

© Коллектив авторов, 2016

А. В. Жиленков¹, Е. А. Хакина¹, П. А. Трошин^{1,2}, К. С. Инчагова^{3,4}, Д. Г. Дерябин³

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНЫХ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ТЕТРАЦИКЛИНА/ДОКСИЦИКЛИНА И ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ C₆₀-ФУЛЛЕРЕНА

¹ ФГБУН "Институт проблем химической физики" Российской академии наук, Россия, 142432, Московская обл., Черноголовка, просп. Академика Семенова, д. 1; e-mail: troshin2003@inbox.ru

² Сколковский институт науки и технологий, Россия, 143026, Москва, улица Нобеля, д. 3

³ ФГБУ "Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства" ФАНО; Россия, 460000, Оренбург, ул. 9-го Января, д.29; e-mail: dgderyabin@yandex.ru

⁴ ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Россия, 460018, Оренбург, просп. Победы, д. 13

В высокоспецифичных реакциях хлорфуллерена C₆₀Cl₆ с каптоприлом и алифатическим амином получены водорастворимые пентазамещенные производные C₆₀-фуллерена, функционализованные анионоидными или катионоидными аддендами. Установлено, что в водном окружении в присутствии стехиометрического (1:1 моль) количества синтезированных производных C₆₀-фуллерена и антибиотиков из группы тетрациклина происходит формирование гибридных супрамолекулярных комплексов с полимодальным распределением гидродинамического радиуса образующихся наноразмерных мицелл и везикул. Изучение биологической активности подобных гибридных структур показало, что комплексы антибиотиков с катионоидным аминопроизводным C₆₀-фуллерена проявляли синергетический антибактериальный эффект, наиболее выраженный в отношении устойчивого к тетрациклинам штамма *Escherichia coli* (носителя гена Tc^R).

Ключевые слова: тетрациклин; C₆₀-фуллерен; гибридные комплексы; противомикробная активность.

Тетрациклины — группа поликетидных антибиотиков широкого спектра действия, механизм антибактериальной активности которых заключается в ингибировании связывания аминоацил-tРНК с соответствующим акцепторным участком на 30S-субъединице бактериальной рибосомы [1]. Их продолжительное использование привело к возникновению антибиотикорезистентности, генетически детерминируемой генами Tc^R (от англ. – tetracycline resistance) и наиболее часто связанной с системами энергозависимого эффлюкса тетрациклинов из бактериальной клетки [2]. Одним из перспективных направлений преодоления подобного механизма устойчивости представляется создание супрамолекулярных комплексов антибиотика с C₆₀-фуллереном, способных качественно изменять его биодоступность для бактериальных клеток-мишеней [3]. Дополнительными предпосылками для этого являются расчеты, свидетельствующие о возможности формирования устойчивых нековалентных комплексов некоторых высших фуллеренов с антибиотиками из группы цефалоспоринов [4], а также опыт физико-химического анализа комплексообразования C₆₀-фуллерена с антибиотиком доксорубицином [5].

В данном сообщении описано получение гибридных супрамолекулярных структур, образуемых тетрациклиновыми антибиотиками и водорастворимыми производными C₆₀-фуллерена. Представлены результа-

ты сравнения противомикробной активности производных фуллеренов, антибиотиков и гибридных наноструктур в отношении исходно чувствительного и резистентного к тетрациклинам штамма *Escherichia coli*.

При проведении исследований использованы чистые препараты тетрациклина (Tc) и доксициклина (Dc), а также пентазамещенные водорастворимые производные C₆₀-фуллерена с различным знаком заряда на функционализирующих аддендах (рис. 1). Анионоидное производное фуллерена **I** синтезировано в реакции хлорфуллерена C₆₀Cl₆ с каптоприлом [6]. Синтез и спектральные характеристики катионоидного производного фуллерена **II** в реакции хлорфуллерена C₆₀Cl₆ с алифатическими аминами описаны нами ранее [7].

С использованием метода динамического рассеяния света (ДРС) показано, что в водном окружении в присутствии стехиометрического (1:1 моль) количества соединений **I** и **II** и тетрациклинов происходит формирование гибридных супрамолекулярных комплексов "фуллерен — антибиотик" с полимодальным распределением гидродинамического радиуса образующихся наноразмерных мицелл и везикул.

