



Katedra i Zakład Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Jakub Dzitko

Badanie układów: proleków wybranych analogów β -laktamowych z substancjami pomocniczymi pod kątem możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości, przenikalności i aktywności mikrobiologicznej

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: dr hab. n. farm., mgr chem. Judyta Cielecka-Piontek

Poznań – 2019

Słowa kluczowe:

- Piwampicylina,
- Chlorowodorek cefetametu piwoksylu,
- Tebipenem piwoksyl,
- Identyfikacja oddziaływania z substancjami pomocniczymi,
- Szybkość rozpuszczania,
- Trwałość chemiczna,
- Przenikalność
- Aktywność mikrobiologiczna.

*Serdeczne podziękowania składam
Pani dr hab. n. farm. Judycie Cieleckiej-Piontek
za poświęcony czas, życzliwość, cenne wskazówki
oraz nieocenioną pomoc
w prowadzeniu badań i pisaniu pracy doktorskiej.*

Podziękowania składam

*Pani prof. dr hab. Irenie Oszczapowicz
z Zakładu Antybiotyków Modyfikowanych, Instytutu
Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie
za udostępnienie substancji do badań*

SPIS TREŚCI:

1. WSTĘP	1
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	3
2.1. Podział i charakterystyka analogów β -laktamowych	3
2.1.1. Pochodne penamu.....	4
2.1.2. Pochodne cefemu.....	5
2.1.3. Pochodne karbapenemu	6
2.1.4. Monobaktamy	8
2.1.5. Inhibitory β -laktamaz	9
2.2. Trwałość chemiczna pochodnych analogów β -laktamowych jako znaczące ograniczenia dla ich zastosowania.....	10
2.3. Proleki jako prekursory wybranych substancji aktywnych z szczególnym uwzględnieniem proleków analogów β -laktamowych	14
2.3.1. Piwampicylina – ester piwaloilooksymetylowy ampicylin	17
2.3.2. Cefetamet piwoksył – ester piwoksyłowy cefetamet	18
2.3.3. Tebipenem piwoksył – ester piwoksyłowy tebipenemu.....	19
2.4. Dobór składu formułacji farmaceutycznej jako istotny kierunek w badaniach efektywności działania antybiotyków β -laktamowych	19
2.5. Przegląd metod analitycznych stosowanych w badaniach tożsamości i oznaczaniu analogów β -laktamowych.....	23
2.6. Metody oceny wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki.....	25
2.6.1. Metoda krążkowo-dyfuzyjna.....	26
2.6.2. Metoda gradientowa	27
2.6.3. Bioautografia – TLC.....	27
2.6.4. Bioautografia bezpośrednia	27
2.6.5. Bioautografia kontaktowa	28

2.6.6. Bioautografia immersyjna	28
2.6.7. Metody seryjnych rozcieńczeń	28
2.6.8. Metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym	29
2.6.9. Metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu zestalonym agarem.....	30
2.6.10. Test wyznaczania krzywej zabijania w czasie.....	30
2.6.11. Pomiar ATP - metoda bioluminescencji.....	30
2.6.12. Cytometria przepływowa.....	31
3. CEL PRACY	32
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	33
4.1. Materiał do badań	33
4.1.1. Substancje aktywne:	33
4.1.2. Substancje pomocnicze.....	33
4.2. Odczynniki	34
4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy	34
4.4. Metodyka badań	35
4.4.1. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)	35
4.4.2. Badanie efektów wprowadzania proleków do układów proszkowych wybranych substancji pomocniczych.....	36
4.4.3. Szybkość rozpuszczania proleków β -laktamowych w obecności wybranych substancji pomocniczych.....	36
4.4.4. Badania trwałości chemicznej proleków w mieszaninach preformulacyjnych.....	37
4.4.5. Badania przenikalności proleków w układach modelowych z wybranymi substancjami pomocniczymi przez układy sztucznych błon biologicznych	37
4.4.6. Aktywność bakteriobójcza proleków w obecności substancji pomocniczych	38
4.4.7. Badania chromatograficzne (HPLC)	40
4.4.8. Walidacja metod chromatograficznych	42
4.4.9. Walidacja metod HPLC oznaczania proleków β -laktamowych.....	43
4.5. Analiza głównych składowych PCA	43

5. WYNIKI.....	44
5.1.1. Badania tożsamości piwampicyliny w oparciu o zastosowanie spektroskopii w podczerwieni.....	44
5.1.2. Badania szybkości rozpuszczania piwampicyliny po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych.....	47
5.1.3. Stabilność chemiczna piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi	49
5.1.4. Badania przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych	50
5.1.5. Badania aktywności bakteriobójczej piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych.....	50
5.1.6. Analiza głównych składowych piwampicyliny w ocenie zależności zmian parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych.....	52
5.2.1. Badania tożsamości chlorowodoru cefetametu piwoksyli w oparciu o zastosowanie spektroskopii w podczerwieni	53
5.2.2. Badania szybkości rozpuszczania chlorowodoru cefetametu piwoksyli po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych	56
5.2.3. Stabilność chemiczna chlorowodoru cefetametu piwoksyli w mieszaninach z substancjami pomocniczymi	58
5.2.4. Badania przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych cefetametum piwoksyli w mieszaninach preformulacyjnych	59
5.2.5. Badania aktywności bakteriobójczej cefetametum piwoksyli w mieszaninach preformulacyjnych.....	59
5.2.6. Analiza głównych składowych chlorowodoru cefetametum piwoksyli w ocenie zależności zmian parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych	60
5.3.1. Badania tożsamości tebipenemu piwoksyli w oparciu o zastosowanie spektroskopii w podczerwieni.....	61

5.3.2. Badania szybkości rozpuszczania tebipenemu piwoksylu po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych.....	66
5.3.3. Stabilność chemiczna tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi	67
5.3.4. Badania przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych	68
5.3.5. Badania aktywności bakteriobójczej tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych.....	68
5.3.6. Analiza głównych składowych oznaczania zależności zmian fizykochemicznych i mikrobiologicznych po wprowadzeniu do układu preformulacyjnego tebipenemu piwoksylu.	69
6. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników	70
7. Wnioski.....	81
8. Streszczenie	82
9. SUMMARY	85
10. Spis Rysunków	85
11. Spis Tabel	88
12. Spis Wykresów.....	89
13. Piśmiennictwo	90

1. WSTĘP

Antybiotyki β -laktamowe, mimo upływu około 100 lat, nadal są najczęściej stosowanymi chemioterapeutykami, zarówno podczas leczenia w warunkach domowych, ambulatoryjnych i tych zakażeń, które wymagają hospitalizacji [1]. Niestety długi czas i częstość ich stosowania, powoduje znaczą oporność na nie wybranych gatunków drobnoustrojów [2].

Z punktu widzenia aktualnej częstości stosowania, największe znaczenie mają:

- analogi penamu – penicyliny,
- analogi cefemu – cefalosporyny,
- analogi karbapenemu – karbapenemy.

Dla dwóch grup antybiotyków β -laktamowych (cefalosporyn i karbapenemów) odnotowywany jest progres rozwoju kolejnych analogów. Dla przykładu w grupie cefalosporyn w 2016 r. wprowadzono do lecznictwa ceftobiprol – analog cefemu z piątej generacji cefalosporyn [3]. Podczas gdy w roku 2009 wprowadzono do lecznictwa tebipenem piwoksył przedstawiciela karbapenemów. Należy także zaznaczyć, że mimo nowych modyfikacji, wszystkie ze wspomnianych analogów posiadają β -laktamowy pierścień, który jest warunkiem koniecznym do ich działania bakteriobójczego.

Definicja „proleku” (*ang. prodrug*) stanowi, że jest to substancja nieaktywna lub słabo aktywna biologicznie, która po przemianie metabolicznej w warunkach *in vivo* przekształca się w produkt (właściwy lek) bardziej aktywny o ukierunkowanym działaniu farmakologicznym [4]. Pojęcie „prolek” wprowadził w 1958 r. Albert, definiując jego właściwe działanie dopiero w miejscu dotarcia do receptora [5]. Mając na uwadze takie podejście, można za przykład wskazywać najpopularniejszy z proleków - kwas acetylosalicylowy, gdzie acetylacja ugrupowania karboksylowego kwasu salicylowego przyczyniła się do uzyskania właściwości przeciwzapalnych poprzez oddziaływanie z cyklooksygenazą (COX) [6]. Proleki są stosowane w farmakoterapii wielu chorób, zarówno przewlekłych, jak i tych o etiologii zakaźnej. Dla przykładu leczenie nadciśnienia tętniczego - choroby przewlekłej w znacznym stopniu może bazować na zastosowaniu proleków z grupy inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę, takich jak np. enalapryl, chinapryl, ramipryl. Doraźne stosowanie proleków jest odnotowywane w leczeniu także wielu chorób o etiologii zakaźnej. Dla przykładu oseltamiwir czy acyklowir są stosowane jako substancje przeciwwirusowe [7].

Wraz z rozwojem możliwości syntezy powstają proleki dla molekuł, dla których należy mieć na uwadze obok celu końcowego modyfikacji (zmiany rozpuszczalności, smaku itp.) możliwości modyfikacji uwzględniające właściwości fizykochemiczne np. odczyn chemiczny, nietrwałość chemiczną czy nawet rozpuszczalność w rozpuszczalnikach o różnych wartościach pH.

Biorąc pod uwagę znaczne ograniczenia oraz aktualne wyzwania dla rozwoju proleków z grupy β -laktamowych analogów, w dalszej części pracy będzie położony nacisk na modyfikacje analogów β -laktamowych w odniesieniu do ich właściwości preformulacyjnych, jako implikacji ich oddziaływania z wybranymi substancjami pomocniczymi.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Podział i charakterystyka analogów β -laktamowych

Antybiotyki β -laktamowe działają poprzez hamowanie syntezy ściany komórkowej wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Ich bakteriobójcze działanie jest zależne od stężenia chemioterapeutyków oraz czasu ich podania [8]. Sam proces inhibicji wzrostu wybranych szczepów bakteryjnych przez antybiotyki β -laktamowe wynika z ich strukturalnego podobieństwa do dipeptydu D-Ala-D-Ala stanowiącego integralną część ściany komórkowej bakterii. Antybiotyki β -laktamowe łącząc się z PBP (*ang. Penicillin Binding Proteins*) nabywają możliwości wbudowania się jako „fałszywe” elementy budujące ścianę komórkową. Związanie struktury β -laktamu z PBP uniemożliwia wydłużenie łańcucha peptydoglikanu oraz jego usieciowanie. Efektem działania białek PBP związanych z β -laktamami jest deformacja kształtu bakterii, zwiększają ich wrażliwość na ciśnienie osmotyczne, oraz powoduje lizę komórki bakteryjnej [9, 10].

W budowie wszystkich antybiotyków β -laktamowych wyróżniamy:

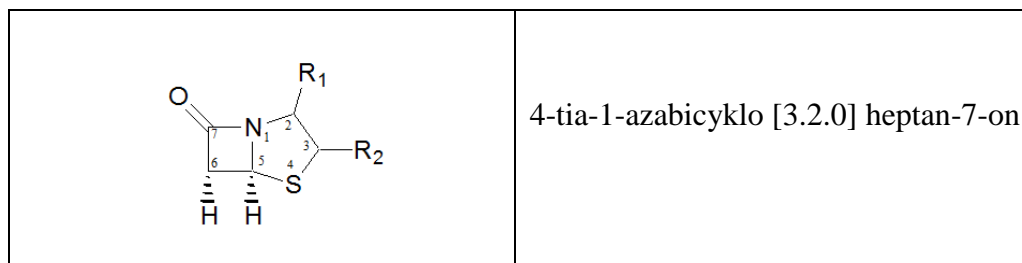
- a) pierścień β -laktamowy – kluczowy dla aktywności bakteriobójczej,
- b) pierścień cykliczny lub heterocykliczny połączony z pierścieniem β -laktamowym – dywersyfikujący mechanizm działania bakteriobójczego oraz odpowiedzialny za naprężenia wewnątrzcząsteczkowe układu w obszarze sprzężonych pierścieni,
- c) podstawniki mające istotne znaczenia dla zróżnicowania spektrum aktywności bakteriobójczej, także w odniesieniu do odporności względem β -laktamaz, przenikalności do ośrodkowego układu nerwowego, pozostałych parametrów farmakokinetycznych i możliwych działań nieporządanych.

Stosowane w leczeniu i diagnostyce mikrobiologicznej najważniejsze grupy analogów β -laktamowych zawierają następujące układy β -laktamowe:

- 4-tia-1-azabicyklo [3.2.0] heptan-7-on, obecny w grupie penicylin,
- 5-tia-1-azabicyklo [4.2.0] okt-2-en-8-on, obecny w grupie cefalosporyn,
- 1-azabicyklo [3.2.0] hept-2-en-7-on, obecny w grupie karbapenemów,
- 1-azacyklobutan-4-on, obecny w grupie monobaktamów,
- 1-azabicyklo [3.2.0] hept-2-en-7-on, obecny w grupie inhibitorów β -laktamaz.

