleichzeitig mit Lentinan gemischt wurden. Die Aktivität Natürlicher Killerzellen peripherer einkerniger Zellen war 48 Stunden lang erhöht, und parallel dazu war der Interferon-Spiegel im peripheren Blutkreislauf bei Krebspatienten noch 12 Stunden nach der Lentinan-Gabe erhöht, obwohl stärkere Interferon-Induktoren wie Poly-I : C NK-Zellen nicht im selben Ausmaß beeinflussen; Patienten mit Lymphatischer Leukämie sprachen besonders gut auf Lentinan an. Die Antitumoraktivität ist jedoch wahrscheinlich nicht allein auf eine erhöhte NK-Aktivität zurückzuführen, da die für eine NK-Aktivierung erforderlichen Lentinan-Dosen deutlich höher sind als die für die Antitumorreaktion oder andere Immunreaktionen des Lentinans erforderlichen.

Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Immunpotentioren kann Lentinan zu einer Herabsetzung der Prostaglandin-Synthese führen. Da die Prostaglandine (PG) in der Zellmembran synthetisiert werden, hat es den Anschein, als würden die Polysaccharide *in vivo* eine langanhaltende Modulation der Phospholipid-Zusammensetzung der Membran bewirken und möglicherweise gleichzeitig zu einer verringerten Verfügbarkeit von Arachidonsäure und Dihomo- γ -linolensäure führen, Vorläufern der Prostaglandin-Biosynthese.

Die Wirkung auf Serum-Proteine

Erhöhte Spiegel des Serumproteins LB (eines Komplementfaktors B, der möglicherweise mit Hämopexin identisch ist) wurden als Parameter benutzt, um die Immunmodulation in drei Gruppen mit schneller (1 Tag), langsamer (4–10 Tage) oder fehlender Reaktion einteilen. Lentinan erzeugte Spitzenwerte nach 4 Tagen (Gruppe II), während Stimulatoren der Gruppe I wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Poly-I:C oder Amphoteri-

cin B einen sehr schnellen Anstieg (1 d) des Serum-LB bewirkten. Ähnliche Effekte einer Gruppe-II-Wirkung wurden bei Krebspatienten nach Behandlung mit Schizophyllan beobachtet.

Vor einiger Zeit wurde in Mäuserum kurz nach einer Lentinan-Gabe ein neuer Serumfaktor entdeckt, der die Produktion der Akutphasen-Transportproteine Haptoglobin, Hämopexin und Coeruloplasmin stimuliert. Dieser Induktor (APPIF, Akutphasen-Transportproteine induzierender Faktor) wird von Makrophagen gebildet und reguliert möglicherweise die Produktion der Akutphasen-Transportproteine in Hepatocyten. Das Auftreten von APPIF scheint neben einer verstärkten Bildung vasodilatatorischer und Hämorrhagie-induzierender Faktoren sowie Interleukin 1 eines der ersten Anzeichen für das Eintreten der Lentinan-Wirkung zu sein.

Dies ist mit Beobachtungen verwandt, daß die normale Lymphocytenreaktion auf Phytohämagglutinine durch Zugabe von Serum krebskranker Patienten zu Zellkulturen signifikant gehemmt wird, wobei ein vom Krankheitsverlauf abhängiger Einfluß beobachtet wird. Diese Befunde zeigen an, daß Serumfaktoren, die möglicherweise *in vivo* und *in vitro* mit der immunsuppressiven Aktivität korrelieren, bei Krebspatienten erhöht sind. Besonders ein α_2 -Macroglobulin (IAP, immunsuppressives acids Protein), das bei gesunden Kontrollpersonen fehlt, blockiert die Antigen-Erkennung durch menschliche Lymphocyten sehr effektiv.

Nach einer Tumorthherapie mit Lentinan zeigte andererseits ein Teil der Patienten eine Verminderung der immunsuppressiven Aktivität, begleitet von Symptomen klinischer Besserung. In den Seren dieser Patienten, nicht jedoch in denen ohne klinische Besserung, war ein β -Globulin erhöht, das die Reaktion normaler Lymphocyten auf Phytohämagglutinine verstärkte und eine bemerkenswerte Inhibition des Tumorwachstums bei Mäusen zeigte.