При проведении последующего микробиологического анализа установлено, что анионоидное производное фуллерена **I** не проявляло собственной антибактериальной активности, а сформированные на его

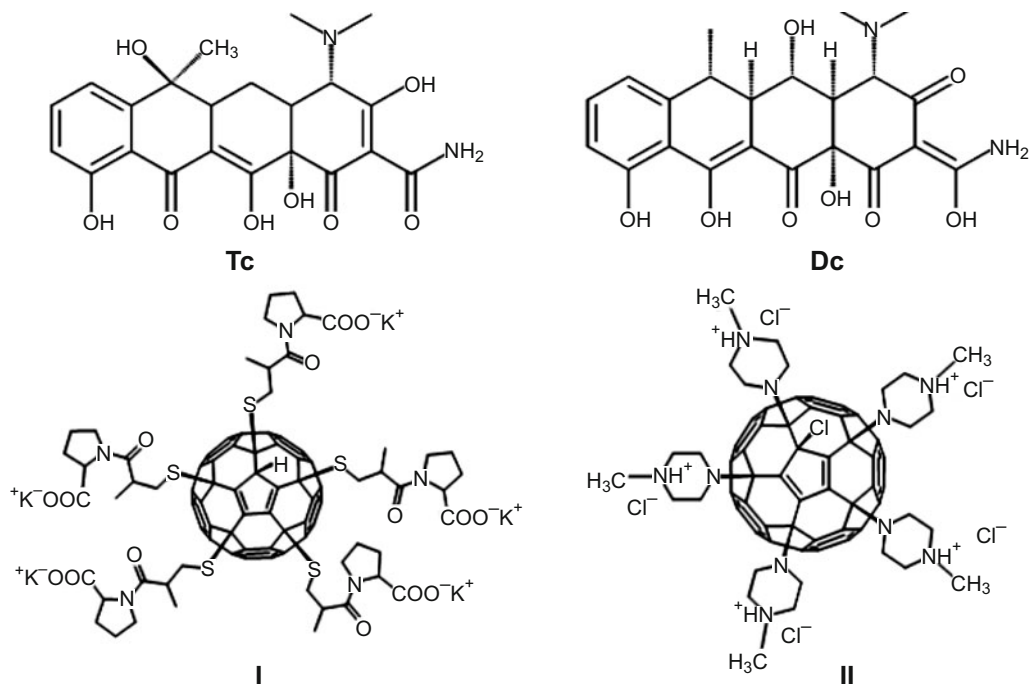


Рис. 1. Структурные формулы водорастворимых производных C₆₀-фуллерепа (I и II) и антибиотиков тетрациклина (Tc) и доксициклина (Dc).

основе гибридные комплексы I-Tc и I-Dc снижали такую относительно эквивалентных количеств тетрациклина и доксициклина. В свою очередь, катионоидное производное фуллерепа II самостоятельно ингибировало рост тестерных штаммов *Escherichia coli*, а его супрамолекулярные комплексы II-Tc и II-Dc демонстрировали синергетический антибактериальный эффект, наиболее выраженный в отношении антибиотикорезистентного штамма *E. coli* (носителя гена *Tc^R*) с уменьшением значений минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в 8 – 32 раз и снижением величин IC₅₀ в 3 – 11 раз.

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C соединений I и II регистрировали на спектрометре “Bruker AVANCE 600” (США) (600 МГц (¹H) и 150 МГц (¹³C)) в (CD₃)₂SO, (CD₃)₂CO:CS₂ (1:1). Масс-спектры (ионизация методом электрораспыления, ESI) получали на спектрометре “Shimadzu LCMS-2020” (Япония). Гидродинамический радиус (R_h) частиц, формируемых в водной среде соединениями I и II и их комплексами с тетрациклином или доксициклином, оценивали методом ДРС на приборе Photocor Complex (Россия). Антибиотики доксициклин и тетрациклин, произведены ОАО “Биосинтез” (Россия); перед проведением экспериментов субстанции дополнительно очищали экстракцией в системе 0,5 М водный ацетат натрия — метилхлорид.

