



УДК 547.615.33:541.64

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМПИЦИЛЛИНА, СВЯЗАННЫХ С ПОЛИМЕРАМИ

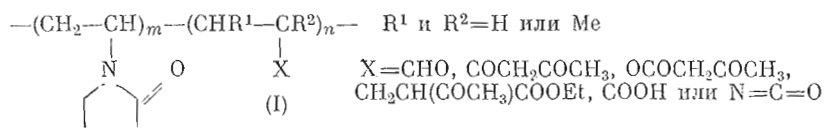
Панарин Е. Ф., Конейкин В. В., Афиногенов Г. Е.

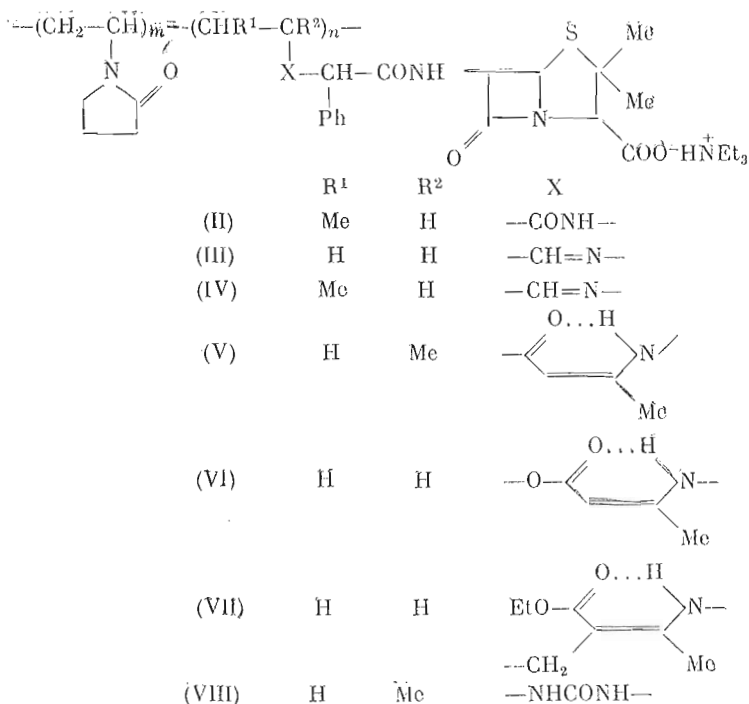
Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград

Для изучения зависимости свойств модифицированного полимером антибиотика от типа связи антибиотик — полимер получены производные ампициллина и сополимеров винилпирролидона (II—VIII), где ампициллин связан через амидную, мочевиновую, азометиновую или енаминную группировки. Показано, что присоединение антибиотика к полимеру приводит к снижению его чувствительности к пенициллиназе при сохранении антимикробных свойств. Наиболее устойчивыми к пенициллиназе были стабильные енамины (V) и (VI). Шиффовы основания (III) и (IV) оказались наиболее эффективными в отношении ампициллиноустойчивых грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов бактерий снижает эффективность антибиотикотерапии и вызывает необходимость поиска новых или модификации старых антибиотиков [1, 2]. Это касается прежде всего антибиотиков пенициллинового ряда, и в частности ампициллина, который обладает широким спектром действия, но из-за чувствительности к пенициллиназе — ферменту, продуцируемому большинством пенициллинорезистентных бактерий [4—6], постепенно теряет терапевтическую ценность. Поскольку было показано, что полимерные производные феноксиметилпенициллина обладают повышенной устойчивостью против инактивирующего действия пенициллиназы [7], мы предприняли изучение модификации ампициллина водорастворимыми полимерами и изучение свойств полимерных ампициллинов.

В качестве модифицирующих полимеров использовали сополимеры N-винилпирролидона с кротоновым альдегидом, акролеином, метакрилоилацетоном, винилацетоацетатом, аллилацетоуксусным эфиром, кротоновой кислотой и изопропенилизоцианатом (I), которые получали путем сополимеризации с соответствующим мономером или последующими реакциями в цепях сополимеров. Модификацию ампициллина проводили в инертном органическом растворителе. В зависимости от условий проведения реакции были получены водорастворимые полимеры (II—VIII), содержащие от 5 до 20% ампициллина.





