М. В. Соловский[1], Н. В. Никольская[1], Н. А. Заикина[2]

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМЕРНЫХ ЭФИРОВ ОКСАЦИЛЛИНА

[1] Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург,
[2] Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия

Синтезированы и охарактеризованы водорастворимые, активные в отношении стафилокков полимерные эфиры антибиотика оксациллина на основе линейного поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида (ГПМА) и разветвленного хемодеградируемого поли-ГПМА. Установлено, что полиэфир оксациллина на основе разветвленного поли-ГПМА гидролизуется с высокой скоростью при 37 °C в физиологическом растворе с pH 7,0 и особенно быстро в буферном растворе с pH 2,0.

Одним из недостатков оксациллина (I) является кратковременность его терапевтического действия (для поддержания терапевтической концентрации в крови его необходимо принимать каждые 4 – 6 ч).

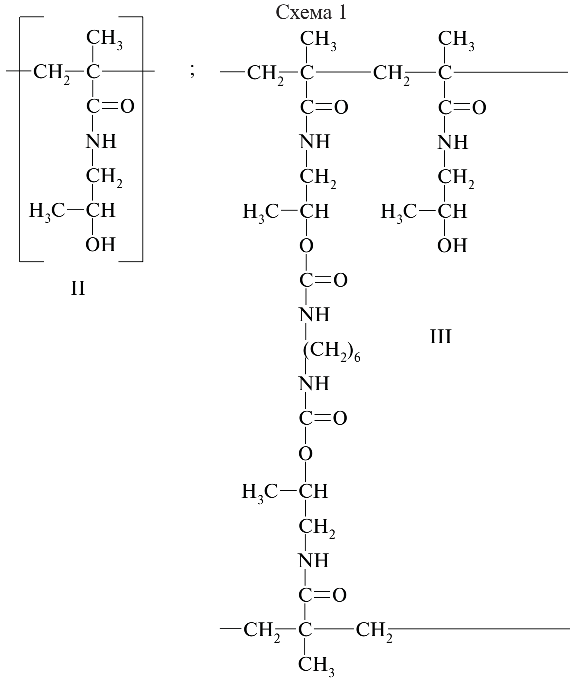
Как известно, увеличение продолжительности действия лекарственного вещества можно достигнуть, присоединив его к водорастворимому нетоксичному реакционноспособному полимеру-носителю [1 – 3].

В настоящей работе приведены данные о синтезе новых водорастворимых полимерных эфиров I, их антимикробной активности и скорости гидролиза сложноэфирной связи между антибиотиком и полимером-носителем в условиях, моделирующих физиологические условия живого организма.

В качестве полимеров-носителей были синтезированы гидрофильные полимеры на основе N-(2-гидроксипропил)метакриламида (ГПМА) двух типов: линейный поли-ГПМА с молек. массой 20000 (II), содержащий вторичные гидроксильные группы, и разветвленный хемодеградируемый поли-ГПМА (III) с молек. массой 71000, содержащий между основными полимерными цепями лабильные уретановые связи (схема 1).

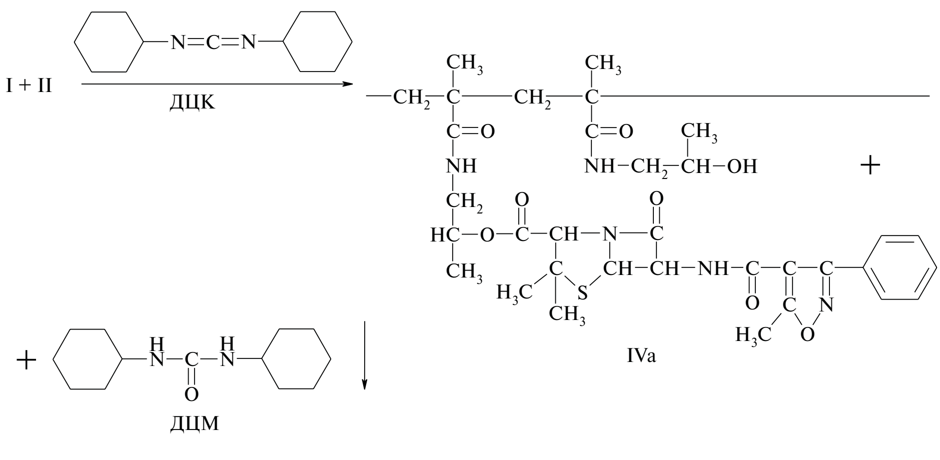
III благодаря наличию межцепных уретановых связей подвергается в живом организме гидролизу или биодеградации на низкомолекулярные фрагменты, что может обеспечить его полное выведение из организма и пролонгирующее действие лекарственных препаратов, предварительно присоединенных к такому хемодеградируемому полимеру-носителю. В частности, было установлено [4], что степень гидролиза III в физиологическом растворе при 37 °C составляет за месяц 68 %.