Andere Serum- oder Zellfaktoren

Der Spiegel des Kolonie-stimulierenden Faktors (CSF) wurde durch eine einzige i. p. Injektion von PSK erhöht (wenn auch erst bei hohen Dosen), wie an Knochenmarkszellen der Maus gezeigt wurde. Anscheinend ist die Erhöhung des CSF-Spiegels einer der Tumorabwehrmechanismen, die durch immunmo-

dulierende Antitumorwirkstoffe *in vivo* induziert werden.

In Ratten mit 7,12-Dimethylbenzanthracen-induzierten Mammatumoren wurde der Spiegel der Östrogenrezeptoren durch Lentinan-Behandlung geringfügig herabgesetzt, der Gehalt der Progesteron-Rezeptoren stieg dagegen erheblich an. Die Konzentration von Prolactin im Blut sank auf die Hälfte des Wertes in Kontrollgruppen, was die deutliche Suppression des Tumorwachstums unter Lentinan erklärt, da Prolactin als wichtigstes Hormon für das Wachstum von Dimethylbenzanthracen-induzierten Mammatumoren bei Ratten verantwortlich ist. Der einzige Parameter, der durch den inhibitorischen Effekt von Lentinan auf Methylcholanthren-induzierte transplantierbare Fibrosarcome beeinflusst wurde, war dagegen die Bildung des die Zellwanderung inhibierenden Faktors (MIF). Zellen aus regionalen Lymphknoten mit Lentinan behandelte Mäuse zeigten ein Maximum der Reaktion zu dieser Zeit, während von Zellen aus der unbehandelten Kontrollgruppe praktisch kein MIF gebildet wurde, im Gegensatz zu Lentinan-behandelten Mäusen, die die Tumoren in allen Fällen abstießen.

Ein weiterer Parameter ist anscheinend die Induktion des endogenen Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) durch Kombinationen von Lentinan und einem Trigger wie OK-432 (= Picibanil). Die TNF-Aktivität hielt bis zu 10 Stunden nach der Lentinangabe an. Ein synergistischer Effekt von teilgereinigtem TNF in Kombination mit Lentinan (und auch Chemotherapeutica) ist mehrfach bestätigt worden [7]: Dies zeigt, daß Lentinan das therapeutische Potential von TNF erweitert und bei der Vorbeugung gegen Metastasen von Nutzen sein kann. Cyclophosphamid verringerte dagegen die Aktivität des TNF.

Synergistische Effekte im Tiermodell

Eindrucksvoller als Resultate mit den reinen Pilzglucanen sind die synergistischen Antitumoreffekte von Schizophyllan und besonders Lentinan in Kombination mit anderen Immunmodulatoren oder Chemotherapeutica: Die Kombinationstherapie von Lentinan (als langsam wirkendem Immunmodulator) und Lipopolysacchariden oder der *Streptococcus pyrogenes*-Präparation PK-432 als schnellwirkendem Immunmodulator erwies sich gegen zahlreiche experimentelle Tumoren als

außerordentlich wirksam. Auch schwach immunogene Tumoren ließen sich erfolgreich bekämpfen, wenn zusätzlich OK-432 oder Cyclophosphamid zur Verstärkung der verzögerten Hypersensitivitäts-Reaktion bzw. zur Auslösung intratumoraler Entzündungsreaktionen verabreicht wurde. Im Gegensatz zu einer Behandlung allein mit Glucanen sprachen auch Lungenmetastasen auf eine Kombination von Schizophyllan oder Lentinan mit Cyclophosphamid an. Nachweisbar ist *in vitro* eine unter der Behandlung erhöhte cytotolytische Aktivität der Makrophagen im Lungengewebe.

In Kombination mit Amphotericin B (10 mg/kg KG/Tag) ergab Lentinan (10 Tage, je 1 mg/kg KG/Tag) eine Tumordinhibition (Ehrlich-Ascites) von 99 % und Totalremission in 7 von 8 Fällen. Ähnliche beeindruckende Ergebnisse wurden mit Lentinan in Kombination mit Cyclophosphamid, Mitomycin C, 5-Fluoruracil, Cytosin-arabinosid, 6-Mercaptopurin, Azaserin oder menschlichem Interleukin 2 beobachtet.