Пентазамещенные производные C₆₀-фуллерепа (I и II). К раствору хлорфуллерепа C₆₀Cl₆ (1000 мг; 1,07 мМ) в толуоле (600 мл) при интенсивном перемешивании прибавляют избыток каптоприла (2325 мг; 10,7 мМ) и диизопропилэтиламин (828 мг; 6,42 мМ),

из реакционной смеси в течение 5 мин в осадок выпадает соль целевой кислоты с основанием Хёнига. Осадок отделяют центрифугированием, промывают ацетоном и растворяют в дистиллированной воде, прибавляя по каплям 0,1 М раствор K₂CO₃. Полученный водный раствор фильтруют через бумажный фильтр, после чего целевую кислоту осаждают из фильтрата добавлением 1 М HCl. Осадок вновь отделяют центрифугированием, промывают дистиллированной водой и сушат в вакууме. Получают 1215 мг кислотной формы соединения I в виде порошка оранжевого цвета, выход 63 % от теоретического.

ЯМР ¹H ((CD₃)₂CO:CS₂ (1:1), 600 МГц, δ, м.д.): 1,15 – 1,26 (м, 15H, CH₃); 1,76 – 2,34 (м, 20H, CH₂); 2,53 – 2,97 (м, 10H, CH₂-S, CH-C(O)); 3,1 – 3,23 (м, 5H, CH₂-S); 3,32 – 3,78 (м, 10H, CH₂-N); 4,15 – 4,33 (м, 5H, CH-COOH); 4,95 (с, 1H, C_{sp3} каркаса -H).

ЯМР ¹³C ((CD₃)₂CO:CS₂ (1:1), 150 МГц, δ, м.д.): 16,54 (CH₃); 16,65 (CH₃); 24,37 (CH₂); 24,42 (CH₂); 27,08 (CH₂); 28,72 (CH₂); 41,14 (CH-C(O)); 41,33 (CH-C(O)); 46,44 (S-CH₂); 46,50 (S-CH₂); 46,55 (S-CH₂); 54,00 (C_{sp3} каркаса); 55,92 (C_{sp3} каркаса); 56,60 (C_{sp3} каркаса); 58,26 (CH-COOH); 58,30 (CH-COOH); 58,34 (CH-COOH); 59,06 (C_{sp3} каркаса-H); 140,06; 141,95; 142,23; 142,48; 142,58; 142,61; 142,72; 143,27; 143,65; 143,76; 144,07; 145,68; 146,12; 146,16; 146,22; 146,27; 146,31; 146,35; 147,45; 147,51; 147,53; 147,65; 147,73; 147,81; 147,87; 147,99; 148,17; 148,20; 172,72 (N-C=O); 173,25 (N-C=O); 173,30 (COOH); 173,34 (COOH); 173,45 (COOH).

Масс-спектр (ESI), найдено: m/z = 1801 ([M-H]⁻), 900 ([M-H]²⁻); вычислено для C₁₀₅H₇₁N₅O₁₅S₅: M = 1803.

Для получения соединения I его кислотную форму (1215 мг; 0,67 мМ) диспергируют в 50 мл дистиллиро-