Схема 1



II ; III

Схема 2



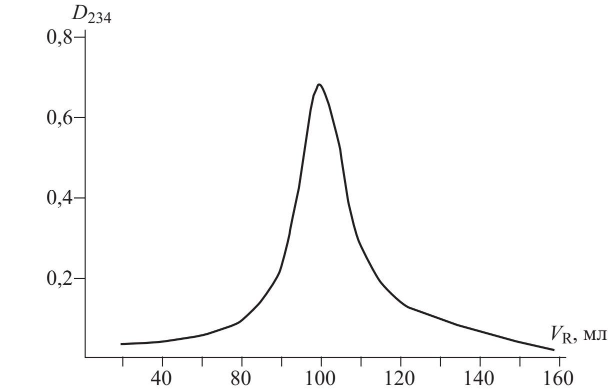


Рис. 1. Выходная кривая элюции полимерного эфира оксациллина IVб с колонки с гелем сефадекса G-50, элюент – вода, скорость элюции 18 мл/ч. В колонку введено 10 мг/мл полиэфира. D_{234} — оптическая плотность 4 мл элюата. V_R — удерживаемый объем

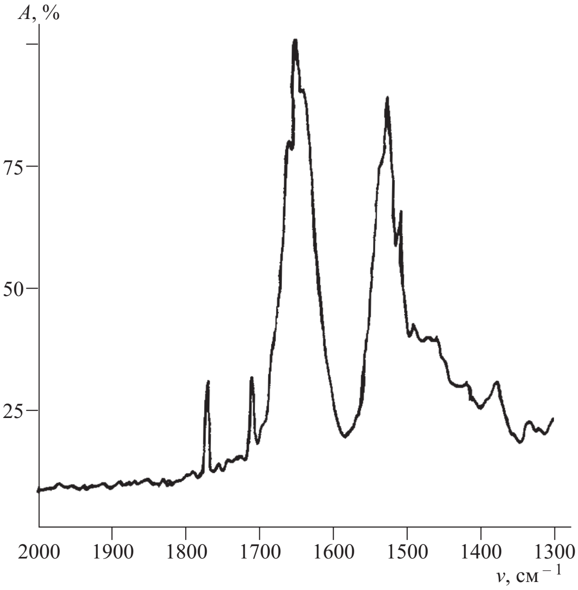


Рис. 2. ИК-спектр полимерного эфира оксациллина IVб в области 1300 – 2000 см$^{-1}$. A — пропускание, ν — волновое число

На основе II и III были получены полимерные эфиры оксациллина (соответственно IVа и IVб), синтез которых проводили в ДМФА при температуре 0 – 5 °C при использовании в качестве конденсирующего агента N,N′-дициклогексилкарбодиимида (ДЦК).

В случае II реакция протекает по схеме 2.

По аналогичной схеме был получен IVб на основе разветвленного гомополимера III (схема 3).

О прохождении реакции в обоих случаях свидетельствовало выделение дициклогексилмочевины (ДЦМ) из реакционного раствора.

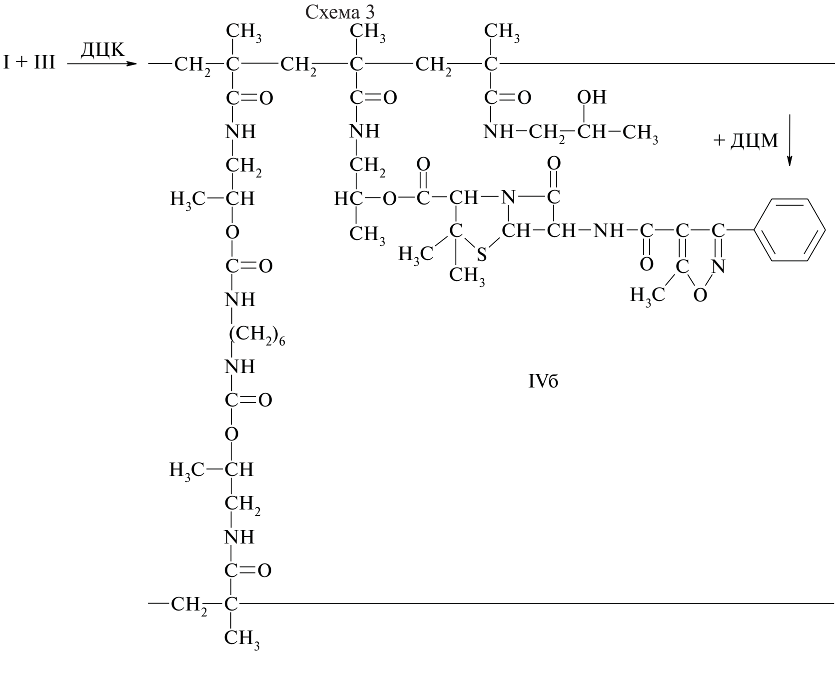
Полученные продукты IVа и IVб проверяли на однородность методом гель-фильтрации на колонке с гелем сефадекса G-50. Как видно из рис. 1, IVб однороден (выходит из колонки в виде одного пика) и не содержит примесей непрореагировавшего антибиотика. Аналогичным образом была подтверждена однородность IVа.