2.1.1. Pochodne penamu

Wszystkie kwasowe pochodne analogów penamu są pochodnymi kwasu 6-aminopenicylanowego (Ryc. 1).



Ryc. 1. Budowa chemiczna układu β -laktamowego pochodnych penamu.

Wprowadzenie podstawników przy C-2, C-3 układu 4-tia-1-azabicyklo [3.2.0] heptan-7-on ma odpowiednio na celu:

- modyfikację siły działania bakteriobójczego,
- zmniejszanie wrażliwości na działanie β -laktamaz,
- zwiększenie lipofilności.

W odniesieniu do zdefiniowanych różnic w budowie chemicznej penicyliny i ich pochodzenia wyróżniamy:

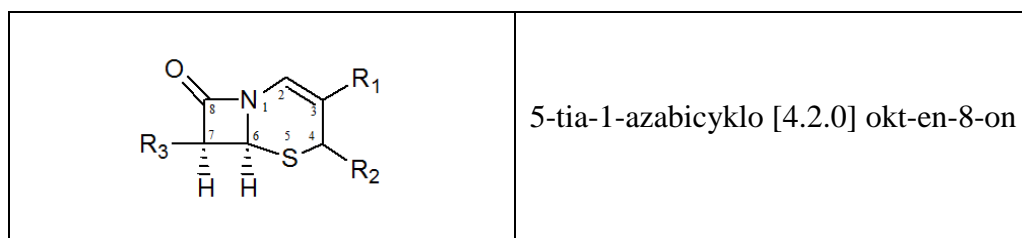
- penicyliny naturalne,
- półsyntetyczne pochodne,
 - izoksazolilowe (np. oksacylina),
 - karbosylowe (np. tykarcylina),
- pochodne aminowe (np. ampicylina),
- pochodne amidynowe (np. mecylinam),
- pochodne ureidynowe (np. azlocylina).

Biorąc pod uwagę rozwój oporności bakteriobójczej wiele analogów z grupy penicylin ma wyłącznie znaczenie diagnostyczne, głównie podczas prowadzenia badań mikrobiologicznych. Na uwagę zasługuje tutaj jednak funkcjonujące połączenie pochodnych aminowych z inhibitorem β -laktamaz (np. połączenia amoksycykliny z kwasem klawulanowym). Połączenie ze związkami bardziej podatnymi na hydrolityczne działanie β -laktamaz bakteryjnych pozwala na uzyskanie zadowalających efektywności leczenia z zastosowaniem znanych pochodnych aminowych analogów penamu.

W kontekście progresu rozwoju proleków penamu należy wskazać trinemy. Trinemy to hybrydy zawierające elementy budowy charakterystyczne dla pochodnych penamu i karbapenemu. Ich pierwszym przedstawicielem jest sanfetrinem oraz jego prolek sanfetrin cyleksetylu [11]. Sanfetrinem jest pierwszym tricyklicznym β -laktamem (trinmem), który można podawać doustnie. Mimo, że jego struktura chemiczna jest związana z karbapenemami ma on odporność na działanie dehydropeptydazy nerkowej oraz jest odporny na działania β -laktamaz bakteryjnych [12]. Aktywność przeciwbakteryjną sanfetrinem cyleksetylu (prolek sanfetrinemu) wykazuje podczas infekcji posocznicy wywołaną przez *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Escherichia coli* oraz w infekcjach dróg oddechowych wywołanych przez *Streptococcus pneumoniae*. Jest skuteczniejszy niż amoksycylina w zmniejszaniu liczby bakterii w zainfekowanych płucach [11].

2.1.2. Pochodne cefemu

Substancją wyjściową do syntezy tej grupy związków jest kwas 7-aminocefalosporanowy. W budowie wszystkich cefalosporyn wyróżniamy pierścień β -laktamowy i dihydrothiazydowy z podwójnym wiązaniem pomiędzy C-2 i C-3 (Ryc. 2).



Ryc. 2. Budowa chemiczna układu β -laktamowego pochodnych cefemu.

Wprowadzenie podstawników przy C-3, C-4 układu 5-tia-1-azabicyklo [4.2.0] okt-en-8-on ma odpowiednio na celu:

- modyfikację aktywności bakteriobójczej i odporności na działanie β -laktamaz,
- modyfikację aktywności bakteriobójczej i farmakologicznej,
- modyfikację przenikalności do ośrodkowego układu nerwowego,
- zwiększanie lipofilności.

W odróżnieniu do pochodnych penamu, budowa chemiczna cefalosporyn nie stanowi kategorii ich podziału na generacje. Aktualnie przyjmuje się jako kryterium podziału na generacje cefalosporyn: oporność na działanie β -laktamazy, aktywność wobec bakterii Gram-

dotatnich i Gram-ujemnych oraz możliwości leczenia zakażeń w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. W odniesieniu do wskazanych kryteriów, wyróżniamy pięć generacji cefalosporyn:

- a) I generację (np. cefaleksyna, cefradyna, cefadroksil),
- b) II generacja (np. cefuroksym),
- c) III generacja (np. cefotaksym),
- d) IV generacja (np. cefepim),
- e) V generacja (np. ceftobiprol).

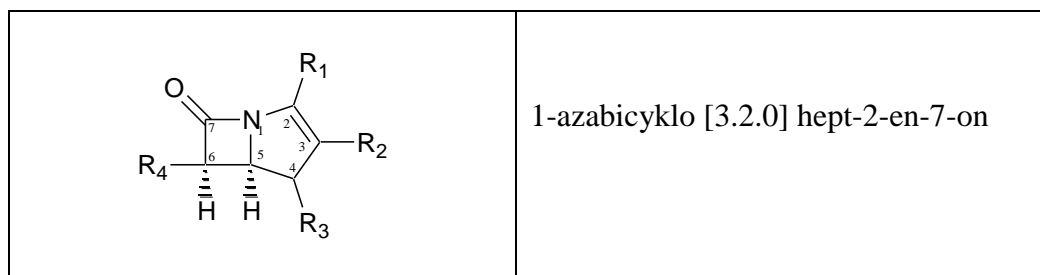
Kolejno rozwijane generacje charakteryzowały się większą odpornością na działanie β -laktamaz, wzrostem siły działania bakteriobójczego względem bakterii Gram-ujemnych, możliwością stosowania w zakażeniach ośrodkowego układu nerwowego wynikającego ze specyfiki działania mikrobiologicznego oraz lipofilnością zapewniającą osiągnięcie efektywnego stężenia w miejscu zakażenia, zwłaszcza ośrodkowego układu nerwowego.

Ostatnie z zarejestrowanych analogów cefemu należą do V generacji. Ceftarolina fosamilu jest oksymino cefalosporyną o działaniu bakteriobójczym w stosunku do gronkowca złocistego. Ma ona działanie przeciw patogenom bakteryjnym układu oddechowego, takim jak *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Ceftarolina nie wykazuje aktywności przeciwko bakteriom Gram-ujemnym o dużej oporności i wykazuje ograniczoną aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*. Stosowana jest przy powikłaniach zakażeń skóry i tkanek miękkich oraz w pozaszpitalnym zapaleniu płuc [13].

Jeden z ostatnich wprowadzonych chemioterapeutyków z V generacji cefalosporyn to – ceftobiprol [14]. Ceftobiprol jest cefalosporyną o szerokim spektrum działania, wykazuje silną aktywność *in vitro* wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich, w tym opornego na metycylinę *Staphylococcus aureus* i opornego na penicylinę *Streptococcus pneumoniae* oraz bakterii Gram-ujemnych związanych ze szpitalnym zapaleniem płuc oraz pozaszpitalnym zapaleniem płuc [14].

2.1.3. Pochodne karbapenemu

Pochodne karbapenemu jak sama nazwa „karba” sugeruje zawierają węgiel, który zastępuje atom siarki. Dodatkowo wprowadzono wiązanie podwójne (penemu) do układu 4-tia-1-azabicyklo [3.2.0] heptan-7-onu w pozycji C-2 i C-3 (Ryc.3).



Ryc. 3. Budowa chemiczna układu β -laktamowego pochodnych penemu.

Wprowadzenie podstawników C-2, C-3, C-4, C-6 do układu 1-azabicyklo [3.2.0] hept-2-en-7-onu ma odpowiednio na celu:

- a) modyfikację właściwości farmakokinetycznych i spektrum działania bakteriobójczego,
- b) modyfikację siły działania bakteriobójczego,
- c) wzrost oporności na działanie β -laktamaz bakteryjnych, odporność na działanie dehydrogenazy,
- d) nabycie odporności na działanie dehydrogenazy nerkowej.

Podobnie jak w przypadku pochodnych penemu, kryterium podziału karbapenemów stanowią różnice w ich budowie chemicznej. W zależności od obecności ugrupowania metylowego (przy C-4) wyróżniamy:

- a) analogi wymagające łączenia z inhibitorami dehydropeptydazy (imipenem, panipenem),
- b) analogi niewymagające łączenia z inhibitorami dehydropeptydazy (ertapenem, meropenem, dorypenem, biapenem, tebipenem pivoxil).

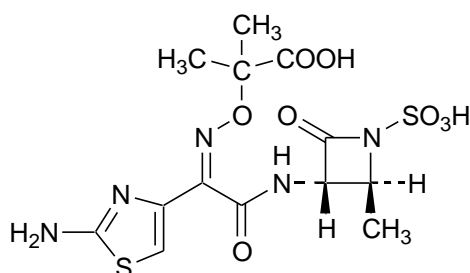
Dorypenem, jako najmłodszy w grupie karbapenemu (o charakterze kwasowym wprowadzony do leczenia w 2007) jest syntetycznym antybiotykiem z grupy analogów karbapenemu, który jest strukturalnie powiązany z antybiotykami β -laktamowymi. Jest on stabilny w obecności beta-laktamazy i jest odporny na inaktywację przez dehydropeptydazy nerkowe. Dorypenem podobnie jak inne karbapenemy hamuje syntezę ściany komórkowej bakterii, poprzez dezaktywację białek wiążących penicylinę ostatecznie powodując śmierć komórki, poprzez zmianę kształtu komórki bakteryjnej w przypadku *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* [15].

Tebipenem pivoksyl jest natomiast pierwszym doustnym antybiotykiem z grupy analogów karbapenemu o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego, włączając aktywności wobec opornego na penicylinę *Streptococcus pneumoniae* i opornego na β -laktamazę szczepu

Haemophilus influenzae. Tebipenem piwoksyl jest prolekiem, który przekształca się w warunkach *in vivo* w tebipenem. Stosowany jest w leczeniu w postaci zawiesiny przeznaczonej do leczenia zakażeń otolaryngologicznych [16].

2.1.4. Monobaktamy

W przypadku monobaktamów mamy do czynienia z odseparowanym pierścieniem β -laktamowym, łączącym się z pozostałymi strukturami cyklicznymi przez układy wiązań alifatycznych. Podstawowym przedstawicielem monobaktamów jest aztreonam.



Ryc. 4. Budowa aztreonamu.

Wprowadzenie podstawników przy C-1, C-2 i C-3 układu 1-azacyklobutan-4-on ma odpowiednio na celu:

- modyfikację działania bakteriobójczego poprzez wpływ na powinowactwo do białek PBP,
- zwiększanie odporności na działanie β -laktamaz,
- modyfikację działania farmakologicznego.

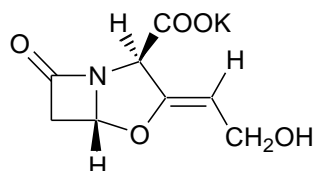
Antybiotyki monobaktamowe są związkami syntetycznymi, chociaż monocykliczne związki prekursorowe β -laktamowe zostały znalezione w przyrodzie jako produkty działania różnych bakterii glebowych [17]. Pierwszym wprowadzonym do leczenia monobaktamem był aztreonam (Ryc. 4). Jego spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest podobne do gentamycyny i tobramycyny. Aztreonam jest selektywnie aktywny wobec Gram-ujemnych bakterii tlenowych i nieaktywny wobec bakterii Gram-dodatnich. Aztreonam jest nieaktywny wobec Gram-dodatnich bakterii tlenowych i beztlenowców, w tym *Bacteroides fragilis*, dlatego też, gdy jest podawany samodzielnie, ma minimalny wpływ na miejscowe beztlenowce kałowe [18]. Aztreonam nie ma działania nefrotoksycznego i nie wpływa na zaburzenia krzepnięcia krwi, można go podawać domięśniowo lub dożylnie, słabo wchłaniany jest po podaniu doustnym. Podstawową drogą jego eliminacji jest mocz. Jest

stosowany w infekcjach dróg moczowych, dolnych dróg oddechowych, infekcje ginekologiczne, posocznicy i infekcjach skórnych [19].

2.1.5. Inhibitory β -laktamaz

Związkami zbliżonymi budową chemiczną do antybiotyków β -laktamowych są inhibitory β -laktamaz. W lecznictwie stosuje się trzy związki: kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam. Inhibitory β -laktamaz są związkami naturalnymi lub syntetycznymi.