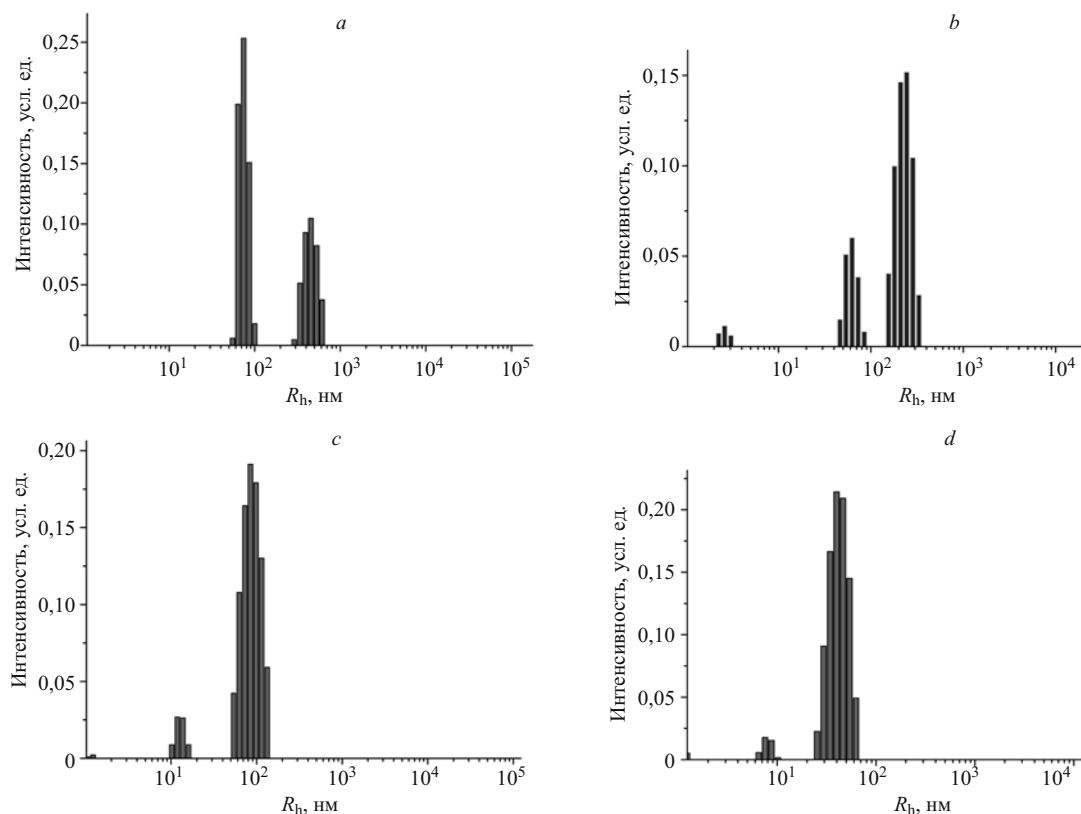


Рис. 2. Результаты ДРС-анализа распределения частиц по размерам в водных суспензиях гибридных комплексов **I-Tc** (a), **I-Dc** (b), **II-Tc** (c) и **II-Dc** (d).

ванной воды, к полученной суспензии добавляют раствор K_2CO_3 (233 мг; 1,69 мМ) в 3 мл дистиллированной воды. Образовавшийся раствор соли **1** фильтруют и фильтрат лиофилизуют. Получают 1330 мг соединения **I**.

Синтез, ЯМР и масс-спектры соединения **II** описаны в работе [7].

В отличие от C_{60} -фуллерена, растворимость его пентазамещенных производных **I** и **II** в водных средах превышала 100 мг/мл.

Гибридные комплексы на основе пентазамещенных производных C_{60} -фуллерена и тетрациклиновых антибиотиков. В колбу Эрленмейера помещают 40 мл раствора **I** или **II** с концентрацией 10 мг/мл. Исследование полученных суспензий методом ДРС свидетельствует о формировании в них небольших частиц с гидродинамическими радиусами 1 – 10 нм, имеющих, по-видимому, мицеллярное строение, а также более крупных кластеров с радиусами 50 – 100 нм, по

результатам ранее проведенных исследований [8, 9] идентифицированных как двухслойные везикулы. В суспензиях анионоидного соединения **I** обнаружены частицы со средними гидродинамическими радиусами 1,3 и 65 нм, в случае катионоидного соединения **II** эти значения составили 2,1 и 91 нм (табл. 1).

К водным суспензиям соединений **I** и **II** прибавляют эквимолярное количество тетрациклинового антибиотика (89 и 124 мг, соответственно), смесь обрабатывают 30 мин ультразвуком с мощностью потока 350 Вт в ванне Bandelin Sonorex (Германия), после чего в течение 8 ч перемешивают при температуре 40 °С.

Полученную суспензию фильтруют через плотный бумажный фильтр (синяя лента) и затем через мем-

Таблица 1
Общая характеристика исследуемых соединений

Производные C_{60} -фуллерена и их гибридные комплексы	Содержание антибиотика по массе, %	Гидродинамический радиус (R_h), нм
I	0	1,3; 65
I-Tc	18	75; 470
I-Dc	18	2,6; 63; 248
II	0	2,1; 91
II-Tc	24	13; 93
II-Dc	24	8; 43

Таблица 2
Противомикробные свойства тетрациклинов и их гибридных комплексов с производными C_{60} -фуллерена*

Антибиотики и их гибридные комплексы	МИК, мкг/мл		IC ₅₀ , мкг/мл	
	<i>E. coli</i> K12 TG1	<i>E. coli</i> JLD271 pAL102	<i>E. coli</i> K12 TG1	<i>E. coli</i> JLD271 pAL102
Tc	0,586	1250	0,107	281,25
Dc	0,293	187,5	0,177	82,50
I	-	-	-	-
II	350	260,94	95	87
I-Tc	1,172	> 5000	0,249	871,88
II-Tc	0,586	39,06	0,116	24,22
I-Dc	1,172	187,5	0,680	80,47
II-Dc	1,172	23,44	0,696	20,29

* При пересчете на массовое содержание антибиотика.