Исследование чувствительности ампициллина в полученных производных к пенициллиназе *Bacillus licheniformis* 749/C (К Ф 3.5.2.6) проводили по ранее описанному методу [8]. Было обнаружено, что их инактивация описывается уравнением нулевого порядка и что все полимерные производные устойчивее ампициллина (см. рис. 1 и табл. 1). Наблюдалось также определенное влияние типа связи антибиотик — полимер на скорость инактивации. Наибольшую устойчивость проявил полимерный енаминон (V), имеющий в качестве мостиковой группы достаточно жесткую хелатированную структуру. Подвижность структур такого рода относительно цепи макромолекулы ограничена [9], и это, по-видимому, обуславливает значительные стерические препятствия атаке лактамного кольца β -лактамазой. У производного (VI) аналогичная жесткая хелатированная структура присоединена к полимеру через кислородный мостик, что вызывает увеличение ее конформационной свободы и, как следствие, некоторое возрастание скорости инактивации.

Присоединение ампициллина к макромолекуле посредством группировок N=CH, CONH и NHCONH также обеспечивает значительное снижение чувствительности к пенициллиназе. Следует отметить, что близость констант скорости инактивации производных (II), (III), (IV) и (VIII), по-видимому, указывает на определяющее влияние полимера в целом, а не мостиковых групп, хотя последние также обладают определенной жесткостью (ср. [10]). В случае же производных (V) и (VI) стерические препятствия, создаваемые макромолекулой и мостиковой группой, очевидно, дополняют друг друга.

Аномально высокая скорость инактивации производного (VII), как выяснилось (см. ниже), обусловлена высокой скоростью гидролитического отщепления антибиотика от полимера при нейтральном рН.

Изучение антимикробных свойств полученных полимерных производных ампициллина (II—VIII) было проведено в отношении ряда бактерий, как чувствительных, так и устойчивых к ампициллину (см. табл. 1). Более низкая активность полимерных производных в отношении чувствительного к ампициллину стандартного штамма стафилококка 209P обусловлена, вероятно, меньшей скоростью их диффузии по сравнению с

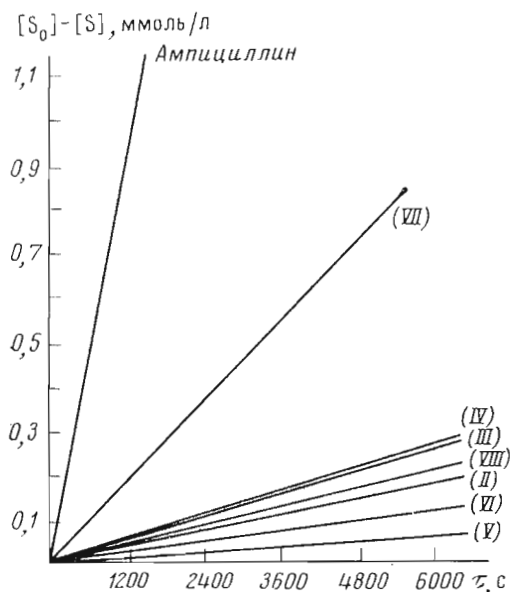


Рис. 1. Инактивация ампициллина и его полимерных производных пенициллиназой *Bacillus licheniformis* 749/C, pH 6,86; 37°. Начальная концентрация субстрата $[S]_0$ 1,72–2,72 мМ; $[S]$ — текущая концентрация субстрата в данный момент времени; концентрация энзима $[E]$ 38,5 ед/мл