Kwas klawulanowy (Ryc. 5) jest związkiem pochodzenia naturalnego o strukturze oksapenamowej. Kwas klawulanowy jest nieodwracalnym inhibitorem β -laktamaz. Połączenie kwasu klawulanowego z amoksycyliną poszerzyło jej zakres działania przeciwbakteryjnego [20].



Ryc. 5. Budowa kwasu klawulanowego.

Sulbaktam stosuje się w połączeniu z ampicyliną. Bardzo silnie działa on przeciw cefalosporynazom. Wykazuje aktywność wobec *Acinetobacter* i *Neisseria*.

Tazobaktam wykazuje szerokie spektrum działania w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Posiada zdolność do hamowania cefalosporynaz, na które nie działają kwas klawulanowy i sulbaktam. Tazobaktam w połączeniu z ceftolozanem przeciwdziała pałeczkom Gram-ujemnym, opornym na wiele leków [21].

Nowsze generacje inhibitorów β -laktamazy, w tym awibaktamu i worbakamu, są oparte na strukturach innych niż β -laktamowe, a ich spektra hamowania bakteriobójczego zostało rozszerzone.

Nową kombinację inhibitorów beta-laktamu i beta-laktamazy tworzy połączenie meropenem-waborbaktam, które łączy antybiotyk karbapenemowy z pierwszym w swojej klasie farmakoforem kwasu boronowego, inhibitorem β -laktamazy seryny, który wykazuje silne działanie hamujące wobec karbapenemaz, szczególnie *Klebsiella pneumoniae* [22].

Aktualnie trwają poszukiwania nowych inhibitorów β -laktamaz w celu zwiększenia skuteczności działania znanych antybiotyków. Przykłady nowych inhibitorów β -laktamazy nad którymi trwają prace i ich specyficzne zastosowanie przedstawiono poniżej:

- OP0595 (RG6080), jest inhibitorem β -laktamazy ogólnego zastosowania przeciwdrobnoustrojowego [23],
- cilastatin + relabactam, ma zastosowanie w zakażeniach układu moczowego, ostrym odmiedniczkowym zapaleniu nerek, szpitalnym zapaleniu płuc, odrespiratorowym bakteryjnym zapaleniu płuc [24],
- varobactam + meropenem, ma zastosowanie w zakażeniach układu moczowego, ostrym odmiedniczkowym zapaleniu nerek, szpitalnym zapaleniu płuc, odrespiratorowym bakteryjnym zapaleniu płuc, gorączce neutropennej, bakteriemii [25],
- aztreonam + avibactam, ma zastosowanie w skomplikowanych zakażeniach w obrębie jamy brzusznej [26],
- ceftarolina + avibactam ma ogólne przeciwdrobnoustrojowe zastosowanie [27],
- zidebactam + cefepim, ma zastosowanie w skomplikowanych zakażeniach układu moczowego, oraz w szpitalnym bakteryjnym zapaleniu płuc [28].

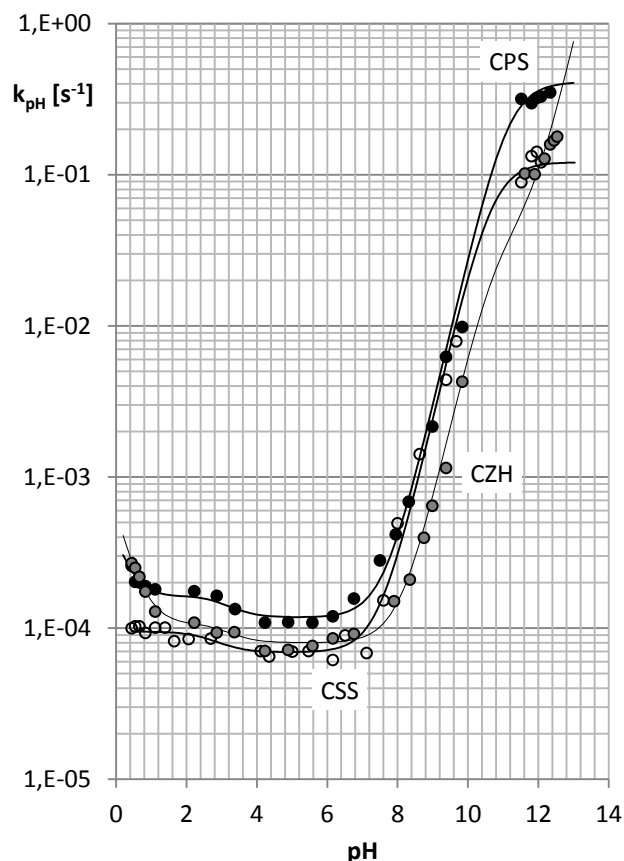
2.2. Trwałość chemiczna pochodnych analogów β -laktamowych jako znaczące ograniczenia dla ich zastosowania

Dotychczasowe wyniki badań trwałości pochodnych analogów β -laktamowych wskazały na złożoność zjawiska ich rozkładu, w aspekcie różnic w kinetyce rozkładu dla różnych stężeń wyjściowych analitu, działających czynników fizykochemicznych i współobecności innych substancji (głównie substancji pomocniczych).

Niestabilność penicyliny w roztworze wodnym była znana od czasu jej odkrycia. Nadmierna kwasowość lub zasadowość środowiska powoduje inaktywację pierścienia penamu w szerokim zakresie pH i w różnych temperaturach. Penamy mają podstawową strukturę bicykliczną. Struktura ta składa się z zamkniętego dipeptydu utworzonego przez kondensację L-cysteiny i D-waliny, co daje w wyniku pierścień β -laktamowy i pierścień tiazolidynowy. Reaktywny charakter układu pierścieni β -laktamowych sprawia, że penamy i związki pokrewne są podatne na różnorodne procesy degradacji. W środowisku kwasowym i temperaturze pokojowej pierścień β -laktamowy jest rekonfigurowany, zaczynając od protonowania azotu β -laktamowego, a następnie nukleofilowego ataku pozostałego karbonylu łańcucha bocznego. Pośredni pierścień oksazolinowy powstaje z nowego imidazolu, a zatem z kwasu penillinowego [29].

Kluczowy wpływ na hydrolizę cefalosporyn w roztworach wodnych odgrywa podstawnik w pozycji 3 układu Δ_2 -cefemu. W zależności od struktury tego podstawnika, cefalosporyny charakteryzują się odpowiednim mechanizmem rozkładu. Pierwszą grupę stanowią pochodne 3-acetoksyłowe, z lub bez reszty α -aminowej w pozycji 7, drugą 3-deacetoksyłowe, a trzecia to cefalosporyny z innym podstawnikiem w pozycji 3 [30]. W pochodnych 3-acetoksyłowych z grupą α -aminową, wiązanie estrowe w pozycji 3 ulega hydrolizie w zakresie pH 2-5. Produktem tej reakcji rozkładu jest pochodna alkoholowa. W pH < 2 powstaje pochodna laktonowa w tym rozkładzie. Pod wpływem jonów wodorowych możliwa jest również laktonizacja pochodnej alkoholowej. Drugą alternatywną drogą rozkładu jest hydroliza pierścienia β -laktamowego. Jej szybkość nie zależy od podstawników w pozycjach 3 i 7 i jest ona zbliżona dla wszystkich 3-acetoksycefalosporyn. Rozpad pierścienia β -laktamowego zachodzi znacznie wolniej niż hydroliza grupy funkcyjnej z pozycji 3. Trzecią ścieżką rozkładu jest hydroliza wiązania amidowego w pozycji 7. Reakcja ta nasila się wraz ze wzrostem pH, a jej gwałtowne przyspieszenie obserwujemy przy pH 7, które odpowiada pK_a grupy α -aminowej.

Szybkość rozkładu w zależności od pH dla pochodnych 3-acetoksyłowych bez reszty α -aminowej w pozycji 7, nie zmienia się w szerokim zakresie pH 3–8. Produktami rozkładów dla tych pochodnych są układy z otwartym pierścieniem β -laktamowym. Przy pH < 5, pochodne 3-deacetoksyłowych z grupą α -aminową w pozycji 7, hydrolizują w kierunku otwarcia pierścienia β -laktamowego. W środowisku zasadowym możliwe jest również przemieszczanie się wiązania podwójnego w cząsteczce. Pochodne posiadające w pozycji 3 podstawnik inny niż acetoksy lub deacetoksyłowy nie są tak łatwo podatne na hydrolizę pierścienia β -laktamowym. Mogą one ulegać izomeryzacji. Kinetyka rozkładu większości pochodnych analogów cefemu czwartej generacji w roztworach wodnych przebiegała zgodnie z modelem reakcji pseudo-pierwszego rzędu względem stężenia substratu, chociaż rozkład w poszczególnych zakresach pH charakteryzował się różną specyfiką. Na rycinie 6 zaprezentowano krzywe kinetyczne, charakteryzujące hydrolizę kwasowo-zasadową trzech cefalosporyn czwartej generacji: siarczanu cefosliny i cefpiromu oraz chlorowodoru cefozopramu [31].



Ryc. 6. Wpływ pH na trwałość CPS, CSS i CZH w roztworach wodnych [31].

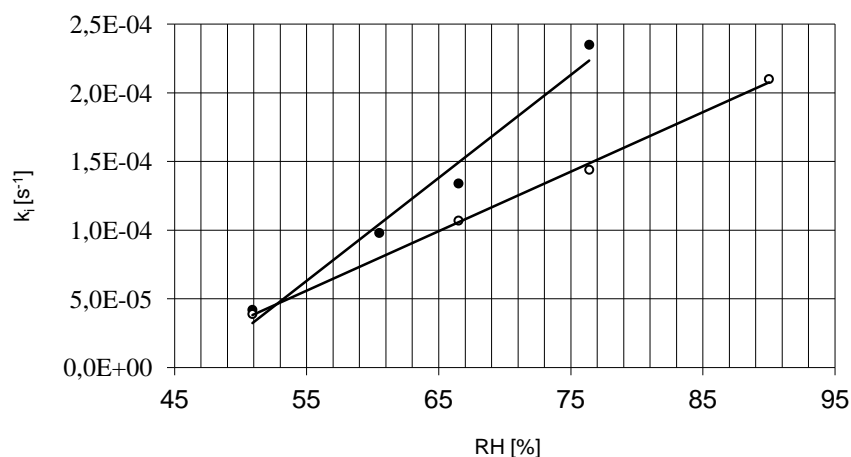
Degradacja analogów cefemu w fazie stałej jest silnie zdeterminowana przez warunki badań przyspieszonego starzenia. Dla przykładu, rozkład cefakloru z grupy cefalosporyn II generacji w suchym powietrzu przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu zależną od stężenia substratu [32]. W warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza (RH), rozkład ten zachodził zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej zależnej od stężenia substratu. Inna cefalosporyna, cefprozil w postaci proszku do sporządzenia zawiesiny doustnej, rozkładał się zgodnie z modelem reakcji odwracalnych (konwersja izomerów E i Z pomiędzy sobą) i równoległych (rozkład każdego z izomerów do jego produktu rozkładu) [33].

Mechanizm rozkładu cefuroksymu aksetylu obok warunków rozkładu, jest determinowany obecnością formy krystalicznej i amorficznej [34]. Cefalosporyny trzeciej generacji ceftazydym [35] i cefodyzym rozkładają się zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu zależną od stężenia substratu, zarówno w suchym powietrzu, jak i w podwyższonej wilgotności względnej powietrza. Przykładowa cefalosporyna czwartej generacji -

dichlorowodorek cefepimu rozkładał się zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu, zarówno w suchym powietrzu, jak i w podwyższonej wilgotności względnej powietrza [36]. Dotychczasowe badania trwałości analogów karbapenemu, pozwalają wskazać jako wiodący mechanizm rozkładu w roztworach wodnych, rozkład zgodny z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu dla wszystkich karbapenemów. Wyjątek to rozkład dorypenemu w fazie stałej, gdzie kinetyczny mechanizm rozkładu przebiega zgodnie z modelem reakcji autokatalitycznej [37, 38, 39]. W rozkładzie ertapenemu i imipenemu występuje ogólna i właściwa kataliza kwasowo-zasadowa. Nie badano wpływu stężenia buforu na szybkość reakcji rozkładu meropenemu. Na właściwą katalizę kwasowo-zasadową ertapenemu, imipenemu, dorypenemu, biapenemu i meropenemu składa się hydroliza katalizowana jonami wodorowymi i wodorotlenowymi oraz spontaniczna reakcja rozkładu pod wpływem cząsteczek wody. Minimum szybkości reakcji, w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, występuje w zakresie pH: ertapenem 5–6, imipenem 6,4. [40].

Z porównania trwałości ertapenemu i meropenemu w fazie stałej, wynikają podane poniżej zależności.

- rozkład zarówno ertapenemu jak i meropenemu w fazie stałej, zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu,
- wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość ertapenemu jest nieco większy niż meropenemu. Wykresy $\ln k_i = f(\text{RH})$ przecinają się w punkcie, odpowiadającym $\text{RH} = 50,7\%$ (Ryc. 7).