В полученных водорастворимых полимерных эфирах I определяли количество связанного антибиотика методом УФ-спектроскопии (по оптической плотности в области 234 нм — плечо полосы поглощения оксациллина) и йодометрическим методом определения пенициллинов.

Как видно из данных, приведенных в таблице, содержание I в полученных продуктах, определенное спектральным и йодометрическим методом, совпадает в пределах погрешности анализа. Это свидетельствует об отсутствии инактивации I в ходе синтеза его полимерных эфиров карбодиимидным методом.

Установлено, что полученные полимерные эфиры I обладают антимикробной активностью *in vitro* (таблица), которая не зависит от типа полимера-носителя

Схема 3



IVб

(линейный, разветвленный). Можно ожидать, что в живом организме антимикробная активность полиэфиров I возрастет в результате гидролиза сложноэфирной связи между антибиотиком и полимером-носителем как под действием желудочного сока, межклеточной жидкости, так и под действием эстераз.

Строение IVб было дополнительно подтверждено методом ИК-спектроскопии. На рис. 2 приведен ИК-спектр продукта IVб в таблетке с KBr. В ИК-спектре обнаруживаются: полоса валентных колебаний C=O сложноэфирной группы при 1720 см$^{-1}$, полоса валентных колебаний C=O β-лактамного кольца оксациллина в области 1770 см$^{-1}$, интенсивные полосы валентных колебаний C=O амидной группы полимера в области 1650 и 1520 см$^{-1}$.

В связи с тем, что I применяется парентерально и перорально, представлялось интересным оценить методом мембранного равновесия [5] скорость расщепления сложноэфирной связи между антибиотиком и полимером III в следующих модельных средах, а) физиологический раствор, pH = 7,0; t = 37 °C; б) гликоколовый буфер, pH = 2,0; t = 37 °C.

Было установлено, что гидролиз IVб с молек. массой 71000 в обеих средах протекает с заметной скоростью уже в первые часы реакции (рис. 3). При этом при pH = 2,0 скорость процесса выше. За 7 дней степень гидролиза ($Q_г$) полиэфира I при pH = 7,0 составляет 48,9 %, а при pH = 2,0 – 72,1 %. Исследовать гидролиз IVа методом диализа через целлофановую мембрану сочли некорректным, поскольку предварительные опыты по диализу белка лизоцима с молек. массой ≈ 15000 показали, что он частично проходит через мембрану. Степень прохождения лизоцима через мембрану за 6 дней составляет 12 %.

Полученные результаты (высокая скорость гидролиза при pH = 2,0) свидетельствуют о целесообразности перорального применения IVб. Кроме того, они позволяют считать уместным и парентеральный способ его введения, имея в виду его антимикробную активность, достаточно быстрое отщепление антибиотика от полимера-носителя и достаточно быстрое элиминирование самого носителя из организма. Как оказалось, скорость отщепления I от полимера выше, чем скорость гидролиза межцепных уретановых связей в полимере. Поэтому именно гидролиз сложноэфирной связи между антибиотиком и полимером-носителем и будет определять эффект пролонгирования антимикробной активности I.

Полимерные эфиры оксациллина

Соединение	Выход, %	Содержание антибиотика, %		МПК*, мкг/мл, *Staphylococcus aureus*	
		УФ анализ	Йодо-метрия	по антибиотику	препарата
IVа	42,9	13,0	14,8	6,0	40,0
IVб	39,8	15,2	17,0	6,0	35,3
Оксациллина натриевая соль		–	92,0	3,0	3,0

* МПК — минимальная подавляющая концентрация.