низкомолекулярными антибиотиками к осуществляющей сшивку пептидогликановых цепей транспептидазе, необратимыми ингибиторами которой являются β-лактамы антибиотики [11, 12]. Напротив, в 5–40 раз более высокая активность некоторых полимерных производных по сравнению с ампициллином в отношении штаммов стафилококков 1235, 1582 и 8325P⁺, продуцирующих пенициллиназу, безусловно согласуется с данными по их устойчивости к этому ферменту. В отношении грамотрицательных бактерий производные (II) и (VIII) оказались неактивными, что свидетельствует о сужении спектра действия ампициллина при присоединении к полимеру CONH и NHCON мостиковыми группами. Полимерные енамины (V), (VI) и (VII) имели почти такую же активность, как и ампициллин, тогда как Шиффовы основания (III) и (IV) оказались наиболее активными: значения их минимальных подавляющих концентраций были в 2–35 раз ниже, чем у ампициллина.

Таким образом, тип связи антибиотик — полимер оказывает существенное влияние не только на чувствительность к пенициллиназе, но и на спектр антимикробного действия полимерных производных ампициллина.

Поскольку Шиффовы основания и енамины могут легко гидролизываться в воде в присутствии кислых и основных катализаторов [13], то с целью моделирования поведения полимерных енаминов и Шиффовых оснований в условиях биологических тестов была проведена оценка их устойчивости в кислой и основной среде. Производные (III–VI) оказались устойчивыми в нейтральной среде, и заметного отщепления антибиотика от полимерной матрицы не наблюдалось при выдерживании растворов этих полимеров в фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 2–3 дней. Снижение pH до 3–2 приводило к их быстрому гидролизу, и при гель-хроматографии (см. рис. 2) на выходной кривой появлялся пик с объемом удерживания, соответствующим ампициллину. Из этих производных наибольшую устойчивость имеет производное (V), для которого полное отщепление антибиотика наблюдалось лишь при pH 1–1,5, т. е. в условиях, когда ампициллин быстро инактивируется.

Таблица 1

Влияние типа связи антибиотик - полимер на чувствительность к пенициллине и на антимикробные свойства полимерных производных ампицилина

Соединение	Содержание антибиотика в полимере, %	Константа инaktivации *, K·10 ⁻⁹ , моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	Минимальные подавляющие концентрации, мкг/мл ** относительно тест-культур							
			Staphylococcus aureus			Escherichia coli		Proteus vulgaris	Klebsiella	
			209P	8323P	1582	670	154	142(3)		
(II)	21,7	28,3	180	180	1250	1250	1250	1800	1800	150(1)
(III)	43,0	36,8	450	450	2000	3,6	28	56	210	
(IV)	18,4	36,8	68	270	435	2,2	2,2	68	270	
(V)	2,2	2,83 ***	320	425	640	31,2	62,5	320	325	
(VI)	3,2	49,8	200	200	200	24	100	200	200	
(VII)	4,0	150,0	240	240	420	7,5	30	300	150	
(VIII)	14,4	31,1	-	1625	2000	2000	850	-	-	
Ампицилин		815,9	2000	2000	5000	20	80	250	500	

* VН 6,86, [E] = 38,5 ед./мл.