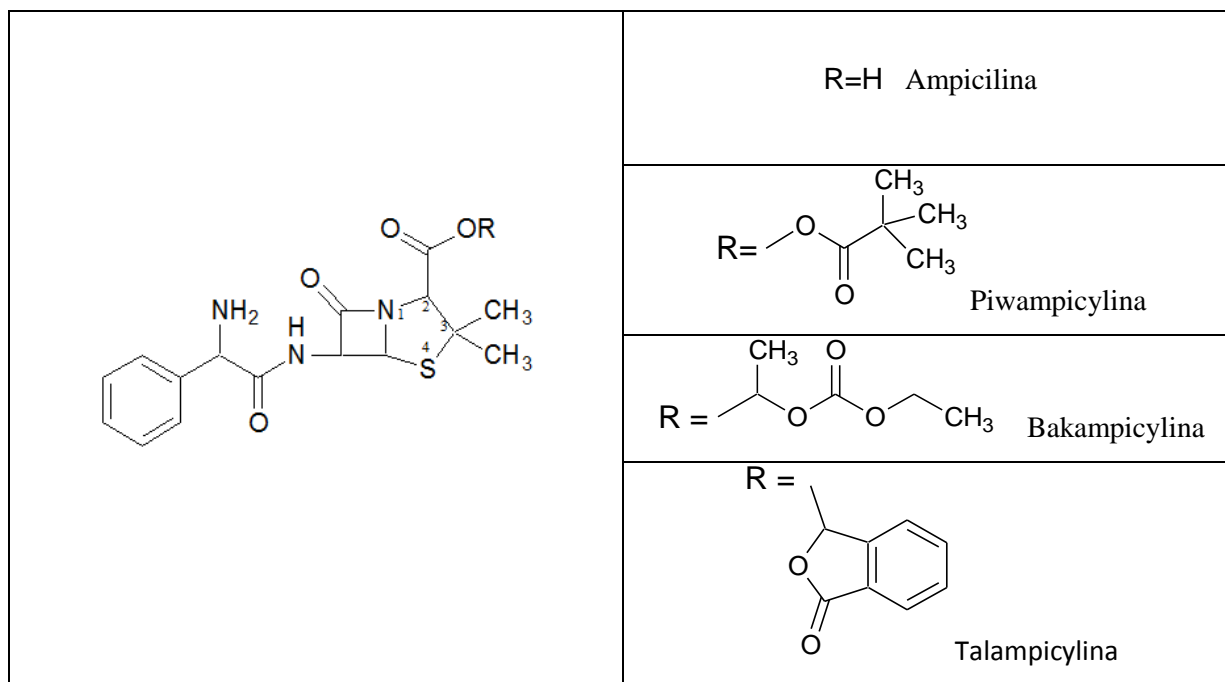


Ryc. 7. Półlogarytmiczne wykresy zależności $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$ reakcji rozkładu ertapenemu (●) i meropenemu (○) w 333K [41].

W atmosferze suchego powietrza, trwałość ertapenemu w zakresie 373K do 393K była dużo większa niż meropenemu. Energia aktywacji reakcji rozkładu ertapenemu w tych warunkach była wyższa niż meropenemu, wykresy zależności $\ln k = f(1/T)$ przecinają się w punkcie, odpowiadającym 324K i poniżej tej temperatury trwałość meropenemu w preparacie MERONEM jest większa niż ertapenemu w preparacie INVANZ [41].

2.3. Proleki jako prekursorzy wybranych substancji aktywnych z szczególnym uwzględnieniem proleków analogów β -laktamowych

Analogi β -laktamowe pod względem chemicznym są kwasami karboksylowymi. Estryfikacja ugrupowania kwasowego przy C-2, prowadzi do powstania odpowiednich proleków nadających inne właściwości fizykochemiczne i biologiczne analogom wyjściowym pochodnym penemu, penamu i cefemu [42]. Na rycinie 8 przedstawiono miejsce estryfikacji prowadzącej do utworzenia proleków dla kolejnych grup analogów β -laktamowych. Jak widać, struktury wprowadzonych reszt estrowych, charakteryzują się różną budową chemiczną. Wybór reszty estrowej podyktowany jest optymalizacją spektrum działania bakteriobójczego oraz ścieżki metabolicznej, w której prolek antybiotyku ulega biotransformacji.



Ryc. 8. Miejsce estryfikacji prowadzącej do utworzenia proleków dla kolejnych grup analogów β -laktamowych.

Celami w otrzymaniu proleków wśród analogów β -laktamowych są wskazania:

- a) modyfikacji specyficznego smaku,
- b) uzyskania lepszej biodostępności,
- c) polepszenia przenikalności przez barierę krew-mózg,
- d) modyfikacji parametrów fizykochemicznych, zwłaszcza poprawy trwałości chemicznej i modyfikacji rozpuszczalności,
- e) modyfikacji aktywności mikrobiologicznej.

Analizując proces rozwoju i wprowadzenia do lecznictwa kolejnych proleków analogów β -laktamowych, należy przeanalizować zmianę właściwości fizykochemicznych z hydrofilowych (charakterystycznych dla formy kwasowej) na bardziej hydrofobowe (obecne dla form estrowych) w kontekście zmiany smaku. Dla wielu postaci estrowych odnotowano mniej gorzki czy specyficzny smak, niż w przypadku wyjściowej postaci kwasowej. Dla przykładu klindamycyna w postaci estru jest mniej gorzka.

Ograniczenie rozpuszczalności w wodzie formy estrowej analogów β -laktamowych wpływa także na wzrost ich biodostępności. Jednak z drugiej strony zmniejszenie rozpuszczalności proleków w wodzie przekłada się na konieczność stosowania odpowiednich substancji pomocniczych, zwłaszcza o właściwościach solubilizujących. Co ma znaczenie na etapie przygotowania doustnych formułacji farmaceutycznych, które są szczególnie rekomendowane w przypadku aktywnych substancji farmaceutycznych o charakterze proleków.

Ze wzrostem lipofilności proleków, można łączyć ich wyższą skuteczność w leczeniu zakażeń ośrodkowego układu nerwowego. Należy oczywiście mieć na uwadze wyjściowy profil aktywności mikrobiologicznej antybiotyku [43]. Dla przykładu cefalosporyny V generacji są wskazane do leczenia zakażeń bakteryjnych układu nerwowego i tak ceftodiprol o szerokim spektrum przeciwbakteryjnym, podawany jest w formie proleku - ceftobiprołu modokarilu [44, 45]. W literaturze przedmiotu, istnieją pełne dokumentacje rejestracyjne wybranych proleków, które pozwalają zestawić parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne proleku i form aktywnych. Dla przykładu zestawiono parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne piwampicyliny i ampicyliny (Tabela 1.).

Tabela 1. Zestawienie parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych wybranych przykładów proleków [46]

	Piwampicylina	Ampicylina
C_{max} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	7,14	3,70
t_{max} [h]	1,50	1,09
$t_{1/2}$ [h]	0,96	1,50
AUC _{0-∞} [$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$]	15,2	10,3
Droga eliminacji	64,7% ± 19,1% wydalane z moczem	44,6% ± 14,8%leku wydalane z moczem

Jak wspomniano wyżej, w przypadku antybiotyków β -laktamowych istotny problem stanowi ich znaczna chemiczna nietrwałość [42]. Należy mieć na uwadze, że pewna nietrwałość chemiczna β -laktamowego pierścienia jest związana z mechanizmem ich działania. W literaturze przedmiotu opisuje się znaczną nietrwałość struktur β -laktamowych w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej, termolizy, utleniania czy podczas procesów biochemicznych jakim podlegają analogi β -laktamowe w warunkach *in vivo* [47, 44]. Podatność na proces hydrolizy w warunkach katalizy kwasowo-zasadowej czy nawet rozkład analogów β -laktamowych w fazie stałej, stanowi znaczne ograniczenia w ich stosowaniu w wybranych postaciach farmaceutycznych. Z racji, że analogi karbapenemów rozkładają się w środowisku kwasowym, istnieje konieczność ich podawania drogą poza żołądkową [48]. Infuzje czy doustne postacie antybiotyków β -laktamowych w formie zawiesin wymagają przygotowania *ex tempore*. Jak wspomniano, obok znacznej nietrwałości chemicznej antybiotyków β -laktamowych w roztworach, znaczna jest też ich nietrwałość w fazie stałej [49]. Powstające produkty w warunkach termolizy odnotowanej podczas prowadzenia badań przyspieszonego rozkładu kolejnych analogów β -laktamowych, są strukturalnie inne niż te powstające w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej [50]. Z punktu widzenia bezpieczeństwa terapii antybiotykami β -laktamowymi, istotne jest wskazanie możliwości tworzenia haptenów i w konsekwencji indukowania reakcji uczuleniowych [51]. W odniesieniu do badanych rozkładów, do tej pory opisano dynamikę rozkładu szeregu analogów β -laktamowych w roztworach wodnych i w fazie stałej.

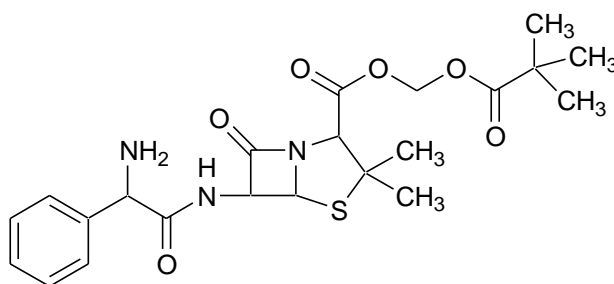
Ważne jest, aby w analizie trwałości chemicznej proleków antybiotyków β -laktamowych, odnosić się do różnic labilności wiązania amidowego w pierścieniu β -laktamowym oraz estrowego wiązania, powstającego przy otrzymywaniu proleku. Oczekiwane jest, że proces hydrolizy wiązania estrowego katalizowany przez esterazy zlokalizowane w ścianie jelita lub na drodze transformacji pierwszego przejścia, był procesem priorytetowym w odniesieniu do hydrolitycznego działania β -laktamaz bakteryjnych czy układów enzymatycznych biorących udział w procesie transformacji metabolicznej leku.

Analiza zmian właściwości proleków powinna uwzględniać także zmiany aktywności mikrobiologicznej form kwasowych i estrowych antybiotyków β -laktamowych.

Odnosząc się do wymienionych wyżej informacji traktujących o kwestiach istotnych dla stosowania ogólnego proleków antybiotyków β -laktamowych, w dalszej części rozdziału odniosę się do charakterystyki tych analogów β -laktamowych o strukturze proleku, które są przedmiotem badań w ramach niniejszej pracy.

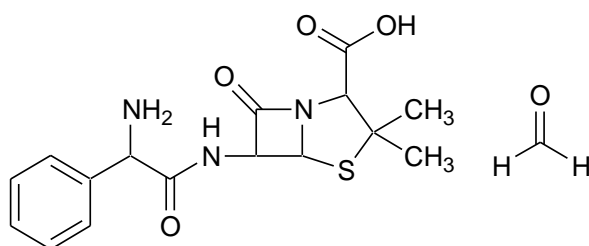
2.3.1. Piwampicylina – ester piwaloilooksymetylowy ampicylin

Ester piwaloilooksymetylowy ampicylin (Ryc. 9). (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-fenylacetylo]amino]-3,3-dimetylo-7-okso-4-tia-1-azabicyklo[3.2.0]heptano-2-karboksylan 2,2-dimetylopropanoiloooksymetylu.



Ryc. 9. Wzór strukturalny piwampicyliny.

Postać aktywna piwampicyliny – ampicylina poprzez podobieństwo strukturalne do alaniny (składnik mureiny) łączy się z transpeptydazą i hamuje syntezę ściany komórkowej bakterii [52]. Piwampicylina wchłania się dobrze z układu pokarmowego. Jej biodostępność wynosi (~90%). W wyniku hydrolizy piwampicyliny pod wpływem esteraz tkankowych powstaje forma aktywna – ampicylina i formaldehyd (Ryc. 10). Piwampicylina może przechodzić w stan jonu obojnego, dlatego względnie dobrze się rozpuszcza w wodzie chociaż ma większą lipofilność niż ampicylina.



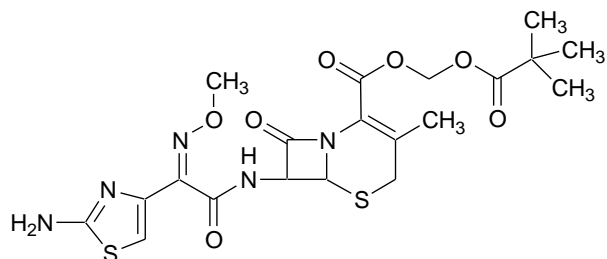
Ryc. 10. Produkty rozkładu piwampicyliny powstające pod wpływem esteraz tkankowych.

Wskazaniem do zastosowania piwampicyliny są:

- ostre i podostre zakażenia dróg moczowych o etiologii *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis*,
- zakażenie dróg oddechowych i żółciowych,
- zakażenia dróg oddechowych indukowane przez *Haemophilus influenzae* i *Enterococcus sp* [46].