Экспериментальная биологическая часть

Антимикробную активность натриевой соли I и его полимерных эфиров IVа и IVб определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (мясопептонный бульон) [6]. Тест-культуру — *Staphylococcus aureus* (штамм 38) выращивали 18 ч. Микробная нагрузка составляла 500000 микробных клеток в 1 мл разведенного в жидкой среде препарата.

Экспериментальная химическая часть

Синтез низкомолекулярного линейного поли-N-(2-оксипропил)метакриламида II. В стеклянную ампулу помещают 0,09 г (4,5 масс.%) динитрила азобисизомасляной кислоты. Затем в плоскодонной колбе емкостью 50 мл растворяют смесь 2 г ГПМА и 0,09 г (4,5 масс.%) 4-нитрофенола в 14 мл пропанола-2. Полученный раствор через воронку заливают в ампулу. Ампулу продувают аргоном, запаивают и помещают в термостат, в котором поддерживается температура 65 °C. Через 24 ч ампулу охлаждают, вскрывают и вязкий раствор из ампулы по каплям выливают при перемешивании в 250 мл сухого ацетона. Выпавший полимер фильтруют через фильтр Шотта и сушат в вакууме. Получают 1,23 г (61,3 %) поли-ГПМА, с [η] = 0,085 дл/г, с $\overline{M}_v$ = 20000. Характеристическую вязкость полученного полимера измеряли в 0,1 M растворе KCl в воде при 25 °C. Для определения $\overline{M}_v$ использовали уравнение Марка – Куна – Хаувинка, установленное для поли-ГПМА [7].

Синтез разветвленного поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида III. В конической колбе емкостью 50 мл растворяют 0,5 г поли-ГПМА ([η] = 0, 11 дл/г, с $\overline{M}_v$ = 30000) в 3,88 мл ДМФА, в полученный раствор добавляют 25,27 мкл 1,6-гексаметилендиизоцианата (ГМДИЦ), [ГМДИЦ]/[OH] = 0,045:1. Реакционную смесь переносят в стеклянную ампулу, продувают аргоном, запаивают и помещают в масляную баню с температурой 130 °C. Через 6,5 ч ампулу охлаждают, вскрывают, добавляют 0,5 мл этанола и выливают содержимое ампулы в 200 мл серного эфира. Выпавший полимер фильтруют и сушат до постоянной массы. Получают 0,276 г (55,2 %) растворимого в воде продукта реакции с [η] = 0,18 дл/г, с M_{SD} = 71000.

Молекулярную массу M_{SD} образца III определяли методом сочетания диффузии и седиментации по ранее описанной методике [8].

Синтез оксациллина I (в виде кислоты). 2,5 г натриевой соли I растворяют в 30 мл воды, полученный раствор переносят в делительную воронку объемом 250 мл и добавляют 50 мл хлороформа. В водный слой по каплям прибавляют 1 н. раствор соляной кислоты, встряхивая содержимое воронки, до исчезновения белого осадка в водном слое. Хлороформный слой отделяют, промывают три раза водой порциями по

30 мл и сушат безводным сульфатом натрия в течение суток при комнатной температуре. Хлороформный слой отделяют от сульфата натрия, хлороформ отгоняют на ротационном испарителе, остаток сушат в вакууме без нагрева. Выход оксациллина-кислоты 1,78 г (78,4 %). Йодометрическая активность полученного продукта 920 мкг/мг.

Синтез полимерного эфира оксациллина IVа на основе II. 0,55 г II с $[\eta] = 0{,}085$ дл/г, с $\overline{M}_v = 20000$ растворяют в 5 мл ДМФА. К полученному раствору добавляют 1,7 г сухой кислоты I. Полученную смесь перемешивают при охлаждении льдом с солью в течение 30 мин и добавляют раствор 0,87 г N,N′-дициклогексилкарбодиимида в 3 мл ДМФА. Раствор перемешивают при охлаждении (0 – 5 °C) в течение 2 ч и в течение 5 ч при комнатной температуре. Реакционную массу оставляют на ночь в холодильнике. Отфильтровывают дициклогексилмочевину и продукт реакции осаждают ацетоном, в котором хорошо растворяется кислота I. Продукт сушат, получают 0,858 г (42,9 %) растворимого в воде IVа, не содержащего примесей непрореагировавшего антибиотика. Продукт содержит 13,0 масс.% связанного I (по данным УФ-спектроскопии). Содержание I определенное йодометрическим методом, составляет 14,8 масс.%.