Interferon und Interferon-Induktoren spielen anscheinend eine bedeutende Rolle bei der Eingrenzung von Nebenwirkungen von Drogen mit spezifischer Toxizität auf den Zellzyklus, ohne jedoch deren Antitumoraktivität zu erniedrigen: So schützte Interferon-Induktion durch Lentinan bei 5-Fluoruracil auch vor einer tödlichen Überdosierung (140 mg/kg KG). Durch Cytofluorometrie von Knochenmarkszellen wurde nachgewiesen, daß unter der Behandlung der Übergang der Zellen in die S-Phase verzögert und eine Akkumulation in der G₀/G₁-Phase während der ersten 48 Stunden bewirkt wurde. Ganz entsprechend wurde auch eine Verbesserung des Blutbildes durch Lentinan nach Bestrahlung beobachtet.

Die Immunstimulation resultiert ebenfalls in einem synergistischen Effekt von Lentinan und der chirurgischen endocrinen Tumorthherapie. Lentinan beschleunigt die Degenerierung der Tumorzellen und induziert die Infiltration von Lymphocyten, Makrophagen und inflammatorischen Zellen in die carcinomatösen Herde, wirkt aber wahrscheinlich auch durch regulatorische Mechanismen über die hormonale Homöostase des Wirts. Die chirurgische endocrine Therapie allein (Ovariectomie, Adrenalectomie oder Adrenalectomie plus Ovariectomie) resultierte in einer nur teilweisen Hemmung des Tumorwachstums bei Ratten mit palpablen Mammatumoren.

Die mehrfache Injektion von Lentinan vor oder nach einer chirurgischen endocrinen Therapie erniedrigte das Risiko der Metastasenbildung und bewirkte eine weit stärkere Regression des Tumorwachstums als die Operation allein oder auch deren Kombination mit Tamoxifen.

Die durchschnittliche Überlebensdauer wurde unter einer Kombinationstherapie mit MFC (Mitomycin C, 5-Fluoruracil und Cytosin-arabinosid) durch Lentinan um etwa 30 % erhöht. Auch hier sprach die Immuntherapie am besten an, wenn der Tumor bereits eine gewisse Größe erreicht hatte.

Bei der Operation von Primärtumoren konnten Lungenmetastasen bei 70 % der Mäuse vermieden werden, wenn Cyclophosphamid vor der Operation, Lentinan jedoch danach gegeben wurde. Überhaupt erwies sich die richtige zeitliche Abfolge der einzelnen Medikamente als sehr wichtig.

Es ist erwähnenswert, daß Lentinan und andere Glucane folgerichtig auch die Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle Infektionen erhöhen, die bei der Chemotherapie von Tumoren häufige Begleiterscheinung sind.

Die klinische Anwendung von Lentinan

Wie die Resultate aus Tierexperimenten nahelegen, kann der Einsatz von Glucanen in der Krebsbehandlung möglicherweise ein weiterer Schritt in Richtung einer Immuntherapie des menschlichen Krebses, besonders in Kombination mit Chemotherapie und der chirurgischen Entfernung des Tumors sein; zahlreiche vielversprechende Ergebnisse wurden auch von Schizophyllan berichtet. Studien über eine immunologische Behandlung werden am Menschen jedoch nur in Japan intensiv betrieben, obwohl die Resultate mehrjähriger Phase III-Studien¹⁴⁾ mit fortgeschrittenem und rezidivierendem Magen- und Colo-rectal-Carcinom eine beträchtliche Verlängerung der Überlebensrate ergeben hatten.

Lentinan, Schizophyllan und PSK sind in Japan gebrauchsfertig kommerziell erhältlich [8]. Gestützt auf die Tierversuche wurden die klinischen Phase I und II-Versuche entweder mit 0,5–1,0 mg Lentinan/Patient alle 4 Tage oder mit 2 mg/Woche durchgeführt; dies ist die wirksamste Dosierung. In Kombination mit 5-Fluoruracil oder Tegafur wurde eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit

bei Patienten mit fortgeschrittenem oder rezidivierendem Magenkrebs, Hirntumor, Lungenkrebs und Uterus/Cervical-Krebs beobachtet.

