ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 19

Přihlášeno 24. 09. 75 (PO 66-75)

Právo přednosti od 14. 08. 69 (Folia microbiologica, **14**, 1969, 4: 377—387)

Zveřejněno čs. patent. spis č. 136 492

Uděleno 17. 12. 80

Vydáno 15. 12. 81

DT
615.779.93
615.779.925

Autor objevu: MUSÍLEK VLADIMÍR, RNDr. PhMr., CSc., PRAHA

Název objevu: **Mucidin — nové antifungální antibiotikum, produkované stopkovýtrusnou houbou Oudemansiella mucida (Schrad. ex Fr.) Höhn.**

Předmět objevu:

1. Jev spočívající v tom, že stopkovýtrusná houba Oudemansiella mucida (Schrad. ex Fr.) Höhn. produkuje přírodní látku nazvanou mucidin, chemickým složením methylester 6-fenyl-3-methyl-2-methoxymethylen-3,5--hexadienové kyseliny.
2. Vlastnost přírodní látky nazvané mucidin, spočívající v jejím antibiotickém účinku na houby, včetně patogenních kvasinek a vláknitých hub (plísní).

Předmětem objevu je zjištění, že stopkovýtrusná houba Oudemansiella mucida (Schrad. ex Fr.) Höhn. produkuje přírodní látku nazvanou mucidin, vykazující antibiotický účinek na houby, včetně patogenních kvasinek a vláknitých hub (plísní).

Dosud jsou z protihoubových antibiotik používány zejména dva preparáty, vyráběné fermentační cestou. Z toho jeden z nich — fungicidin (synonymum nystatin) — je produkován aktinomycetou Streptomyces noursei. (U. S. pat. 2 797 183) a druhý — griseofulvin — je produkován pomocí imperfektní houby Penicillium griseofulvum (brit. pat. 784 618). Oba preparáty se aplikují převážně perorálně, pro povrchové použití ve formě masti nebo zásypu se vyrábějí příslušné formy fungicidinu. V menší míře se klinicky používají ještě dvě další antifungální antibiotika, amphoterin B a pimaricin. První je produkováno kulturou kmene aktinomycety M 4575 (Antibiotics Annual 1955 — 1956, str. 579, Medical Encyclopedia, Inc., New York) a druhý je syntetizován aktinomycetou Streptomyces natalensis (Antibiotics Annual 1957—1958, str. 878, Medical Encyclopedia Inc., New York). Amphotericin B se aplikuje intravenózně, pimaricin většinou povrchově. Vzhledem k uvedenému nedostatečnému počtu klinicky použitelných antifungálních antibiotik a k jejich nikoliv zcela optimálním terapeutickým a farmakologickým vlastnostem, nemluvě o známém nebezpečí vzniku rezistentních patogenních mikroorganismů, je otázka získání nových klinicky aplikovatelných antibiotických preparátů neustále aktuální. Výsledky, které jsou předmětem tohoto objevu, představují příspěvek k řešení uvedené obtížné otázky.

Základní podstatou objevu je zjištění, že stopkovýtrusná houba — basidiomyceta — Oudemansiella mucida (Schrad. ex Fr.) Höhn. produkuje za určitých kultivačních podmínek přírodní látku nazvanou mucidin, vykazující prakticky významný antibiotický účinek na nejrůznější druhy kvasinek a vláknitých mikroskopických hub, včetně druhů patogenních pro člověka, zvířata a rostliny. Předpokladem objevu byla izolace čisté myceliální kultury z přírodní plodnice uvedené basidiomycety, zjištění základních podmínek jejího růstu v laboratoři, vypracování technologicky přístupného postupu kultivace mycelia na tekuté živné půdě, zjištění antifungální aktivity kultury, vypracování vhodného způsobu extrakce aktivní látky, vyvinutí metody jejího kvantitativního stanovení a stanovení spektra její antibiotické aktivity.