2.3.2. Cefetamet piwoksył – ester piwoksyłowy cefetamet

Ester piwoksyłowy cefetamet (Ryc. 11) - 2,2-dimetylpropanoyloxymetyl (6R,7R)-7-[[[(2Z)-2-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetyl]amino]-3-metyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate



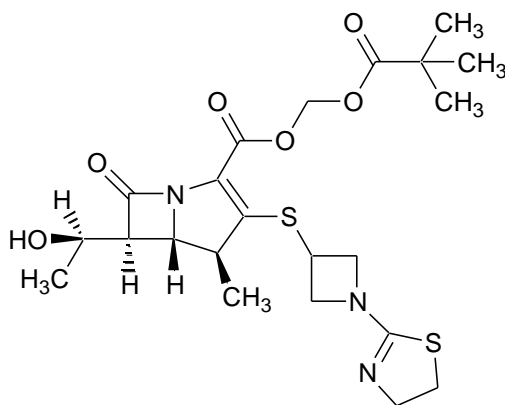
Ryc. 11. Wzór strukturalny cefetamet piwoksyłu.

Cefetamet piwoksył jest doustną cefalosporyną trzeciej generacji. Jako prolek jest aktywowany przez esterazy zlokalizowane w ścianach układu pokarmowego i szybko hydrolizuje do postaci aktywnej - cefetamet. Biodostępność chlorowodoru cefetamet piwoksyłu wynosi około 50% [53]. Cefetamet wykazuje doskonałą aktywność *in vitro* wobec głównych patogenów układu oddechowego: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* oraz paciorkowców beta-hemolitycznych; jest aktywny przeciwko szczepom *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, ale ma słabą aktywność przeciwko *Streptococcus pneumoniae* odpornemu na penicylinę. Cefetamet wykazuje aktywność także przeciwko *Neisseria gonorrhoeae* i ma szerokie spektrum działania przeciwko *Enterobacteriaceae* [54]. Cefetamet piwoksył jest wskazany w leczeniu:

- zakażeń układu oddechowego,
- zapalenia ucha środkowego,
- zakażeń dróg moczowych,
- zapalenia płuc,
- rzeżączki.

2.3.3. Tebipenem piwoksył – ester piwoksyłowy tebipenemu

Ester piwoksyłowy tebipenemu (Ryc. 12)- 2,2-dimetylpropanoyloxymetyl (4R,5S,6S)-3-[1-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl)azetidyn-3-yl]sulfanyl-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-metyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-karboksyłowy



Ryc. 12. Wzór strukturalny tebipenemu piwoksyłu.

Tebipenem piwoksył został opracowywany jako pierwszy na świecie doustny karbapenem do leczenia infekcji otolaryngologicznych spowodowanych lekoopornym *Streptococcus pneumoniae* u pacjentów pediatrycznych [55]. Tebipenem wykazuje silną aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, z wyjątkiem *Pseudomonas aeruginosa* [56]. Tebipenem działa silnie przeciwko *Neisseria gonorrhoeae*, a jego aktywność była porównywalna z cefiksymem, który ma najsilniejszą aktywność wśród doustnych antybiotyków. W odniesieniu do *Enterococcus faecalis* aktywność tebipenemu była porównywalna z aktywnością ampicyliny i amoksycyliny [57].

Wskazaniami do zastosowania tebipenemu piwoksyłu są:

- zapalenie płuc,
- zapalenie ucha środkowego,
- zapalenie zatok u dzieci.

2.4. Dobór składu formułacji farmaceutycznej jako istotny kierunek w badaniach efektywności działania antybiotyków β -laktamowych

Jak wspomniano, dynamika rozwoju poszczególnych grup antybiotyków β -laktamowych jest silnie determinowana przez szybkie pojawianie się opornych szczepów bakteryjnych [58]. Implikuje to wysokie nakłady finansowe na rozwój nowych analogów β -laktamowych do

względnie krótkiego czasu funkcjonowania ich w leczeniu jako efektywnych chemioterapeutyków [59]. Mimo dużego potencjału tej grupy antybiotyków do leczenia wprowadzono tylko kilka nowych antybiotyków β -laktamowych w ostatnich latach (Rozdział 2.1.) [60]. Rozwój nowych postaci farmaceutycznych zawierających pochodne antybiotyków β -laktamowych to kierunek badań i rozwoju bardzo dobrze rozwijany, z efektami w formie wprowadzenia na rynek kolejnych postaci farmaceutycznych antybiotyków. Otrzymywanie efektywnie działających postaci generycznych, jest kierunkiem badań charakteryzujących także modyfikacje aktywnej substancji farmaceutycznej (*ang. API active pharmaceutical ingredients*) z innych grup terapeutycznych.

W świetle istniejącego stanu wiedzy należy jednak poświęcić uwagę znaczeniu badań preformulacyjnych w zwiększeniu efektywności farmakoterapii analogami β -laktamowymi, i w konsekwencji otrzymania bardziej efektywnych i bezpiecznych formułacji farmaceutycznych. Kierunek intensywnych badań w obszarze projektowania nowych postaci leków jest niskokosztowy, a powodzenie osiągnięcia sukcesu jest względnie duże. Mając na uwadze wspomniane już ograniczenia stosowania proleków β -laktamowych, badania preformulacyjne z ich udziałem powinny w szczególności koncentrować się na [61, 62]:

- zwiększaniu rozpuszczalności API,
- zwiększeniu biodostępności API,
- zwiększeniu trwałości chemicznej API,
- pokonywaniu oporności bakteryjnej niezwiązanej z opornością konstytutywną ,
- minimalizowaniu działań niepożądanych ze strony układu pokarmowego, włączając problem maskowania smaku.

Modyfikacja właściwości API w wymienionych wyżej obszarach, jest możliwa dzięki prowadzeniu badań preformulacyjnych z zastosowaniem nowych funkcjonalnych substancji pomocniczych. Szczególny potencjał mają badania preformulacyjne zmierzające do opracowania innowacyjnych układów dostarczania antybiotyków β -laktamowych (*ang. drug delivery*) [63].

Zgodnie z P. Gao [64] aktualne prace preformulacyjne w zakresie opracowania układów dostarczania antybiotyków β -laktamowych można sklasyfikować dwukierunkowo jako:

- modyfikacje API bazujące na połączeniach z materiałami matrycowymi (np. hydroksymetylocelulozą, poliwinylpirolidonem, cyklodekstryną, zeiną) [65, 66],
- modyfikacje API bazujące na zastosowaniu odpowiednich substancji powlekających (np. eudragit, octan celulozy).

Jednym z podstawowych ograniczeń terapii API (w tym proleków), jest słaba rozpuszczalność i w konsekwencji biodostępność. Pośród różnych sposobów zwiększania rozpuszczalności API dwa zasługują na szczególną uwagę: amorfizacja API oraz tworzenie jego połączeń z solubilizatorami. Zniszczenie sieci krystalicznej API i przeprowadzenie próbki leku w stan amorficzności, przyspiesza jej rozpuszczalność [67]. W przypadku substancji amorficznych nie ma konieczności pokonywania progu energetycznego związanego z destrukcją sieci krystalicznej. W konsekwencji amorfizacji API obserwowany jest wzrost szybkości rozpuszczania i w przypadku API z odpowiednich klas BCS lepsza biodostępność.

W leczeniu istnieją także preparaty farmaceutyczne oparte na wykorzystywaniu solubilizującego potencjału wybranych związków. Do często stosowanych solubilizatorów zaliczamy cyklodekstryny [68]. Cyklodekstryny jako cykliczne oligocukry, posiadają hydrofilowe ugrupowania na powierzchni cząsteczki i mogą inkludować API do swojego wnętrza, powodując wzrost ich rozpuszczalności [69]. Opierając się na zależności Higuchi i Connors [70] wyznaczonej w odniesieniu do kinetyki rozpuszczalności API po połączeniu z cyklodekstryną, możliwe jest określenie stechiometrii kompleksu API:cyklodekstryna, warunkującego optymalną modyfikację rozpuszczalności [71]. Dla przykładu β cyklodekstryna okazała się efektywnym solubilizatorem dla cefuroksymu czy cefpodoksymu [72, 73].

Niska rozpuszczalność API może stanowić impuls do opracowania układu dostarczania, zapewniającego sukcesywne uwalnianie API z układu dostarczania i zapewnienie stężenia terapeutycznego API w płynie akceptorowym przez dłuższy czas. Połączenie amoksycyliny i ich β -laktamaz-kwasu klawulanowego z hydroksypropylocelulozą, jest przykładem układu dostarczania API charakteryzującym się kinetyką przedłużonego uwalniania [74]. W odniesieniu do możliwości modyfikacji biodostępności API, wykazano, że cyklodekstryny mogą zwiększać biodostępność substancji klasy drugiej BCS (*ang. Biopharmaceutics Classification System*) [75]. Dla przykładu wykazano, że cefuroksym aksetyl po połączeniu z poliwinylpirolidonem i β -cyklodekstryną lepiej się wchłaniał w porównaniu do samego API. Innym przykładem są połączenia cefuroksymu aksetylu z β -cyklodekstryną [76]. Jako przyczyny wzrostu biodostępności po połączeniu z wybranymi nośnikami leków należy wskazać, możliwości ich oddziaływań z błonami biologicznymi (dokładniej przenośnikami białkowymi) oraz wzrostem rozpuszczalności API, szczególnie istotnym w przypadku biodostępności uwarunkowanej dyfuzją bierną [77].

Kolejnym wyzwaniem w przypadku projektowania badań preformulacyjnych z udziałem analogów β -laktamowych jest zachowanie odpowiedniej trwałości chemicznej. Podatność wiązania β -laktamowego na hydrolizę kwasowo-zasadową stanowi istotny czynnik ograniczający stosowanie doustne antybiotyków β -laktamowych, w kontekście destrukcyjnego działania soku żołądkowego [78]. Na uwagę zasługują połączenia z materiałami mezoporowatymi analogów β -laktamowych. Inkorporowanie analogów β -laktamowych wewnątrz por materiałowy mezoporowaty, może stanowić cenne rozwiązanie w odniesieniu do ich protekcyjnego działania względem soku żołądkowego, jak i modyfikowania uwalniania. W literaturze przedmiotu są opisywane przykłady łączenia antybiotyków z materiałami MCM-41, SBA-15 [79].

Obok rodzaju nośnika (substancji pomocniczej) w pracach preformulacyjnych analogów β -laktamowych ważna jest też jego forma uwodornienia. Szereg badań przyspieszonego rozkładu w warunkach podwyższonej wilgotności względnej potwierdziło możliwość indukowania rozkładu labilnych API lub jego hamowania w efekcie zastosowania uwodornionych czy bezwodnych substancji pomocniczych. Dobrym przykładem jest ertapenem, który z racji znacznej labilności, także w fazie stałej jest łączony tylko z bezwodnym węglanem sodu [80].

Innym przykładem ochronnego działania nośników układów dostarczania jest stosowanie chitosanu [81]. Połączenie bowiem chitosanu z kloxacilliną zwiększa skuteczność antybiotykoterapii. Dodatek chitosanu do kloxacilliny skutecznie zmniejsza stężenie antybiotyków, niezbędne do zwalczania bakterii podczas badań na gronkowcach koagulazujemnych podczas wrzodziejącego zapalenia gruczołu mlekowego u krów [81].

Dobór układu substancji pomocniczych może także modyfikować spektrum działania bakteriobójczego antybiotyków β -laktamowych. Obniżenie wartości MIC (*ang. minimum inhibitory concentration*) po połączeniu antybiotyków β -laktamowych z pochodnymi cyklodekstryny [66] czy poliwinylpirolidonu [65], może być tłumaczone blokowaniem układów porynowych odpowiedzialnych za zjawisko *effluxu* bakteryjnego lub chelatowaniem metali, które stanowią centra aktywne wybranych β -laktamaz [82].

Ostatnim z wymienionych wyzwań dla formulacji zawierających antybiotyki jest redukcja działań niepożądanych. W przypadku terapii antybiotykami β -laktamowymi częstym działaniem niepożądanym jest dysfunkcyjność mikrobiomu jelitowego, wyrażana zaburzeniami somatycznymi, ale także rozwojem szczepów bakteryjnych antybiotykoopornych [83]. W literaturze przedmiotu istnieją doniesienia, o możliwości stosowania substancji prebiotycznych jako substancji pomocniczych dla β -laktamowych

analogów. Dla przykładu cefdinir po połączeniu z β -cyklodekstryną wykazywał wyższą aktywność bakteriobójczą wobec klinicznie istotnych patogenów z grupy antybiotyków Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [62]. Jako przyczynę stymulacji *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* należy wskazać potencjał prebiotyczny α -cyklodekstryny, łączony z dostarczaniem źródła węgla niezbędnym do ich rozwoju. Innym przykładem są badania połączenia inuliny i hydroksypropyl- β -cyklodekstryny z *Lactobacillus* i *Lactococcus* [84].