Zur Verhütung von Mikrometastasen nach Tumoroperationen ist ein genauer Zeitplan wichtig: Die besten Resultate wurden in Kombination mit Chemotherapie beobachtet, wenn Lentinan i. m. 2–3 Wochen *nach* der Behandlung mit z. B. Cyclophosphamid gegeben wurde; vorher oder nachher wurden deutlich geringere Effekte beobachtet. Oral sind Lentinan und fast alle anderen Pilzglucane übrigens weit weniger wirksam.

Unter Kombination mit intraarterieller Injektion von 250 mg 5-Fluoruracil/Tag und überlagerter systematischer Therapie mit abwechselnd Lentinan und Picibanil wurden beeindruckende Resultate bei inoperablem Magenkrebs erzielt [9]: Hevorstechendes Merkmal waren eine Verbesserung der immunologischen Parameter und ein Anstieg der Zahl peripherer Leukocyten und Lymphocyten. Auch wenn ein Abfall nach der Chemotherapie eingetreten war, erreichten die Zahlen rasch wieder die Normwerte, wobei gleichzeitig die Konzentration von Tumorzellen in den Körperflüssigkeiten beträchtlich abnahm.

Klinische randomisiert kontrollierte Studien [10] haben die Effektivität und Sicherheit der Anwendung von Lentinan bei adrenalectomierten und ovariectomierten Patienten mit rezidivierendem Brustkrebs gezeigt. Unter der Behandlung mit Lentinan allein oder in Kombination mit Chemotherapie zeigten die Patienten längere krankheitsfreie Intervalle und längere Überlebenszeit und zu 50 % eine Überlebenszeit von 35 Monaten gegenüber nur 12 Monaten in der Kontrollgruppe. In einer Langzeitstudie wurde eine Überlebensrate von über 30 % bei stark hormonabhängigem Brustkrebs erreicht. Schwere Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. In Kombination mit chirurgischen Maßnahmen gilt Lentinan in Japan daher als nützliches und nebenwirkungsfreies Medikament zur Behandlung von Mammatumoren.

Multi-institutional randomisierte Kontrollstudien über die Wirkung von Schizophyllan in der Tumorbehandlung hat Furue³⁾ zusammengefaßt: Bei i. m. Injektion dieses Glucans in Dosen von 2 × 20 mg/Woche über 7–10 Wochen in Kombination mit konventioneller Chemotherapie erhöhte sich die 50 %-Über-

lebenszeit von Patienten mit operablem oder fortgeschrittenem Magenkrebs, Lungenkrebs und vor allem Ovarialkrebs gegenüber der Kontrollgruppe signifikant.

Toxizität

Die akute Toxizität von Lentinan und Schizophyllan ist sehr niedrig. Bei Mäusen und Ratten liegt die LD₅₀ bei 250–500 mg/kg (i. v.; nach anderen Berichten sogar > 4000 mg/kg). Die höheren Dosen bewirken Zyanose, Krämpfe und Tod. Bei der Obduktion findet man Vergrößerung der Milz, Nodulen in den Nieren, Erytheme der Ohren, hämorrhagische Veränderungen in Lunge und Abdomen, Vergrößerung der mesenterischen Lymphknoten und Ödeme in Diaphragma und Intestinum.

Histopathologisch waren Veränderungen im reticuloendothelialen System wie z. B. Proliferation der Reticularzellen sowie Mikronodulen von Epithelzellen in der Milz, der Leber und den Lymphknoten auf die Behandlung zurückzuführen; weiterhin Arteriitis in verschiedenen Organen, besonders in Epididymis, Intestinum und Mesenterium, schließlich auch hämorrhagische Veränderungen in Lunge, Intestinum und Harnblase und Folgeschäden wie chronische Nephropathie, Hypospermatogenese, spermatische Granulome in der Epididymis und granulomatöse Entzündungen an Ohren, Schwanz und Skrotum.