Získání čisté myceliální kultury Oudemansiella mucida

Čistá myceliální kultura uvedené houby byla získána explantátovou metodou. Po rozlomení přírodní kloboukaté plodnice byl z její vnitřní části pomocí sterilního skalpelu za aseptických podmínek vyříznut kousek tkáně, který byl přenesen na povrch šikmého sladinového agaru ve zkumavce. Během inkubace v termostatu při 20 °C v atmosféře s 80 — 90 % relativní vlhkosti se z explantátu rozrostla hyfová vlákna, jež během 12 dnů pokryla celý povrch agarové živné půdy. Kultura je tvořena substrátovým a vzdušným bílým, vatovitým, asporogenním myceliem, tvořícím pro basidiomycety typické přezky. Hyfy jsou většinou dvoujaderné (někdy spontánně vznikají jednojaderná hyfová vlákna), 2 až 5 μm silné. Čistota kultury byla kontrolována mikroskopicky i kultivačně a kromě toho byla prokázána možnost získat z myceliální kultury houby její původní kloboukatou formu, pomocí indukované fruktifikace za příslušných podmínek. S myceliální kulturou basidiomycety Oudemansiella mucida lze pracovat s použitím obvyklých mikrobiologických technik a postupů.

Submerzní kultivace

Při přípravě submerzní kultury basidiomycety Oudemansiella mucida se myceliem ze šikmé agarové kultury naočkovala sterilní tekutá živná půda vhodného složení (například 80 ml média obsahujícího 3 % glukózy, 1,5 % kukuřičného výtažku s 50 % sušiny, 0,15 kryst. $MgSO_4$ hodnota pH 5,5) v 500 ml varné baňce s plochým dnem, opatřené vatovou zátkou. Po inokulaci byla baňka inkubována na reciproké nebo rotační třepačce, v temnotě, při teplotě 20 — 23 °C a po dostatečném nárůstu mycelia (obvykle po 4 až 6 dnech) byl tímto vegetativním inokulem 1. generace očkován další pomnožovací stupeň, s použitím stejného média a stejných kultivačních baněk (4 ml inokula na 1 baňku). Po 4 — 5 dnech růstu na třepačce byly 4 objemovými procenty tohoto vegetativního inokula 2. generace očkovány buď kultivační třepačkové baňky, nebo laboratorní fermentory s produkčním živným médiem stejného složení, ale s 5 % glukózy. Při výzkumu biologické a biochemické aktivity submerzních kultur Oudemansiella mucida, připravených uvedeným postupem (též při použití jiných typů živných půd) bylo zjištěno, že produkují antibiotickou látku s výrazným antifungálním spektrem (tabulka 1).

TABULKA 1

Inhibiční účinky submerzní kultury O. mucida na růst bakterií, kvasinek a vláknitých hub

Inhibiční zóny v mm při plotnovém testu proti										
BS	BM	EC	PV	CA	CP	SC	PR	FO	AN	BC
0	0	0	0	20	19	28	15	18	19	20

P o z n á m k y : Použita 6denní subemrzní kultura O. mucida. Mikrobiologická plotnová difúzní metoda stanovení antibiotické aktivity.

BS = Bac. subtilis, BM = Bac. mycoides, EC = E. coli, PV = Proreus vulgaris, CA = = Candida albicans, CP = Candida psedotropicalis, SC = Saccharomyces cerevisiae, PR = Penicillium restrictum, AN = Aspergillus niger, BC = Botrytis cinerea, FO = Fusarium oxysporum.

Kvantitativní stanovení antibiotické aktivity O. mucida

Ke kvantitativnímu stanovení antibotické aktivity vzorků submerzní kultury O. mucida byla vyvinuta mikrobiologická plotnová difúzní metoda, používající druh kvasinky (např. Candida albicans, Candida pseudotropicalis apod.) jako testovací mikroorganismus. Agarové živné médium (1 % glukózy, 0,5 % peptonu, 10 obj. % sladiny 12° ball., doplněno na žádoucí objem destilovanou vodou, hodnota pH upravena na 6,5, 2,5 % agaru) bylo po rozpaření, příslušném ochlazení a naočkování testovací kvasinkou rozlito na vhodnou skleněnou misku nebo plotnu s odnímatelným rámem. Po ztuhnutí byly v agarové plotně korkovrtem vyříznuty komínky o průměru 6 mm, do nichž bylo pipetováno po 0,1 ml vhodně ředěných fermentačních vzorků a do vyhrazených komínků byly podobně pipetovány roztoky standardního antibiotického preparátu. Zpočátku byl jako pracovní standard používán fungicidin, později — po izolaci krystalického preparátu mucidinu — byly používány roztoky mucidinu, v koncentraci 50,00, 25,00, 12,50, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 a 0,39 μg na 1 ml 60 % etanolu. Po inkubaci titrační plotny při 32 °C po dobu 18 hodin byly odečítány průměry inhibičních zón bez nárůstu testovacího mikroorganismu, vyvolaných antibiotickým účinkem mucidinu v testovaných fermentačních vzorcích a standardních roztocích. Koncentrace mucidinu ve fermentačních vzorcích pak byla zjišťována grafickým porovnáním průměru inhibičních vzorových zón standardu s průměry inhibičních zón fermentačních vzorků.