Jako organoleptyczne ograniczenie, należy wskazać specyficzny smak β -laktamowych antybiotyków. Techniki maskowania smaku, są powszechnym sposobem zminimalizowania gorzkiego lub nieprzyjemnego smaku aktywnych składników farmaceutycznych. Doustne podawanie nieprzyjemnych w smaku leków jest często największą barierą dla pacjentów pediatrycznych i geriatrycznych. Mechanizmy technik maskowania smaku często opierają się na dwóch głównych podejściach: pierwszy polega na dodawaniu substancji słodzących, smakowych w celu maskowania nieprzyjemnego smaku, a drugi polega na unikaniu kontaktu gorzkich lub nieprzyjemnych leków z kubkami smakowymi. W ciągu ostatnich kilku lat dokonano znacznego postępu w zakresie maskowania smaku poprzez zastosowanie nowych strategii i technik, takich jak wyłaczanie na gorąco i mikrokapsułkowanie. Techniki maskowania smaku często jednak opracowywane są dopiero na etapie formulacji [85].

2.5. Przegląd metod analitycznych stosowanych w badaniach tożsamości i oznaczaniu analogów β -laktamowych

Antybiotyki β -laktamowe stosowane w leczeniu są otrzymywane na drodze syntezy biotechnologicznej. Specyfikacja farmakopealna, czy ta dostarczana przez producenta, precyzuje wymagania dotyczące rodzajów i zawartości zanieczyszczeń posyntetycznych i tych pochodzących z rozkładu substancji. W przypadku antybiotyków β -laktamowych liczba substancji pokrewnych często jest długa, a ich struktury są bardzo podobne do substancji wyjściowej. W przypadku większości antybiotyków β -laktamowych metodami z wyboru w badaniach tożsamości i oznaczenia są techniki chromatograficzne. Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC) znalazła zastosowanie w badaniach tożsamości wybranych analogów β -laktamowych. W tabeli 2 zestawiono przykładowe warunki rozdzielania dla wybranych analogów β -laktamowych.

Tabela 2. Warunki rozdzielania techniki cienkowarstwowej chromatografii cieczowej wybranych analogów β -laktamowych

Analog	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Detekcja
Piwampicylina	Żel krzemionkowy silanizowany	octan sodu 272g/L o pH 5,0:woda:etanol 10:40:50	Działanie par jodu, aż do pojawienia się plam, badać w świetle dziennym
Cefetamet piwoksył	Żel krzemionkowy silanizowany	Benzen:metanol:amoniak 30:10:1	254 nm
Amoksycylina	Żel krzemionkowy silanizowany	Aceton:octan amonu 154 g/L o pH 5,0 10:90	Działanie par jodu, aż do pojawienia się plam, badać w świetle dziennym
Bakampicyliny chlorowoderek	Żel krzemionkowy silanizowany	octan sodu 272g/L o pH 5,0:woda:etanol 10:40:50	Roztwór ninhydryny i ogrzanie 60 ° C przez 10 min.

Biorąc pod uwagę konieczność selektywności oznaczeń analitu głównego w obecności substancji pomocniczych, technika chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz (HPLC-DAD) jest stosowana w analizie większości antybiotyków β -laktamowych, także w wybranych postaciach leku. W tabeli 3 zestawiono warunki rozdzielania chromatograficznego wybranych analogów β -laktamowych z grupy penamu, cefemu oraz karbapenemu

Tabela 3. Warunki rozdzielania chromatograficznego HPLC-DAD wybranych analogów β -laktamowych

Analog	Piwampicylina	Cefetamet piwoksył	Tebipenem piwoksył	Amoksycylina
Faza stacjonarna	C18 (100 × 2.1 mm × 2.6 μ m)	C18 (250 × 2.1 mm × 2.6 μ m)	C18 (250 × 2.1 mm × 4.1 μ m)	C18 (250 × 4,6mm × 5 μ m)
Faza ruchoma	Bufor fosforanowy pH 7,0: ACN (30:70 V/V)	Octan amonu (10 mmol/l): MeOH: ACN (33:16;15, V/V/V)	Octan amonu (12 mmol/l): ACN: trietyloamina (68:30;2, V/V/V)	faza ruchoma A: acetonitryl , roztwór buforowy pH 5,0 (1:99 V / V); B: acetonitryl , roztwór buforowy pH 5,0 (20:80 V / V);
Szybkość przepływu	1,0 ml/min	0,8 ml/min	0,8 ml/min	1,0 ml/min
Długość fali detektora	220 nm	254 nm	330 nm	254 nm

Z racji znacznej heterogeniczności próbek β -laktamowych i braku selektywności bezpośredniej w rutynowych badaniach kontroli jakości antybiotyków β -laktamowych, techniki spektrofotometryczne są stosowane rzadziej i raczej jako metody wspomagające. Badania tożsamości analogów β -laktamowych, oparte na analizie widm w nadfiolecie, ograniczają się do wskazania położenia maksimum absorpcji na widmach [37]. Analiza zmian stężenia analogów β -laktamowych bazująca na zastosowaniu zmian absorpcji w

nadfiolecie wymaga potwierdzenia selektywności oznaczenia poprzez wyeliminowanie nakładania się widm substancji głównej i substancji pokrewnych. W literaturze przedmiotu można spotkać rozwiązania bazujące na stosowaniu rozwinięć chemometrycznych [38]. Opisano bowiem przykłady zastosowania pierwszych pochodnych $\frac{dA}{dt}$ jako funkcji zmian stężenia analitów w oznaczaniu wybranych analogów β -laktamowych, co przełożyło się na możliwość oznaczania zmian stężenia wybranych analogów karbapenemów w obecności ich produktów rozkładu np. spektrofotometryczne oznaczenie meropenemu [39].

Uzupełnieniem analizy spektrofotometrycznej może być analiza widm w podczerwieni czy analiza widm rozproszenia Ramana. W szeregu prac naukowych takie podejście zostało zastosowane. Poprzez połączenie widm teoretycznych, możliwe było szczegółowe przypisanie pasm charakterystycznych dla poszczególnych domen cząsteczkowych w badanych analogach antybiotyków β -laktamowych. Dobrym przykładem jest analiza tebipenemu i tebipenemu piwoksyli, oparta na wyznaczeniu pasm charakterystycznych dla struktury kwasowej i estrowej w tak szczegółowy sposób, że możliwe było rozróżnienie tych dwóch molekuł [86]. Z praktycznego punktu widzenia kontroli jakości analogów β -laktamowych takie podejście jest rzadko spotykane.

Rozwój technik obliczeniowych zwłaszcza w zakresie przewidywania oddziaływań analog β -laktamowy-nośnik (ang. drug carrier), w znaczący sposób ułatwił zdefiniowanie i zrozumienie charakteru oddziaływań warunkujących zmiany właściwości fizykochemicznych czy większą biodostępność analogów β -laktamowych, po ich wprowadzeniu do układów dostarczania. Na uwagę zasługuje możliwość zastosowania teoretycznego w przewidywaniu oddziaływań wodorowych układów dostarczania antybiotyków β -laktamowych [87]. Badania teoretyczne często też skupiają się nad wyznaczeniem geometrii związków – analogów β -laktamowych tworzących układ dostarczania. Zastosowanie podejścia *in silico* coraz częściej jest wspierane przez półempiryczne sposoby, co jest spowodowane coraz lepszą dostępnością struktur krystalograficznych dla większej grupy antybiotyków β -laktamowych.

2.6. Metody oceny wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki

Metody oceny wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki, mogą być wykorzystywane w ocenie skuteczności nowych substancji antymikrobiologicznych, epidemiologii i w prognozowaniu efektów leczenia. Wstandaryzowane metody analizy pozwalają na uzyskanie

rzetelnych, powtarzalnych i zbieżnych wyników. Stosowane metody zostały szczegółowo opisane przez CLSI (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute) i EUCAST (ang. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) [88]. Do oceny lub badań *in vitro* aktywności przeciwdrobnoustrojowej antybiotyków można stosować kilka metod. Najbardziej znanymi i podstawowymi testami są metoda krążkowo-dyfuzyjna i metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym. W celu bardziej szczegółowej analizy wpływu antybiotyków na drobnoustroje można, wykorzystać metodę polegającą na wyznaczeniu krzywej zabijania w czasie lub analizę cytometryczną. Te metody pozwalają pozyskać wiedzę na temat charakteru działania hamującego badanej substancji aktywnej, bakteriobójczego lub bakteriostatycznego, zależnego od czasu lub zależnego od stężenia. Z uwagi na fakt pojawiania się nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych w celu zwalczania wielooporności bakterii wydaje się być kluczowe dobre zrozumienie, a w efekcie dopasowanie metody do charakteru prowadzonych prac.

2.6.1. Metoda krążkowo-dyfuzyjna

Metoda krążkowo-dyfuzyjna została opracowana w 1940 roku i jest oficjalnie stosowana w wielu klinicznych laboratoriach do testowania wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki. Obecnie wiele zaakceptowanych i zatwierdzonych standardów dotyczących tej metody jest publikowanych przez CLSI w testowaniu bakterii i drożdży [89]. Zasada metody polega na zaszczerpieniu podłoża stałego standardowym inokulum badanego mikroorganizmu, następnie na powierzchni agaru umieszcza się krążki z bibuły filtracyjnej (o średnicy około 6 mm), nasączone związkami testowymi o określonym stężeniu. Szalki Petriego inkubuje się w odpowiednich warunkach. Substancja przeciwdrobnoustrojowa dyfunduje do agaru i hamuje lub osłabia wzrost testowanego mikroorganizmu. Intensywność działania badanej substancji mierzy się jako średnice strefy inhibicji wzrostu. Metoda kategoryzuje bakterie jako wrażliwe, pośrednie lub odporne [90]. Test krążkowo-dyfuzyjny ma wiele zalet takich jak: prostota wykonania, niski koszt, możliwość przetestowania bardzo dużej liczby mikroorganizmów i środków przeciwdrobnoustrojowych oraz łatwość interpretacji wyników [91]. Warto jednak zauważyć, że hamowanie wzrostu bakterii nie oznacza ich zamierania, dlatego ta metoda nie może rozróżniać efektu bakteriobójczego i bakteriostatycznego. Co więcej, metoda krążkowo-dyfuzyjna nie pozwala na określenie minimalnego stężenia

hamującego (MIC), ponieważ niemożliwe jest określenie objętości środka przeciwbakteryjnego wdyfundowanego w podłoże agarowe.

2.6.2. Metoda gradientowa

Technika polega na naniesieniu na zestalone i zaszczepione drobnoustrojami podłoże paska nasączonego różnymi stężeniami badanego antybiotyku. W metodzie są wykorzystywane paski w postaci tzw. E-testów. Stężenia antybiotyków, którymi nasączone są paski, są skalibrowane z gradientem stężenia antybiotyku wyrażonego na skali w $\mu\text{g/mL}$ po jednej stronie, a po drugiej stronie dwoma predefiniowanymi wzrastającymi wykładniczo czynnikami, z których jeden zawiera stałe stężenie inhibitora. Wykrywanie mechanizmu oporności odbywa się poprzez obserwacje różnic w zahamowaniu strefy wzrostu bakterii po jednej i po drugiej stronie paska. Odczytanie wartości MIC dla poszczególnych antybiotyków jest możliwe po zastosowaniu paska nasączonego jednym antybiotykiem. Paski E-test rozszerzają możliwości diagnostyczne przez wykrywanie fenotypów oporności, umożliwiają zmianę wyników kategorii wrażliwości jeśli nie są zgodne z fenotypem oporności a także umożliwiają dedukcję wyników dla antybiotyków, których nie ma w antybiogramie [92].

2.6.3. Bioautografia – TLC

Metoda łącząca detekcję mikrobiologiczną z chromatografią cienkowarstwową. Bioautografia TLC jest prostą, skuteczną i niedrogą techniką, dlatego może być wykorzystywana zarówno w dobrze jak i słabiej wyposażonych laboratoriach [93]. Stanowi szybką technikę dla badań przesiewowych dużej liczby próbek. Ponadto może być stosowana do wykrywania środków przeciwdrobnoustrojowych w próbkach środowiskowych i żywności, a także w poszukiwaniu nowych leków przeciwdrobnoustrojowych. Do metod bioautografii – TLC zalicza się bioautografię bezpośrednią, bioautografię kontaktową i bioautografię immersyjną.

2.6.4. Bioautografia bezpośrednia

W teście płytka TLC jest zanurzana lub opryskiwana płynem zawierającym określone stężenie drobnoustrojów. Następnie bioautogram inkubuje się w temperaturze 25°C przez 48 godzin. Do wizualizacji wzrostu drobnoustrojów stosuje się sole tetrazoliowe. Sole ulegają

przekształceniu w odpowiedni intensywnie zabarwiony produkt przy udziale enzymów (dehydrogenaz) obecnych w żywych komórkach [94]. Najczęściej wykorzystywany jest fiolet p-jodo-trotetrazoliowy [93]. Sole są natryskiwane na bioautogram, który jest ponownie inkubowany w 25°C przez 24 h lub w 37°C przez 3-4 h

2.6.5. Bioautografia kontaktowa

Analizowany antybiotyk наносzony jest na bibułę lub płytkę TLC, którą następnie umieszcza się na podłożu agarowym. Substancja aktywna dyfunduje w podłoże. Po kilku minutach lub godzinach usuwa się bibułę lub płytkę, a podłoże agarowe jest inkubowane zgodnie z wytycznymi dla danej grupy mikroorganizmów. Technika rzadko stosowana.