** В пересчете на содержание антибиотика в полимере.

*** [E] = 99 ед./мл.

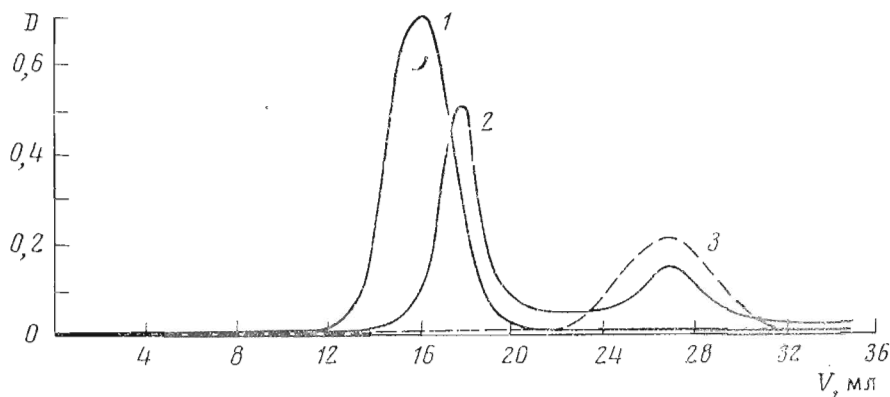
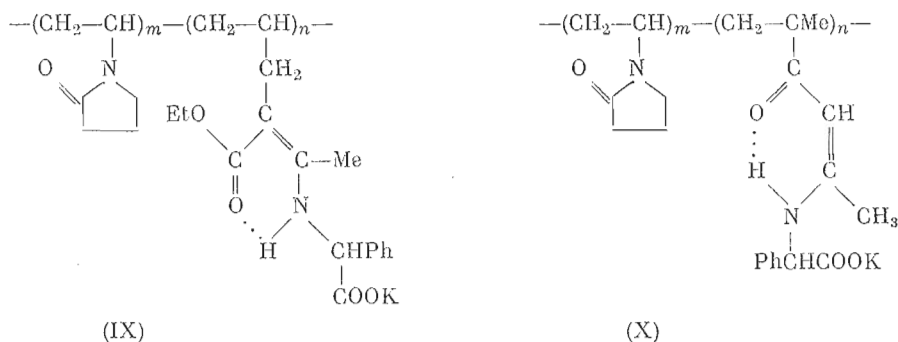


Рис. 2. Гель-хроматография полимерного производного ампициллина (III) в 0,01 н. фосфатном буфере (рН 6,86) на сефадексе G-25 (колонка 1 × 30 см): 1 — до гидролиза; 2 — после гидролиза в течение 2 ч при рН 3,5; 3 — ампициллин

В связи с тем что полимерный енаминон (V) имеет $\lambda_{\text{макс}}$ 317 нм (рН 1,0), а продукты кислотной инактивации ампициллина, которая протекает одновременно с его гидролизом, поглощают при 290—325 нм [14], определить в этом соединении спектрофотометрически скорость отщепления ампициллина от полимера не удавалось. Поэтому мы исследовали гидролиз модельных полимерных производных фенилглицина (IX) и (X):



В случае енаминонов (VII), (IX) образующийся в результате гидролиза полимер-носитель не поглощает в области поглощения енаминона, и, кроме того, как было установлено, гидролиз первых двух соединений протекает уже в нейтральной среде, в которой отщепляющийся ампициллин не инактивируется. Большая скорость гидролиза енаминонов (VII) и (IX) (см. рис. 3 и табл. 2) объясняет кажущуюся высокую чувствительность первого из них к пенициллиназе по сравнению с другими полимерными

Таблица 2

Спектральные характеристики и константы гидролиза полимерных енаминонов

Соединение	Молярный процент енаминона в сополимере	$\lambda_{\text{макс}}$ енаминона в воде при рН 2,0, нм	ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	рН	Константа гидролиза, $K_r \cdot 10^{-6}$, л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹
(VII) *	1,0	289	540	6,86	1,32
(IX)	9,0	302	390	6,86	22,20
(X)	9,0	316	1680	2,01	0,84

* В виде K⁺-соли.

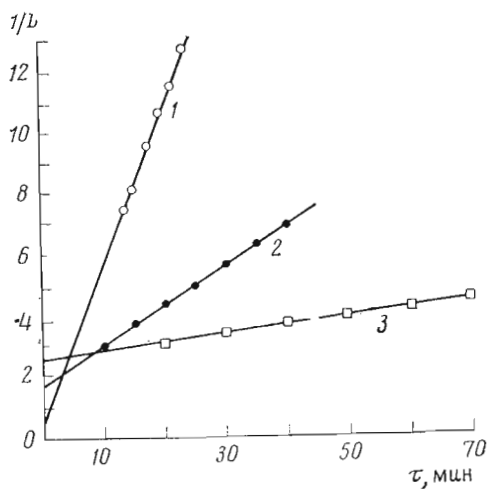


Рис. 3. Кислотный гидролиз полимерных енаминонов: 1 — полимерное производное фенилглицина (IX), рН 6,86; 2 — полимерное производное ампициллина (VII), рН 6,86; 3 — полимерное производное фенилглицина (X), рН 2,04