Pomocí této metody bylo zjištěno, že submerzní kultury O. mucida produkují (v závislosti na podmínkách kultivace a produkční schopnosti použitého kmene houby (300 až 1200 μg mucidinu na 1 ml fermentačního vzorku.

Graf na přiloženém obrázku 1 ukazuje typický průběh standardní křivky mucidinu, zkonstruované na základě inhibičních zón příslušejících jednotlivým výše uvedeným koncentracím antibiotika při stanovení jeho antifungální aktivity popsanou metodou, s použitím kvasinkny Candida pseudotropicalis jako testovacího mikroorganismu.

Tabulka 2 dokumentuje typický průběh submerzního růstu a produkce mucidinu při kultivaci O. mucida v laboratorním fermentoru a je z ní rovněž zřejmé, že antibiotikum je převážně přítomno v myceliu produkční houby.

TABULKA 2

Růst mycelia O. mucida a produkce mucidinu v průběhu submerzní kultivace v laboratorním fermentoru a rozdělení antibiotika mezi mycelium a fermentační tekutinu

Dny	Sušina mycelia mg/100 ml	Obsah antibiotika ve fermentačním vzorku μg/ml	filtrátu ferm. vzorku μg/ml	suchém myceliu mg/g	pH
3	554	stopy	—	stopy	5,1
5	805	32	—	3,98	4,9
7	1183	160	0,4	13,52	5,5
8	1492	281	0,6	18,77	6,4
9	1670	446	9,0	26,76	6,7
10	1560	515	10,4	33,01	6,8
11	1493	480	14,0	33,62	7,1

Poznámky: Produkční živné médium s 5 procenty glukózy, 1,5 % kukuřičného výtažku s 50 % sušiny, 0,15 % kryst. $MgSO_4$, pH 5,5.

Laboratorní fermentor celkového obsahu 20 l, plnění 10 l živného média, vzdušnění 8 l vzduchu/10 l média za minutu, otáčky míchadla 350 ot/min, teplota 293 °C.

Spektrum antifungální aktivity mucidinu

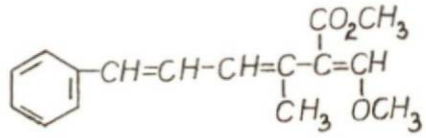
Po zjištění antifungální aktivity mucidinu (tab. 1) byla obdobnou metodou mikrobiologické difúzní titrace prověřována její šíře. Výsledky těchto testů prokázaly výraznou antibiotickou aktivitu mucidinu proti všem testovaným houbám, mezi nimiž byly následující druhy: Candida albicans, Candida tropicalis, Candida pseudotropicalis, Candida parapsilopsis, Candida zeilano, Candida guillermondi, Candida cruzei, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton astero, Trichophyton rosaceum, Microsporum canis, Sporotrichum schenckii, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitis; kromě uvedených druhů hub, vyvolávajících mykotická onemocnění člověka a zvířat, inhiboval mucidin také růst následujících původců houbových chorob rostlin: Ascochyta chrysanthemi, Botrytis cinerea, Botrytis fabae, Ceratocystis piceae, Ceratocystis ulmi, Cladosporium cladosporioides, Drechlera cynodontis, Embellisia allii, Fusarium avenaceum, Fusarium nivale, Fusarium oxysporum, Penicillium notatum, Pleiochaeta setosa, Rhizoctonia solani, Verticillium albo-atrum. Kromě těchto druhů, vyvolávajících nemoci člověka, zvířat nebo rostlin, inhiboval mucidin růst všech testovaných druhů saprofytických hub, kvasinkových i vláknitých. Tyto výsledky dokazují mimořádně široké antifungální spektrum mucidinu. Srovnávací experiment, při němž byla sledována (pomocí mikrobiologické plotnové difúzní metody) antibiotická aktivita mucidinu, pimaricinu a fungicidinu proti různým druhům převážně fytopatogenních hub, prokázal, že v případě 14 ze zkoušených 19 druhů hub byl mucidin několikanásobně účinnější než pimaricin nebo fungicidin. V těchto případech vyvolal mucidin v koncentraci 10 μg/ml minimálně stejnou nebo větší inhibiční zónu než desetinásobné koncentrace obou dalších uvedených antibiotik.