Die Langzeiteffekte einer Überdosierung von Lentinan sind am Rhesus-Affen mit Schaumzell-Reaktionen in Lunge, Leber, Nieren, Milz, Lymphknoten und Knochenmark verbunden, in wechselndem Ausmaß auch mit Vasculitis und damit einhergehenden Reaktionen. Am Beaglehund werden ähnliche Veränderungen und filamentöse Einschlüsse in Leber, Nieren und Milz beobachtet. Von beiden Tierarten wurden Dosierungen von 0,5 mg/kg/Tag ohne Folgen vertragen.

Mehrere Studien befassen sich mit der Wirkung von Lentinan auf die prä- und postnatale Entwicklung bei Ratten. Es fanden sich keinerlei Anzeichen dafür, daß die Behandlung der Eltern die Entwicklung oder die Reproduktion des Wurfes schädigte. Auch bei Kaninchen wurde in Dosierungen bis 1,0 mg/kg/Tag Lentinan i. v. keine Schädigung festgestellt.

Am Menschen wurden in klinischen Phase I/II-Studien mit Lentinan in 3 von 50, 17 von 185 und 58 von 1354 Fällen [11] leichte Leberfunktionsstörungen, Beklemmungsgefühle in der Brust oder Petechien an den Beinen beobachtet. In Kombination mit 5-Fluoruracil oder Tegafur wurden in 10 von 14 Fällen die folgenden Symptome beobachtet und auf Lentinan zurückgeführt: Übelkeit und Erbrechen (2 Fälle), Druck in der Brust (4), Hitzevallungen, Hautrötung und Schwitzen (2), Blutdruckanstieg und Kopfschmerzen (2). Alle Vorfälle waren vorübergehend und nicht ernst.

Nach Infusion von Lentinan-Lösung bei Patienten mit Magenkrebs wurde der maximale Blutspiegel (51–73 ng/ml) nach 2 Stunden erreicht; danach fiel der Spiegel allmählich ab, Lentinan war jedoch noch nach 1 Woche nachweisbar (5 ng/ml). Im Tierexperiment mit ³H-Methyl-Lentinan verschwand die Radioaktivität rasch aus Blut, Lunge und Nieren und reichte sich in Leber, Milz und mesenterischen Lymphknoten an. Ausscheidung über den Urin wurde beobachtet, die Abtmung von Tritium war jedoch gering. Über die Galle oder die Milch wurden nur Spuren ausgeschieden, auch ein Transport zum Fetus ist ohne Bedeutung. Selektive Inkorporation in Tumorgewebe wurde nicht beobachtet.

Da hochreine Polysaccharide keine Antigen-eigenschaften haben, sind sie bei Anwendung therapeutischer Dosierungen generell wenig bedenklich. Es ist jedoch zu beachten, daß Lentinan die Histamin- oder Serotonin-Empfindlichkeit erhöht. Adrenalectomierte Mäuse wurden nach 0,05 mg Lentinan/Maus/Tag über mehrere Tage und anschließende i. p. Injektion von 6 mg Histamin im Abstand von 3–4 Tagen getötet, nicht dagegen Mäuse in der Kontrollgruppe, die nur mit Lentinan oder Histamin behandelt wurden. Dies kann bei Anwendung von Lentinan in Kombination mit Serotonin von Bedeutung sein.

Schlußfolgerungen

Wegen Unlöslichkeit oder raschen enzymatischen Abbaus im Organismus durch gewisse Glucan-Hydrolasen sind (1→4)-β- (wie Cellulose), (1→4)-α- (Stärke, Cyclodextrine), oder (1→3)-α-Glucane gewöhnlich unwirksam. Ebenso ist die α-D-Fruktose-Kette in Inulin inaktiv, und Agarose ist nur schwach wirksam, was zeigt, daß Polymere aus Isomeren oder Epimeren der Glucose in der α/β-

Galactan-Konfiguration den alternativen Weg des Immunsystems nicht nennenswert stimulieren. Offenbar tritt Antitumor-Aktivität nur dann auf, wenn gewisse strukturelle Voraussetzungen erfüllt werden: Erforderlich sind offenbar (1→3)- β -Verknüpfungen mit (1→6)- β -Verzweigungen oder ein (1→6)- β -Gerüst mit (3→1)- β -Verzweigungen, was zu C-6-verzweigten (1→3)- β -D-glucopyranosyl-(1→3)- β -D-glucopyranosyl-Resten als der kleinsten gemeinsamen Einheit führt.