полимер винилпирролидона с метакрилоилацетоном получали по методу [19]; содержание β -дикарбонильных групп 12 молярных %, \bar{M} 90 000. Сополимер винилпирролидона с винилацетоацетатом получали ацилированием дикетеном сополимера винилпирролидона с виниловым спиртом по методу, описанному ранее для ацилирования поливинилового спирта [9]; содержание винилацетоацетата 18 молярных %, \bar{M} 10 000. Сополимер винилпирролидона с аллилацетоуксусным эфиром получали сополимеризацией в массе при 70° в присутствии 0,5—1% азоизобутиронитрила в качестве инициатора. Использовали сополимер, содержащий 12 молярных % аллилацетоуксусного эфира, \bar{M} 120 000. Все сополимеры очищали пересаживанием из хлороформа диэтиловым эфиром.

В работе использовали тригидрат ампициллина. Взаимодействие ампициллина с эквимолекулярными количествами β -дикарбонильных и карбонильных полимеров проводили в хлороформе или диметилформамиде при комнатной температуре в присутствии триэтиламина в течение 24—48 ч.

Полимерные производные фенилглицина (IX) и (X) получали конденсацией фенилглицина с эквимолекулярными количествами β -дикарбонильных полимеров в абсолютном метаноле в присутствии алкоголята калия. После окончания реакции (6—8 ч при 60 — 70°) реакционную смесь осаждали эфиром и полученный полимер очищали многократным пересаживанием из этанола эфиром.

Сополимер винилпирролидона с кротоновой кислотой активировали дициклогексилкарбодиимидом при комнатной температуре или этокси-хлорформинатом при 0 — 5° . Продукт его реакции с ампициллином осаждали ацетоном и очищали пересаживанием из хлороформа или диметилформамида ацетоном. Окончательную очистку продукта реакции осуществляли гель-хроматографией на сефадексе G-10.

Снятие ампициллина с полимерной матрицы тестировали гель-хроматографией по появлению на выходной кривой компонентов с объемом удерживания, соответствующим ампициллину и продуктам его кислотной инактивации.

Кинетику кислотного гидролиза полимерных енаминонов ампициллина и фенилглицина изучали спектрофотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР). Реакцию гидролиза проводили непосредственно

производными ампициллина. Енаминон (X) оказался устойчивым в нейтральной среде и гидролизовался с заметной скоростью лишь при $\text{pH} \leq 2$.

Экспериментальная часть

Сополимер винилпирролидона с кротоновой кислотой получали по методу [15]. Сополимер содержал 17 молярных % карбоксильных групп и имел \bar{M} 10 000. Сополимер винилпирролидона с кротоновым альдегидом получали по методу [16], \bar{M} 30 000, 18 молярных % альдегидных групп. Сополимер винилпирролидона с изопропенилизоцианатом состава 83 : 7 и \bar{M} 24 000 получали по методу [17]. Сополимер винилпирролидона с акролеином получали по методу [18], \bar{M} 35 000, 19 молярных % альдегидных групп. Со-

в термостатируемых кюветах при температуре $37,0 \pm 0,1^\circ$. В качестве сравнительных проб использовали растворы полимерных енаминонов той же концентрации, что и исследуемые, но предварительно гидролизованные в тех же условиях. Таким образом исключалось влияние поглощения других функциональных групп сополимеров на наблюдаемую оптическую плотность раствора в рабочей кювете. Регистрация изменения оптической плотности во времени осуществлялась автоматически при постоянной длине волны, соответствующей $\lambda_{\text{макс}}$ енаминона при данном рН.

В случае полимерного енаминона (IX) уменьшение оптической плотности гидролизуемого раствора было связано со сдвигом максимума поглощения енаминона (316 нм) до 279 нм (свободные β -дикарбонильные группы).