бранный фильтр PES (Китай) (диаметр пор 450 нм), фильтрат лиофилизуют и хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Содержание антибиотика в образцах контролируют по спектрам поглощения, учитывая наличие отдельных неперекрывающихся полос в спектрах производных C₆₀-фуллере-на, Tc и Dc.

Отметим, что использованные образцы Tc и Dc в виде свободных оснований проявляли достаточно низкую растворимость в воде ($\leq 1,7$ мг/мл). Напротив, в присутствии стехиометрического (1:1 моль) количества соединений **I** и **II** данные антибиотики существенно увеличивали свою растворимость, что свидетельствует в пользу сильных взаимодействий их молекул с производными C₆₀-фуллере-на, приводящих к формированию в полярном водном окружении нековалентных гибридных супрамолекулярных комплексов.

Подтверждением этого явилось увеличение гидродинамических радиусов частиц в системах “производное фуллере-на — тетрациклиновый антибиотик” с сохранением их полимодального распределения по размерам (рис. 2).

Содержание антибиотиков в составе гибридных комплексов на основе анионоидного соединения **I** составило 18 масс. %. При этом в гибридных системах на его основе наибольшую интенсивность в распределении приобретали частицы с радиусами 50 – 100 нм. Кроме того, в суспензиях гибридных комплексов **I-Tc** и **I-Dc** зарегистрировано появление еще более крупных кластеров (200 – 600 нм), формирующихся, по-видимому, в результате агрегации нескольких гибридных частиц с меньшими размерами. В системе **I-Dc** обнаружены также небольшие кластеры ($R_h \sim 2,6$ нм), состоящие из нескольких агрегированных молекул производного фуллере-на и антибиотика. В свою очередь, в системах на основе катионоидного соединения **II** содержание антибиотиков составило 24 масс. %. В гибридных системах на его основе преимущественно обнаруживались везикулярные частицы с гидродинамическим радиусом не более 100 нм, на фоне которых сохранившиеся мицеллярные частицы гибридных комплексов **I-Tc** и **I-Dc** увеличивали значения гидродинамического радиуса в 4 – 6 раз относительно использованного для их создания водорастворимого производного C₆₀-фуллере-на (табл. 1)

По нашему мнению, образованные подобным образом гибридные супрамолекулярные комплексы на основе Tc/Dc и производных C₆₀-фуллере-на могут выступать в качестве своеобразных “наноконтейнеров”, доставляющих антибиотик непосредственно к бактериальным клеткам-мишеням.

Экспериментальная биологическая часть

Антибактериальную активность Tc/Dc, соединений **I** и **II** и сформированных на их основе комплексов исследовали методом двукратных серийных разведений в LB-бульоне (Sigma, США) с pH 7,2 – 7,4 в отношении антибиотикочувствительного штамма *E. coli* K12 TG1 и антибиотикорезистентного штамма *E. coli*