Rozpustnost a extrahovatelnost mucidinu

S použitím papírové chromatografie a experimentální extrakce mucidinu z mycelia a tekuté frakce fermentačního vzorku bylo zjištěno — v souhlase s výsledky zahrnutými v tabulce 2 —, že antibiotikum je převážně obsaženo v myceliu produkční houby, odkud jej lze extrahovat nejrůznějšími organickými rozpouštědly, počínaje metanolem a konče etyléterem a petroléterem. Ve vodě je mucidin nerozpustný. Odpařením rozpouštědel z extraktů produkčního mycelia se získá olejovitý koncentrát s aktivitou kolem 15 000 až 30 000 μg mucidinu na 1 ml (v závislosti na výši obsahu mucidinu v myceliu), jehož roztoky v etyléteru vykazují specifické absorbce v UV oblasti při 205, 211, 223, 229, 237, 284, 292, 299 a 312 mμ, mající vztah k přítomnosti aktivní látky. Uvedená charakteristika rozpustnosti mucidinu a jeho absorbčních maxim v UV oblasti byla později ověřena s použitím krystalického preparátu antibiotika.

Chemické složení a struktura mucidinu

Sumární vzorec mucidinu, poprvé zveřejněný Vondráčkem a sp. (čs. pat. 136 495, 1970), je $C_{16}H_{18}O_3$. Podle výsledků Vondráčka a kol. (1969 — ústní sdělení), později potvrzených kolektivem Sedmera, Vondráček, Nerud, Musílek je mucidin methylesterem kyseliny 6-fenyl-3-methyl-2-methoxymethylen--3,5-hexadienové, což odpovídá struktuře



Farmakologické a klinické charakteristiky mucidinu

Koordinačním pracovištěm farmakologického a klinického výzkumu byl Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací v Roztokách u Prahy. Výsledky farmakologického výzkumu prokázaly, že mucidin nevyvolává imunitní reakci, není alargenní, není karcinogenní, jeho dráždivý efekt na kůži a oči pokusných zvířat (králíci) nepřesahuje fyziologické limity, po externím podání, intramuskulární aplikaci ani po aplikaci kardiální punkcí není distribuován do krevního oběhu, hodnoty LD_{50} jsou: po intraperitoneální aplikaci 122,5 mg/kg, po perorální aplikaci 825 mg/kg a po subkutánní aplikaci 787 mg/kg (vše u myší). Pomocí radioaktivně značeného mucidinu byla prokázána jeho dlouhodobá depozice v pokožce, v místě jeho předchozí povrchové aplikace. Po jeho externí aplikaci nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky. Lze shrnout, že výsledky farmakologických studií předurčily mucidin pro externí lokální aplikaci proti dermatomykózám.

S ohledem na uvedené pozitivní výsledky farmakologických testů byly po jejich ukončení a po schválení příslušnými orgány ministerstva zdravotnictví ČSR zahájeny klinické zkoušky s externí aplikací vyvinutých lékových forem mucidinu (mast a spray) proti různým mykotickým onemocněním kůže, postihujícím podle oficiálních statistik jednu třetinu populace ČSSR. Zkoušky proběhly na

čtyřech klinických pracovištích a byly zaměřeny především na následující skupiny mykotických onemocnění pokožky:

candidosis (Candida albicans apod.), epidermofytie (Epidemophyton floccosum a podobně, trichofytie (Trichophyton verucosum, T. rubrum, T. mentagrophytes apod.), keratomykózy (Pityrosporum orbiculare, Malassezia furfur, Microsporum minutissimum apod.). Informativní přehled o terapeutickém účinku lékových forem mucidinu při jejich povrchové aplikaci na uvedené čtyři skupiny dermatomykóz člověka podává tabulka 3.

TABULKA 3

Terapeutický účinek mucidinu při léčení hlavních typů dermatomykóz

Typ dermatomykózy	Procento zcela vyléčených případů
Candidosis	70
Epidermophytia	77
Trichophytia	96
Keratomycosis	96