Ebenso wichtig für die Antitumor-Aktivität wie die Monosaccharid-Zusammensetzung und (1→3)- β -Verzweigung sind die molekulare Konformation und supramolekulare Strukturen. Laminaran und Pachyman haben zwar eine (1→3)- β -Verknüpfung, die Stränge sind jedoch monohelical und zeigen deshalb keine oder nur schwache Wirkung. Entsprechend zeigt das hochaktive (1→3)- β -glucosidische Lentinan fast keine Wirkung mehr gegen Sarcoma-Ascites-Tumoren bei Mäusen, wenn durch Zusatz von Harnstoff die Tertiärstruktur verändert wird.

Je länger die Kette ist, um so höher ist die Aktivität. Da die Verbindungen jedoch noch eine gewisse Löslichkeit aufweisen müssen, sind in Wasser unlösliche Glucane (z. B. Pachyman) wiederum inaktiv.

Unter den verschiedenen Antitumor-Glucanen ist über Lentinan am meisten bekannt. Obwohl nicht direkt cytotoxisch, stellt es nach zahlreichen Untersuchungen einen der wirksamsten Immunpotentioren überhaupt dar. Es unterscheidet sich von anderen Immunpotentioren wie BCG, *C. parvum*, Zymosan oder Endotoxinen dadurch, daß es 1. ein T-Zell-orientiertes Adjuvans bzw. ein T-Helferzellen-Stimulator ist (dessen Effekt der Produktion von T-Zell-Wachstumsfaktor verwandt ist). Es verstärkt 2. die Aktivität der natürlichen Killerzellen, die unspezifische Cytotoxizität der Makrophagen und 3. die humorale antikörperabhängige zellvermittelte Immunantwort (ohne Toxizität gegen den Wirt zu zeigen): Lentinan verstärkt dagegen nicht die Phagozytoseaktivität der Makrophagen und induziert keine Suppressorlymphocyten.

Wahrscheinlich ist die rasche Regression von Tumoren ein Phänomen, das bei allen Antitumor-Polysacchariden einem gemeinsamen Mechanismus gehorcht. Erster Schritt in einer Sequenz von Ereignissen könnte eine gesteigerte Effizienz der Vermehrung von

Vorläufern cytotoxischer T-Lymphocyten (CTL-P) sein, eine größere Empfindlichkeit der CTL-P-Zellen gegen Interleukin 2 oder eine indirekte Wirkung auf der Ebene von T-Helferzellen; am wahrscheinlichsten wirkt Lentinan jedoch durch die erhöhte Zahl der verfügbaren CTL-P-Zellen. Dies löst eine verstärkte Produktion verschiedener bioaktiver Serumfaktoren aus, die in eine komplexe Stimulation des T-Zell-abhängigen Pfades einmündet und mit der Zerstörung der Tumorzellen endet. Weitere Einzelheiten sind bei Chihara, Akiyama, Levy und Furth nachzulesen.

Lentinan und ähnliche Polysaccharide aus Pilzen sind besonders effektiv in der Kombination mit Chemotherapie oder Chirurgie bei Dosierungen von 1 mg Lentinan/Patient alle vier Tage (sehr viel höhere Dosen sind unwirksam oder sogar Tumor-fördernd). Die Effizienz dieses Konzepts wurde in mehreren Doppelblindstudien und nach 4 und mehr Jahren in Phase III-Folgestudien [12] bewiesen. Offensichtlich haben Schizophyllan, PSK und Lentinan bei niedriger Dosierung nur geringe oder keine Nebenwirkungen, erhöhen jedoch die Überlebenszeit selbst bei Patienten mit fortgeschrittenem Carcinom, teilweise mit bemerkenswert hohen Überlebensraten (über 30 %). Besonders die Verhütung von Mikrometastasen nach der chirurgischen Resektion von Tumoren ist eine Domäne von Lentinan und ähnlichen Glucanen.