JLD271, несущего плазмиду *pAL102* с происходящим из вектора *pSC101* геном устойчивости к тетрациклину Tc^R класса C. Для приготовления исходных разведений готовили навески исследуемых соединений, выровненных по присутствию антибиотика, например, 5 мг Tc, 27,8 мг гибридного комплекса **I-Tc** и 20,8 мг гибридного комплекса **II-Tc**, содержащих 18 и 24 масс. % Tc, соответственно. Исходя из подобного расчета формировали эквивалентные навески использованных для создания гибридных комплексов производных C₆₀-фуллере-на, например, 22,8 мг соединения **I** и 15,8 мг соединения **II**. Каждую навеску суспендировали в 1 мл дистиллированной воды и из приготовленных маточных растворов в лунках стерильных плоскодонных полистироловых планшетов готовили серии двукратных разведений в LB-бульоне в объеме по 300 мкл, в которые вносили по 150 мкл бактериальных суспензий 0,5 ед. мутности по стандарту McFarland. Контролем служили лунки с питательной средой без добавления бактерий (КС — контроль стерильности), а также лунки с питательной средой, инокулированные только бактериальной суспензией (КР — контроль роста). После инкубации при 37 °С в течение 6 ч наличие и интенсивность роста микроорганизмов оценивали с использованием микрострипового фотометра STAT FAX 303 VIS+ (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 600 нм. Значения оптической плотности КС вычитали, после чего определяли МИК как первые наименьшие концентрации анализируемых веществ, вызывающие полное подавление бактериального роста. Исходя из величин оптической плотности КР рассчитывали значения IC₅₀ — концентрации исследуемых соединений и сформированных на их основе гибридных комплексов, вызывающие 50 % ингибирование роста тест-культур. Эксперименты выполнены не менее чем в 3 повторностях и обработаны методами параметрической статистики с использованием пакета программ Statistica V8 (StatSoft Inc., США).

Штамм *E. coli* K12 TG1 демонстрировал исходно высокую чувствительность к использованным антибиотикам: МИК 0,586 и 0,293 мкг/мл; IC₅₀ 0,107 и 0,177 мкг/мл по Tc и Dc соответственно. В свою очередь, присутствие у штамма *E. coli* JLD271 *pAL102* гена Tc^R существенно увеличивало его антибиотикорезистентность, что было наиболее выражено в отношении тетрациклина (> 2000 кратный рост значений МИК и IC₅₀) по сравнению с доксициклином, устойчивость к которому возрастала в 470 – 640 раз.

Анионодное соединение **I** в использованном диапазоне концентраций не проявляло собственной антибактериальной активности, а сформированные на его основе гибридные комплексы с Tc/Dc преимущественно снижали таковую относительно эквивалентных концентраций антибиотика. Наиболее существенно это было выражено в отношении *E. coli* K12 TG1, где подобное уменьшение активности составило 2 раза для комплекса **I-Tc** и 4 раза для **I-Dc**. В свою очередь, *E. coli* JLD271 *pAL102* в использованном диапазоне концентраций демонстрировал практически полную устойчивость к **I-Tc** без статистически значимого из-

менения чувствительности к **I-Dc** (табл. 2). При этом вероятной причиной отсутствия антибактериальной активности у соединения **I** и ее снижение у комплексов **I-Tc** и **I-Dc** являлся эффект электростатического отталкивания анионоидных гибридных мицелл и везикул от одноименно (отрицательно) заряженной поверхности бактериальных клеток-мишеней [10].

Катионоидное соединение **II** проявляло собственное умеренно выраженное антибактериальное действие со статистически сходными величинами МИК и IC_{50} в отношении *E. coli* K12 TG1 и *E. coli* JLD271 *pAL102*. На этом фоне активность сформированного на его основе гибридного комплекса **II-Tc** в отношении антибиотикочувствительного штамма *E. coli* K12 TG1 соответствовала таковой у Tc, а для **II-Dc** несколько уступала эквивалентным количествам Dc (табл. 2). Напротив, в отношении антибиотикорезистентного штамма *E. coli* JLD271 *pAL102* активность гибридных комплексов оказывалась существенно выше, что было более выражено при сопоставлении **II-Tc** с эквивалентными концентрациями Tc (снижение МИК в 32 раза, IC_{50} — в 11,6 раза) и менее — при сравнении **II-Dc** с Dc (снижение МИК в 8 раз, IC_{50} — в 3,4 раза). Итоговый учет активности **II-Tc** и **II-Dc** в отношении *E. coli* JLD271 *pAL102* по алгоритму статистической оценки лекарственных комбинаций с построением соответствующих изоболограмм [11] позволил констатировать существование синергетического эффекта, заключающегося во взаимном усилении антибактериальной активности тетрациклинового антибиотика и соединения **II** при формировании ими гибридных супрамолекулярных комплексов. При этом ключевым условием для этого представляется катионидный характер функционализации C_{60} -фуллерена, обеспечивающего адресное электростатическое взаимодействие сформированных на его основе “наноконтейнеров” с отрицательно заряженной бактериальной поверхностью [10]. В свою очередь, достижение синергетического эффекта именно в отношении антибиотикорезистентного штамма *E. coli* (носителя гена Tc^R) позволяет предполагать более сложный механизм активности катионоидных производных C_{60} -фуллерена, не исчерпывающийся только адресной доставкой

Tc к бактериальным клеткам-мишеням, но включающий последующую блокаду ассоциированных с бактериальными мембранами поровых белков [12], в том числе принимающих участие в эффлюксе доставленных молекул антибиотика.