2.6.6. Bioautografia immersyjna

Metoda stanowiąca hybrydę obu poprzednich metod. Płytkę TLC pokrywana jest upłynnionym podłożem agarowym. W celu umożliwienia dobrej dyfuzji badanych związków do pożywki agarowej, płytki można umieszczać w niskiej temperaturze przez kilka godzin przed inkubacją. Po inkubacji w odpowiednich warunkach, w celu wizualizacji wyniku stosowany jest barwnik tetrazolowy. Metoda zapewnia dobre zdefiniowanie strefy zahamowania wzrostu i nie jest wrażliwa na zanieczyszczenia [93].

2.6.7. Metody seryjnych rozcieńczeń

Metody oparte na seryjnych rozcieńczeniach są kluczowe w oznaczaniu MIC, ponieważ umożliwiają dokładne oznaczenie stężenia badanego środka przeciwdrobnoustrojowego. Wartość MIC jest definiowana jako najniższe stężenie testowanego antybiotyku, które hamuje wzrost badanego drobnoustroju i jest zwykle wyrażana w mg/ml lub mg/l. Metoda jest dedykowana do badania większości grup drobnoustrojów, w tym także tych o szczególnych wymaganiach [95].

2.6.8. Metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym

Metoda seryjnych mikro- i makro- rozcieńczeń w podłożu płynnym jest jedną z najczęściej stosowanych metod w ocenie wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki. Procedura obejmuje przygotowanie dwukrotnych rozcieńczeń antybiotyku (np. 1, 2, 4, 8, 16 i 32 mg/ml) w płynnym podłożu hodowlanym, w probówkach zawierających minimalną objętość 2 ml (makrorozcieńczenia) lub w mniejszych objętościach przy użyciu 96-dołkowej płytki titracyjnej (mikrorozcieńczenia). Następnie każdą probówkę lub studzienkę zaszczepia się zawiesiną drobnoustrojów, przygotowaną w tej samej pożywce namnażającej, w której przygotowano roztwór substancji aktywnej, a której gęstość optyczna powinna być równa 0,5 w skali McFarlanda. Po dokładnym wymieszaniu, zaszczepione probówki lub 96-dołkowa płytki titracyjnej, inkubuje się (najczęściej bez mieszania) w odpowiednich warunkach w zależności od testowanego mikroorganizmu. Jako MIC uznaje się najniższe stężenie antybiotyku, które całkowicie hamuje wzrost mikroorganizmu [96]. Do wad metody seryjnych makrorozcieńczeń należy zaliczyć duże ilości koniecznych do przygotowania odczynników, konieczność dysponowania dużą przestrzenią roboczą a także duże ryzyko błędów z uwagi na żmudność wykonywanej analizy [97]. Większą powtarzalność, oszczędność odczynników i przestrzeni zapewnia miniaturyzacja testu tj. metoda mikrorozcieńczeń. Jednak warto zaznaczyć, że przy tak niewielkich objętościach kluczowa jest bardzo duża dokładność i wdrożenie systemu badań międzylaboratoryjnych w celu zapewnienia wiarygodności wykonywanych testów [98]. Punktem spornym jest ocena oraz zdolność do rozróżniania wzrostu drobnoustrojów w studzienkach. Opracowano kilka metod kolorymetrycznych opartych na stosowaniu barwników jak sole tetrazoli np. bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT) i 2,3-bis [2-metoksy-4-nitro-5 - [(sulfenylamino) karbonyl] - wodorotlenek 2H-tetrazoliowy (XTT), które ułatwiają wyznaczenie punktu MIC [99].

Należy wskazać, że wielkość inokulum, rodzaj pożywki wzrostowej, czas inkubacji, a także sposób przygotowania inokulum mogą wpływać na wartości MIC [100, 101, 102, 103]. Oznaczanie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) lub minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC), znanego również jako minimalne stężenie letalne (MLC) to kluczowe wskaźniki pozwalające na ocenę aktywności bakteriobójczej lub grzybobójczej. MBC definiuje się jako najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego potrzebne do zabicia 99,9% drobnoustrojów po 24-godzinnej inkubacji [104]. Wskaźnik MFC jest również

definiowany jako najniższe stężenie antybiotyku, które pozwala na dezaktywację 98%-99,9% drobnoustrojów [105].

2.6.9. Metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu zestalonym agarem

Test polega na wylaniu na szalkę podłoża z agarem, które zawiera pożądane stężenie antybiotyku, zwykle uzyskane z wykorzystaniem metody dwukrotnych rozcieńczeń, a następnie inokulacji powierzchni zestalonego podłoża zawiesiną drobnoustrojów. W tym przypadku MIC oznacza się jako najniższe stężenie antybiotyku, który całkowicie hamuje wzrost drobnoustrojów w odpowiednich warunkach inkubacji. Metoda jest zalecana w przypadku drobnoustrojów bardzo wymagających jak beztlenowce czy bakterie z rodzaju *Helicobacter* [106]. Ponadto, liczne testy wykazały dobrą korelację z wynikami uzyskanymi w metodzie E-test, głównie w przypadku bakterii. Porównywalne wyniki do tych uzyskanych metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu stałym, uzyskuje się z wykorzystaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej i metody seryjnych mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym [107].

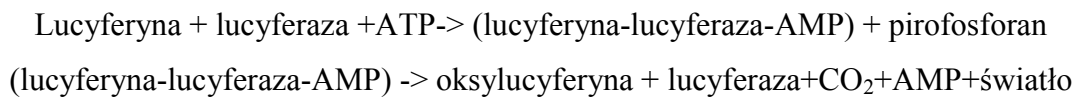
2.6.10. Test wyznaczania krzywej zabijania w czasie

Test pozwala na ocenę siły wpływu antybiotyku na drobnoustroje jak i na uzyskanie informacji na temat dynamizmu oddziaływań między substancją aktywną a mikroorganizmem. Do analizy bakterii test został wystandaryzowany i opisany w dokumencie M26-A CLSI. Metoda polega na przygotowaniu trzech próbek z płynną pożywką namnażającą zawierającą zawiesinę drobnoustrojów o liczebności 5.0×10^5 jtk/mL. Pierwsza i druga próbka zawiera antybiotyk w stężeniach $0,25 \times \text{MIC}$ i $1,0 \times \text{MIC}$, a trzecia stanowi kontrolę wzrostu. Inkubację prowadzi się w odpowiednich dla badanego drobnoustroju warunkach, w różnych przedziałach czasowych (0, 4, 6, 8, 10, 12 i 24 h) [95]. Kolejny etap polega na wykonaniu analizy liczebności żywych drobnoustrojów z wykorzystaniem metody zalewowej. Metoda może być stosowana do określenia synergizmu lub antagonizmu między antybiotykami [95, 92].

2.6.11. Pomiar ATP - metoda bioluminescencji

Metoda obrazowania stanowiąca głównie uzupełnienie dla powyżej opisanych metod, a polega na dokładnym i szybkim oznaczeniu ATP (adenozynotrifosforanu), który znajduje się

w żywych komórkach, zarówno w mikrobiologicznych jak i niemikrobiologicznych. Mikrobiologiczny ATP jest selektywnie ekstrahowany z komórek i oznaczany bioluminestencyjnie zgodnie z reakcją:



Ilość powstających jednostek świetlnych odpowiada ilości ATP w próbce, co z kolei koreluje z liczbą mikroorganizmów w tejże próbce. Pomiar odczytujemy w Relative Light units (RLU). Po sporządzeniu dodatkowych posiewów jednostki RLU można przeliczyć na liczbę komórek, posługując się krzywą kalibracyjną [108].

2.6.12. Cytometria przepływowa

Nowoczesną metodą wykorzystywaną w badaniach nad wpływem antybiotyków na drobnoustroje jest cytometria przepływowa [109, 110]. Metoda pozwala na bardzo szybkie wykrywanie, nie tylko martwych ale nawet jedynie uszkodzonych komórek. Warunkiem powodzenia analizy jest zastosowanie odpowiedniego barwnika. Standardowym barwnikiem wykorzystywanym do znakowania komórek w analizie cytometrycznej jest jodek propidyny (związek interkalujący z DNA). Fluorochrom wnika do uszkodzonej komórki bakterii i wiąże się z jej DNA, a po wzbudzeniu światłem lasera daje sygnał fluorescencji. Metoda cytofluorometryczna pozwala na oznaczenie wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe i ocenę jej wpływu na żywotność i uszkodzenie komórek badanego mikroorganizmu. Pozwala również na uzyskanie powtarzalnych wyników w krótkim czasie (2-6 godzin) w porównaniu do klasycznych metod mikrobiologicznych (24-72 godzin w przypadku metody mikrorozcieńczeń) [111]. Warto zaznaczyć, że cytometria umożliwia rozróżnienie komórek żywych i komórek martwych, niezależnie od ich zdolności do proliferacji jak to jest w tradycyjnych metodach hodowlanych. Podkreślić należy, że brak wzrostu na podłożach hodowlanych, przy zachowaniu aktywności i spójności komórek jest stanem charakteryzującym komórki VBNC (ang. viable but nonculturable), które oznaczyć można tylko za pomocą takich metod jak cytometria. Powszechne stosowanie tej metody w oznaczaniu wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki wydaje się obecnie mało prawdopodobne ze względu na bardzo wysoki koszt sprzętu.

3. CEL PRACY

Celem podjętych przeze mnie badań, była ocena wpływu substancji pomocniczych na wybrane proleki antybiotyków β -laktamowych w zakresie możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej, przenikalności przez sztuczne błony biologiczne i aktywności mikrobiologicznej.

Etapy przeprowadzonych badań obejmowały kolejno:

- badanie tożsamości analizowanych proleków β -laktamowych antybiotyków,
- preparatykę binarnych układów wybranych proleków β -laktamowych antybiotyków z substancjami pomocniczymi o potencjalnych możliwościach modyfikacji właściwości fizykochemicznych, mikrobiologicznych, i ich badania tożsamości,
- oznaczanie stężeń badanych proleków β -laktamowych antybiotyków w binarnych układach z substancjami pomocniczymi,
 - podczas badań szybkości rozpuszczania w odpowiednich płynach akceptorowych,
 - podczas badań trwałości chemicznej w warunkach badań stresowych,
 - podczas badań przenikania przez sztuczne błony biologiczne,
- badanie aktywności mikrobiologicznej analizowanych proleków β -laktamowych antybiotyków w binarnych układach,
- analizę statystyczną otrzymanych wyników metodą PCA.

Do badań wybrano następujące proleki β -laktamowe:

- piwampicylinę,
- chlorowodorek cefetametu piwoksyli,
- tebipenem piwoksyli.

Powyższe badania dostarczą informacji o wpływie połączenia proleków β -laktamowych z substancjami pomocniczymi takimi jak mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna oraz poliwinylpirolidon na zmiany właściwości fizykochemicznych oraz zmiany aktywności przeciwbakteryjnej, w kontekście planowania rozwoju innowacyjnych formułacji farmaceutycznych.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Materiał do badań

4.1.1. Substancje aktywne:

- ampicyliny chlorowodorek estru piwaloilooksymetylowego: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[*(2R)*-2-amino-2-fenylacetylo]amino]-3,3-dimetylo-7-okso-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-karboksylan 2,2-dimetylopropanoilooksymetylu:
 - biały, puszysty proszek,
 - dostawca: Zakład Antybiotyków Modyfikowanych, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Warszawa.
- cefetametę chlorowodorek estru piwaloilooksymetylowego: ((6*R*,7*R*)-7-[[*(2Z)*-2-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)-2-metoksyminoacetyl]amino]-3-metylo-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboksylowy kwas):
 - biały lub prawie biały proszek,
 - dostawca: Zakład Antybiotyków Modyfikowanych, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Warszawa.
- tebipenemu ester piwoksylowy: 2,2-dimetylpropanoyloxymetyl (4*R*,5*S*,6*S*)-3-[1-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl)azetidyn-3-yl]sulfanyl-6-[(1*R*)-1-hydroxyetyl]-4-metylo-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboksylowy:
 - biały, krystaliczny proszek,
 - dostawca: Laboratorium Tanaka Uniwersytet Hokkaido, Sapporo.