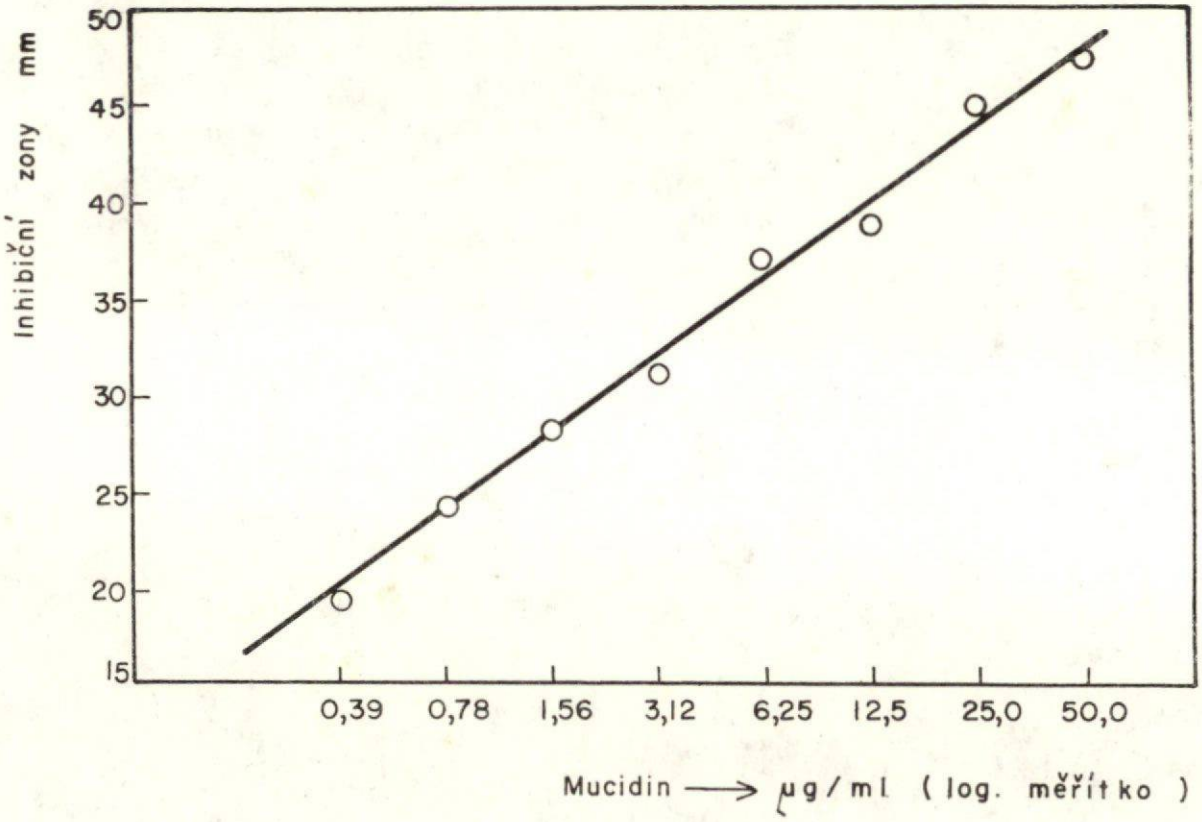
Technologické a klinické využití objevu mucidinu

Od samého počátku objevu vlastnosti myceliální kultury basidiomycety Oudemansiella mucida produkovat účinné antifungální antibiotikum byla věnována příslušná pozornost otázkám technoloigckého rozpracování a praktického využití. Svědčí o tom základní čs. patent 136 492 (autor V. Musílek) o názvu Způsob přípravy kultury pro výrobu nového protihoubového antibiotika, pokrývající fermentační část výrobního postupu a představující první prioritní údaj o antifungálním antibiotiku basidiomycety Oudemansiella mucida. Pak následoval závislý čs. patent 136 495 (M. Vondráčka a kol.), pokrývající způsob izolace mucidinu, čs. autorské osvědčení č. 173 349 (J. Čapkové a kol.), zahrnující zlepšení izolačního postupu a přihláška vynálezu PV 758-80 (L. Homolky a kol.), pokrývající dílčí úpravu postupu fermentační přípravy mucidinu.

První odborná práce o mucidinu byla publikována v roce 1969 ve Folia Microbiologica (V. Musílek a kol., Fol. Microbiol. 14: 377—387, 1969).

Po pozitivním výsledku klinických zkoušek vydala Komise pro léčiva MZD ČSR a MZD SSR 13. 9. 1972 povolení k výrobě a klinickému používání mucidinu (obchodní název Mucidermin SPOFA) v lékové formě spraye a masti.

Severografia, n. p., závod 7, Most


Inhibiční zony mm
50
45
40
35
30
25
20
15
0,39
0,78
1,56
3,12
6,25
12,5
25,0
50,0
Mucidin ⟶ µg/ml (log. měřítko)