Предлагаемая интерпретация зависимости противомикробной активности гибридных супрамолекулярных комплексов тетрациклиновых антибиотиков с производными C_{60} -фуллерена от характера их предварительной функционализации полярными аддендами создает основу для дальнейшей направленной структурной модификации подобных соединений с целью преодоления механизмов антибиотикорезистентности бактериальных патогенов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 8, гранта Президента РФ МК-7166.2015.3 (синтез производных фуллерена и супрамолекулярных комплексов) и гранта РФФИ № 15-04-04379 (исследование антибактериальной активности).

ЛИТЕРАТУРА

1. I. Chopra and M. Roberts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**(2), 232 – 260 (2001).
2. M. C. Roberts, *FEMS Microbiol. Lett.*, **245**(2), 195 – 203 (2005).
3. X. Yang, A. Ebrahimi, J. Li, and Q. Cui, *Int. J. Nanomed*, **9**, 77 – 92 (2014).
4. A. A. Taherpour, D. Narian, and A. Taherpour, *J. Nanostruct. Chem.*, **5**(2), 153 – 167 (2015).
5. Yu. I. Prylutskyy, M. P. Evstigneev, I. S. Pashkova, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**(42), 23164 – 23172 (2014).
6. E. A. Khakina, A. A. Yurkova, A. A. Peregudov, et al., *Chem. Commun.*, **48**, 7158 – 7160 (2012).
7. A. B. Kornev, E. A. Khakina, S. I. Troyanov, et al., *Chem. Commun.*, **48**, 5461 – 5463 (2012).
8. A. I. Kotelnikov, A. Yu. Rybkin, and E. A. Khakina, *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 4397 – 4404 (2013).
9. A. G. Bobylev, N. V. Penkov, P. A. Troshin, and S. V. Gudkov, *Biofizika*, **60**, 38 – 43 (2015).
10. D. G. Deryabin, O. K. Davydova, Z. Zh. Yankina, et al., *J. Nanomaterials*, Article ID 907435 (2014).
11. R. J. Tallarida, *Pain*, **49**, 93 – 97 (1992).
12. T. A. Hilder, P. Ridone, Y. Nakayama, et al., *Sci. Reports.*, **4**, Article number: 5609, doi:10.1038 / srep05609 (2014).

Поступила 12.10.15

SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HYBRID SUPRAMOLECULAR COMPLEXES BASED ON TETRACYCLINE/DOXYCYCLINE AND WATER-SOLUBLE C_{60} -FULLERENE DERIVATIVES

A. V. Zhilenkov¹, E. A. Khakina¹, P. A. Troshin^{1,2}, K. S. Inchagova^{3,4}, and D. G. Deryabin³

¹ Institute for Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432, Russia; e-mail: troshin2003@inbox.ru

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Nobel str. 3, Moscow, 143026, Russia.

³ All-Russian Research Institute of Cattle Breeding, 9 January str. 29, Orenburg, 460000, Russia; e-mail: dgderabin@yandex.ru

⁴ Orenburg State University, Pobedy avenue 13, Orenburg, 460018, Russia.

Water-soluble penta-substituted anionic and cationic C_{60} -fullerene derivatives were synthesized in highly selective reactions of chlorofullerene $C_{60}Cl_6$ with captopril and aliphatic amine. Hybrid supramolecular complexes of functionalized C_{60} -fullerene derivatives and tetracycline antibiotics (in stoichiometric 1:1 molar ratio) are formed as polymodal hydrodynamic radius micelles and vesicles in water environment. The complexes consist of antibiotics and cationic C_{60} -fullerene amino-derivative and showed prominent antibacterial activity against tetracycline-resistant *Escherichia coli* strain (carrier of Tc^R gene).

Keywords: tetracycline; C_{60} fullerene; hybrid complex; antibacterial activity.