Синтез полимерного эфира оксациллина IVб на основе III, с $[\eta] = 0{,}18$ дл/г, с $M_{SD} = 71000$, проводят по аналогичной методике, исходя из 0,124 г III, 0,475 г I и 0,244 г ДЦК. Получают 0,0496 г (39,8 %) IVб, не содержащего примесей непрореагировавшего антибиотика. Продукт содержит 15,2 масс.% связанного I (по данным УФ-спектроскопии), а по данным йодометрического анализа — 17,0 масс.%.

ИК-спектр IVб записан на спектрофотометре “Specord IR-75” в таблетке с KBr.

Гидролиз IVб исследовали в буферном растворе (pH = 2,0) и в физиологическом растворе при температуре 37 °C согласно [9].

Йодометрическую активность полимерных эфиров I определяли по методу [10].

Авторы выражают благодарность С. И. Кленину, Е. Б. Тарабукиной и А. В. Адамову за определение молекулярной массы разветвленного поли-ГПМА III.

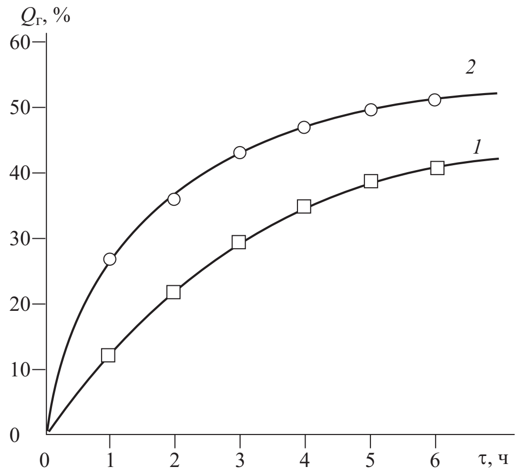


Рис. 3. Гидролиз полимерного эфира оксациллина IVб при 37 °C. *1* — в физиологическом растворе, pH = 7,0. *2* — в буферном растворе, pH = 2,0. $Q_г$ — степень гидролиза. Исходная концентрация IVб — 2 мг/мл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки ведущих научных школ (грант № НШ-1823.2003.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Д. Вирник, В. А. Снежко, К. П. Хомяков, *Полимеры в медицине*, № 7, 27 – 55 (1977).
2. Н. А. Платэ, А. Е. Васильев, *Физиологически активные полимеры*, Химия, Москва (1986), сс. 99 – 100; 138 – 140.
3. Е. Ф. Панарин, В. К. Васильев, *Хим.-фарм. журн.*, **10**(3), 64 – 67 (1976).
4. Н. В. Никольская, *Автореф. дис. канд. хим. наук*, Санкт-Петербург (2003).
5. Т. И. Рожанская, Л. В. Дмитренко, Г. В. Самсонов, *Высокомолек соедин.*, **14**(Б), 370 – 373 (1972).
6. С. М. Навашин, И. П. Фомина, *Рациональная антибиотикотерапия*, Медицина, Москва (1982), сс. 40 – 41.
7. M. Bohdanecky, Y, BaŽilova, I. Kopeček, *Eur. Polym. J.*, **10**, 405 – 410 (1974).
8. М. В. Соловский, Н. В. Никольская, В. М. Денисов и др., *Ж. приклад. химии*, **76**(2), 284 – 288 (2003).
9. М. В. Соловский, Н. В Никольская, Н. А. Заикина, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(2), 9 – 12 (2002).
10. I. F. Alicino, *Analyt. Chem.*, **33**, 648 – 649 (1961).

Поступила 23.10.03.

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLYMER ESTERS OF OXACILLIN

M. V. Solovskij[1], N. V. Nikols’kaya[1], N. A. Zaikina[2]

[1] Institute fo macromolecular compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
[2] Saint-Petersburg Chemical-pharmaceutical academy, Russia

Water-soluble polymer esters of oxacillin based on linear poly-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) and branched hemodegradable poly-HPMA containing interchain labile urethane bonds were synthesized and characterized by their composition, homogeneity, molecular weights (MW), and antimicrobial activity. Hydrolysis kinetics at 37°C of poly-ester oxacillin based on branched poly-HPMA with MW = 71000 in a physiological solution at pH 7.0 and in a buffer at pH 2.0 were investigated by the method of dialysis through cellophane membrane. It was established that under these conditions polymer ester of oxacillin is hydrolyzed at a high rate (in particular in an acid medium) determining the possibility of prolonging antimicrobial activity of oxacillin. All polymer esters of oxacillin thus obtained exhibit considerable antistaphylococcus activity.