Der mangelnden Selektivität der konventionellen Chemotherapie, ihren Nebenwirkungen und der unvermeidbaren Suppression des Immunsystems könnte eine Behandlung mit Pilzglucanen wirksam entgegensteuern. Obwohl die Glucane in Europa bisher überwiegend kritisch beurteilt werden, erscheint es dennoch lohnend, diesen Naturstoffen besonders in der Tumorthherapie zukünftig mehr Beachtung zu schenken.

Literatur

- [1] Y. Kaneko, G. Chihara, T. Taguchi, *Int. J. Immunother.* **5** (1989) 203–13. Activity of lentinan against cancer and AIDS.
- [2] H. Furue, *Med. Actual.* **23** (1987) 335–46. Biological characteristics and clinical effect of sizofilan (SPG).
- [3] H. Saito, T. Ohki, T. Sasaki, *Carbohydr. Res.*, **74** (1979) 227–40. A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of polysaccharide gels. Molecular architecture in the gels consisting of fungal, branched (1→3)- β -D-glucans (lentinan and schizophyllan) as manifested by conformational changes induced by sodium hydroxide.

- [4] T. L. Bluhm, A. Sarko, *Can. J. Chem.* **55** (1977) 293–9. The triple helical structure of lentinan, a linear β -(1→3)-D-glucan. T. L. Bluhm, A. Sarko, *ACS Symp. Ser.*, **48** (Cellul. Chem. Technol., Symp.) (1977) 105–14. Studies on the crystalline structure of β -D-(1→3)-glucan and its triacetate.
- [5] P. Marrak, J. Kappler, *Der T-Zell-Rezeptor, in Immunsystem – Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, Spektrum der Wissenschaft*, 2. Aufl., Heidelberg 1988.
- [6] Y. Shimizu, H. Teshima, J. T. Chen, I. Fujimoto, K. Hasumi, K. Masubuchi, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, **43** (1991) 581–8. Augmentative effect of sizofiran on the immune functions of regional lymph nodes in patients with cervical cancer.
- [7] T. Gatanaga, K. Takahashi, M. Yamazaki, D. Mizuno, S. Abe, *Jpn. J. Cancer Res. (GANN)* **76** (1985) 631–6. Studies in combination antitumor therapy. Part VI. Combination antitumor therapy with rabbit tumor necrosis factor and chemo- and immunotherapeutic agents against murine tumors.
- [8] Ajinomoto Co., 5–8, Kyobashi 1-Chome, Chuo-Ku, Tokyo 104, Japan.
- [9] T. Shimizu, T. Aoki, H. Miyakoshi in T. Aoki, I. Urushizaki, E. Tsubura (Hrsg.), *Manipulation of Host Defence Mechanisms, International Congress Series 576*, 199–206, Excerpta Medica, Elsevier, Amsterdam 1981. A combination of regional chemotherapy and systemic immunotherapy for the treatment of inoperable gastric cancer.
- [10] T. Taguchi, T. Aoki, H. Furue, H. Mazima, in T. Aoki, I. Urushizaki, E. Tsubura (Hrsg.), *Manipulation of Host Defence Mechanisms, International Congress Series 576*, 259–267, Excerpta Medica, Elsevier, Amsterdam 1981. Phase I and II studies of Lentinan.
- [11] J. Hamuro, G. Chihara, *Immunol. Ser.*, **25** (Immune Modulation Agents, Their Mech.) (1984) 409–36. Lentinan, a T-cell-oriented immunopotentiator. Its experimental and clinical applications and possible mechanism of immune modulation.
- [12] A. Yamashita, E. Masuda, Y. Hattori, A. Kosaka, *Int. J. Immunother.*, **5** (1989) 177–86. Cellular and humoral factors in the antitumor action of lentinan on mammary tumors.

Hartmut Laatsch, geb. 1946 in Eisenach, Studium der Chemie 1968–1971 (Stipendiat der Fritz-ter-Meer-Stiftung), Promotion 1973 bei H. Brockmann, Habilitation 1981, Professor Universität Göttingen 1984. Derzeitige Arbeitsgebiete: Niedermolekulare Wirkstoffe aus Meeresbakterien; Chemie der Chinone; Aminosäuren und Peptide in Basidiomyceten; Untersuchungen zur Photochromie.

Anschrift:

Prof. Dr. H. Laatsch, Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen, Tammannstraße 2, W-3400 Göttingen.