Для реакций использовали растворы сополимеров с концентрациями енаминонов от 0,3 до 4,0 мМ. Константы скорости гидролиза второго порядка определяли из зависимости обратной величины оптической плотности, $1/D$, от времени. Из этих же зависимостей экстраполяцией к нулевому времени были определены коэффициенты молярной экстинкции, ϵ .

Антимикробную активность изучали методом серийных разведений в бульоне Хоттингера (рН 7,2—7,4, содержание аминного азота 130 мг %). Микробная нагрузка составляла 10^6 клеток в 1 мл. В качестве тест-культур использовали пенициллиночувствительный штамм золотистого стафилококка 209Р и три пенициллиназопродуцирующих штамма патогенного стафилококка 1235, 8325 Р⁺ и 1582, а также два штамма кишечной палочки и по одному штамму *Proteus* и *Klebsiella*, обладающих устойчивостью к ампициллину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гейл Э., Кандлифф Э., Рейнольдс П., Ричмонд М., Уоринг М. (1975) Молекулярные основы действия антибиотиков, с. 419—458, «Мир», М.
2. Соловьев В. Н. (1973) Стратегия современной химиотерапии бактериальных инфекций, с. 242, «Медицина», М.
3. Богданова Л. Ф., Афанасьева Г. И., Власова И. В., Соловьева В. Е., Соболев В. Р. (1976) Антибиотики, 985—988.
4. Kayser F. H., Benner E. J., Troy R., Hoerprich P. D. (1971) Ann. N. Y. Acad. Sci., 182, 106—117.
5. Richmond M. H., Curtis N. A. C. (1974) Ann. N. Y. Acad. Sci., 235, 553—567.
6. Кузнецова С. М., Фомина И. П., Макарова Р. А., Навашина С. М. (1968) Антибиотики, 489—495.
7. Соловский М. В. (1974) Канд. дис. «Синтез и свойства некоторых полимерных производных 6-аминопеницилламовой кислоты», Л.
8. Панарин Е. Ф., Соловский М. В. (1971) Антибиотики, 882—885.
9. Панарин Е. Ф., Копейкин В. В., Денисов В. М., Кольцов А. И. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 551—554.
10. Коулсон Ч. (1965) Валентность, с. 282, «Мир», М.
11. Blumberg P. M., Strominger J. L. (1974) Bacteriol. Revs, 38, 291—325.
12. Lee B. (1971) J. Mol. Biol., 61, 463—469.
13. Dixon K., Greenhill J. V. (1974) J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 164—168.
14. Longridge J. L., Timms D. (1971) J. Chem. Soc. B, 848—857.
15. Ушаков С. Н., Кропачев В. А., Трухманова Л. Б., Груз Р. И., Маркелова Т. М. (1967) Высокомолекул. соед., А9, 1807—1813.
16. Ушаков С. Н., Трухманова Л. Б., Маркелова Т. М., Кропачев В. А. (1967) Высокомолекул. соед., А9, 999—1003.
17. Hart R. (1956) Bull. Soc. chim. belg., 75, 571—579.
18. Панарин Е. Ф., Васильев В. К. (1976) Хим.-фармацевт. ж., № 3, 64—67.
19. Копейкин В. В., Панарин Е. Ф., Милевская И. С., Реди Н. С. (1977) Высокомолекул. соед., А19, 861—866.

Поступила в редакцию
3.V.1977

После доработки
27.VI.1977

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SOME POLYMER-BOUND AMPICILLIN DERIVATIVES

PANARIN E. F., KOPEIKIN V. V., AFINOGENOV G. E.

*Institute of High Molecular Weight Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad.*

Some polymeric derivatives of ampicillin and copolymers of vinylpyrrolidone were prepared to elucidate the effect of the bond between the polymer and the antibiotic on the properties of the latter. Ampicillin was attached to the polymer chain via different spacer groups: amide, azomethin, urea, and enaminon. It was found that polymer derivatives of ampicillin retained antimicrobial activity and were more resistant against penicillinase from *Bacillus licheniformis* 749/C than parent antibiotic. Schiff bases and enaminons were most effective against ampicillin resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria.