4.1.2. Substancje pomocnicze

- Mannitol:
 - biały proszek, dobrze rozpuszczalny w wodzie,
 - dostawca: Merck KGaA (Darmstadt, Niemcy).
- Hydroksypropylometyloceluloza (HPMC):
 - biały lub żółtobiały proszek, rozpuszczalny w wodzie,
 - dostawca: Sigma Aldrich (Saint Louis, USA).
- Skrobia preżelowana:
 - biały proszek, rozpuszczalny w wodzie,
 - dostawca: Colorcon (Harleysville, USA).
- Laktoza jednowodna:

- biały proszek, rozpuszczalny w wodzie,
 - dostawca: DFE Pharma (Goch, Niemcy).
- Poliwinylpirolidon:
- biały proszek, rozpuszczalny w wodzie,
 - dostawca: Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

4.2. Odczynniki

- Acetonitryl, Merck KGaA (Darmstadt, Niemcy),
- Metanol, Merck KGaA (Darmstadt, Niemcy),
- Octan amonu, POCH (Gliwice), cz.d.a., odcz. FP,
- Diwodorofosforan potasu, POCH (Gliwice), cz.d.a., odcz. FP,
- Kwas mrówkowy 98-100%, POCH (Gliwice), cz.d.a., odcz. FP,
- Woda demineralizowana z aparatu do demineralizacji,
- Nadtlenek wodoru, POCH (Gliwice), cz.d.a., odcz. FP,
- Wodorotlenek sodu, POCH (Gliwice), cz.d.a., odcz. FP,
- Kwas solny 0,1 mol/l, POCH (Gliwice), cz.d.a., odcz. FP,
- Chlorek sodu, POCH (Gliwice), cz.d.a.,
- Podłoża mikrobiologiczne: bulion Mueller-Hinton (MHB), agar z hydrolizatem kazeiny i soi (TSA), bulion z hydrolizatem kazeiny i soi (TSB).

4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy

- Spektrometr FTIR Bruker IFS 66v/S:
 - Źródło promieniowania: GLOBAR (pręt z węgla krzemowego),
 - Detektor: DTGS,
 - Interferometr Michelsona z beamsplitterem KBr,
 - Przystawka ART PEKIN ELMER.
- Ultrawysokosprawny chromatogram ciekłowy Dionex UltiMate 3000:
 - Dionex UltiMate 3000 RS Pump,
 - Dionex UltiMate 3000 RS Autosampler,
 - Dionex UltiMate 3000 RS Column Compartment,
 - Dionex UltiMate 3000 RS Diode Array Detector.
- Program komputerowy Dionex Chromeleon Version 7.12.1478
- Ultrawysokosprawny chromatogram ciekłowy Shimadzu Prominence
- Nano Quantity Analyte Detector (NQAD) QT-50

- Aparat do badania uwalniania Agilent Technologies 708 DS. Dissolution Apparatus
- Waga analityczna Sartorius CP 224S-OCE
- Komory do badań cieplnych: KBC 32W, KBC 65W, KBC 125 Wytwórnia Aparatury Medycznej WAMED
- Aparat do demineralizacji wody USF T-801
- pH metr Mettler Toledo Seven Compact pH/Ion S220
- PAMPA (model równoległej przepuszczalności sztucznej membrany), Pion[®], model przewodu pokarmowego (GIT)

4.4. Metodyka badań

Przygotowanie mieszanin do badań preformulacyjnych badanych proleków β -laktamowych z wybranymi substancjami pomocniczymi.

Do przeprowadzenia zaplanowanych badań przygotowano równowagowe mieszaniny (1:1) badanych proleków β -laktamowych z wybranymi substancjami pomocniczymi (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon). Mieszaniny sporządzono przez rozcieranie w moździerzu, w temperaturze pokojowej, bez obecności rozpuszczalników. Otrzymane mieszaniny preformulacyjne przechowywano w atmosferze kontrolowanej wilgotności, w temperaturze pokojowej.

4.4.1. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera została zastosowana do potwierdzenia tożsamości badanych proleków oraz oceny interakcji między nimi a substancjami pomocniczymi w przygotowanych mieszaninach. Widma FT-IR wykonano dla czystych substancji oraz ich mieszanin z wybranymi substancjami pomocniczymi. Tabletki do badań otrzymano poprzez prasowanie z KBr w stosunku 1:100, korzystając z prasy hydraulicznej o nacisku 8 ton. Widma w podczerwieni rejestrowano w zakresie od 400 do 4000 cm^{-1} za pomocą spektrometru FT-IR Bruker Equinox 55 wyposażonego w mikroskop Bruker Hyperion 1000. Celem dokładnej identyfikacji widm proleków oraz definiowania ich oddziaływania z substancjami pomocniczymi, prowadzono obliczenia kwantowo-chemiczne,

w oparciu o DFT. Wszystkie obliczenia zostały zwizualizowane przy użyciu pakietu Gaussian 03.

4.4.2. Badanie efektów wprowadzania proleków do układów proszkowych wybranych substancji pomocniczych

Do badań zmian stężenia proleków podczas badań szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej, przenikalności przez błony biologiczne symulujące model układu pokarmowego (GIT, ang. gastrointestinal tract), opracowano metody chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz i zwalidowano odpowiednie metody HPLC-DAD. Wszystkie metody chromatograficzne zostały zwalidowane zgodnie z wytycznymi ICH [112].

4.4.3. Szybkość rozpuszczania proleków β -laktamowych w obecności wybranych substancji pomocniczych

Szybkość rozpuszczania proleków β -laktamowych w układach modelowych z substancjami pomocniczymi badano stosując aparat łożatkowy (temperatura $310\text{K} \pm 0,5\text{K}$ i prędkość mieszania 50 obrotów na minutę). Proleki w postaci wolnej i ich mieszaniny z substancjami pomocniczymi odważono do kapsulek żelatynowych, następnie umieszczono w sprężynie, aby zapobiec flotacji kapsułki na powierzchni cieczy. Uzyskane próbki umieszczono w 500 ml 0,1 M kwasu solnego (pH 2,1) i buforu fosforanowego (pH 6,8), symulujące środowisko żołądkowo-jelitowe w wybranych odcinkach układu pokarmowego. Rozpuszczone proleki w płynie akceptorowym (5,0 ml) pobierano w określonych odstępach czasu i filtrowano przez filtr membranowy 0,2 μm . Metodę HPLC-DAD zastosowano do pomiaru stężeń badanych antybiotyków w roztworach akceptorowych.

Do porównania profili rozpuszczania zastosowano model zaproponowany przez Moore'a i Flannera, oparty na wyznaczeniu dwóch wartości f_1 i f_2 . Współczynnik różnicy (f_1) mierzy procent błędu między dwiema krzywymi we wszystkich punktach czasowych, f_2 jest logarytmicznym przekształceniem sumy błędów kwadratowych różnic między testowym (T_j), a referencyjnym systemem (R_j) we wszystkich punktach czasowych zgodnie z poniższymi wzorami:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log \left(\left(1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right)^{-\frac{1}{2}} \times 100 \right)$$

gdzie n jest liczbą próbek, R_j i T_j to procent referencyjny (API) i produktu badanego (mieszaniny API i substancji pomocniczych) rozpuszczone w każdym punkcie czasowym. Profile rozpuszczania są podobne, gdy wartość f₁ jest bliska 0, a f₂ jest bliska 100 (wytyczne FDA sugerują, że dwa profile są podobne, jeśli f₂ wynosi od 50 do 100).

4.4.4. Badania trwałości chemicznej proleków w mieszaninach preformulacyjnych

Badania trwałości proleków w układach z wybranymi substancjami pomocniczymi, prowadzono w warunkach podwyższonej wilgotności względnej (76,5%) i podwyższonej temperatury 348K oraz w warunkach niekontrolowanej wilgotności względnej (RH = ambient) i podwyższonej temperatury 363K. W odstępach czasowych, określonych przez szybkość degradacji, fiołki wyjmowano z eksykatorów znajdujących się w komorach badań trwałości i ochłodzono do temperatury pokojowej, ich zawartość rozpuszczono w wybranym rozpuszczalniku i analizowano metodami HPLC-DAD. Podwyższoną wartość wilgotności względnej RH=76,5% uzyskano przez umieszczenie w eksykatorze nasyconego roztworu chlorku sodu.

4.4.5. Badania przenikalności proleków w układach modelowych z wybranymi substancjami pomocniczymi przez układy sztucznych błon biologicznych

Różnice w przenikalności proleków, po ich wprowadzeniu do układów modelowych z wybranymi substancjami pomocniczymi, przez sztuczne błony biologiczne badano stosując model PAMPA (model równoległej przepuszczalności sztucznej membrany), GIT (ang. gastrointestinal tract). Układ składał się z 96-miejscowej płytki mikrofiltru i 96-miejscowej płytki filtracyjnej podzielonej na dwie komory: donorową na dnie i akceptorową na górze, oddzielone płytą mikrofiltru o grubości 120 μm, pokrytą 20% (w/v) roztworem dodekanowej mieszaniny lecytyny (Pion, Inc.). Roztwory proleku i mieszaniny proleku z substancją pomocniczą (0,2 mg/L) w wodzie przygotowano na 96-miejscowej płytce filtracyjnej i dodano do przedziałów donora. Roztwór donora doprowadzono do pH 2,73 i 6,20

(uniwersalny bufor traktowany NaOH). Płytki zestawiono i inkubowano w temperaturze 310 C przez 4 godziny w atmosferze nasyconej wilgocią. Stężenia proleku w postaci wolnej i w mieszaninie z substancjami pomocniczymi określano za pomocą metod HPLC-DAD w płynie donorowym i akceptorowym po 4 godzinach inkubacji.

Współczynnik pozornej przenikalności (P_{app}), definiujący dynamikę przenikania proleków przez błony na drodze dyfuzji biernej obliczono, stosując równanie w następujący sposób:

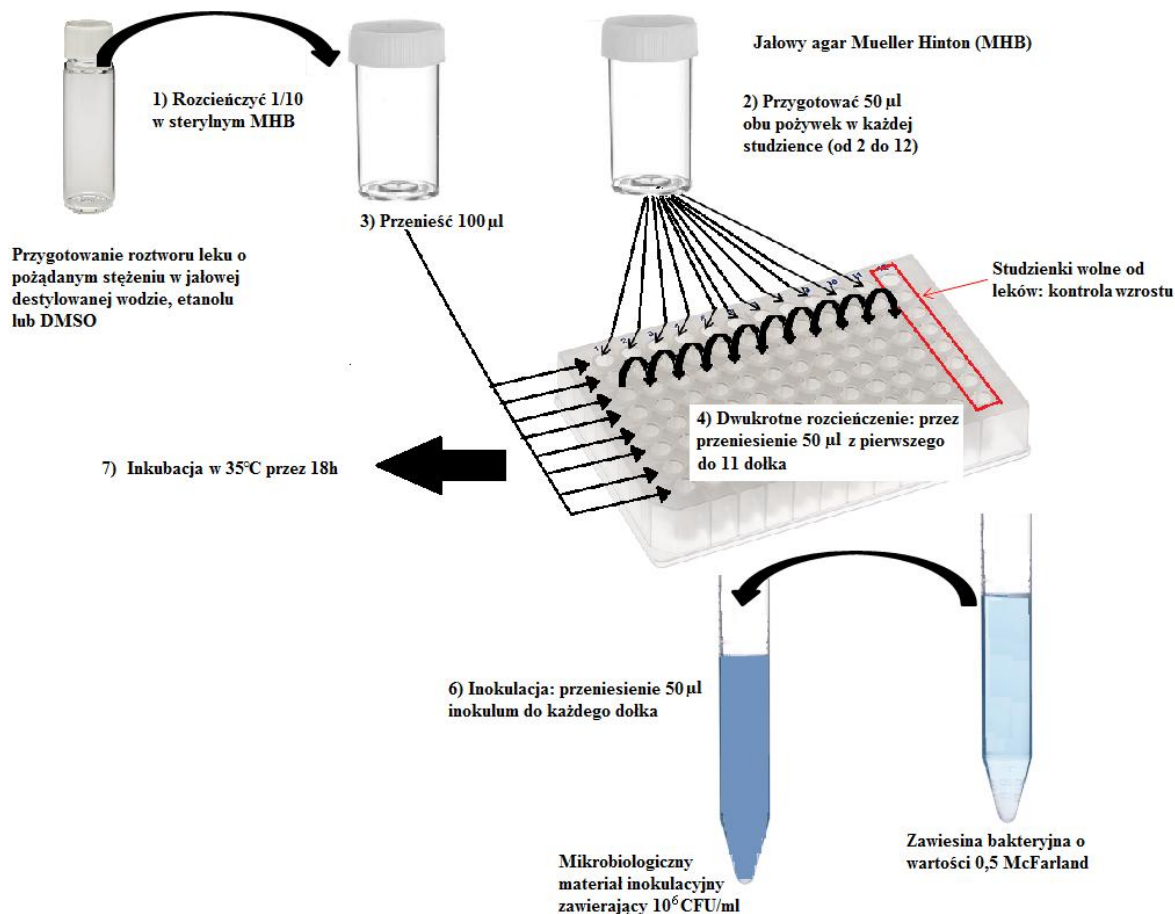
$$P_{app} = \frac{-\ln \left(1 - \frac{C_A}{C_{equilibrium}} \right)}{S \times \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A} \right) \times t}$$

gdzie V_D - objętość donora, V_A - objętość akceptora, $C_{equilibrium}$ stężenie równowagowe, C_D - stężenie donora, C_A - stężenie akceptorowe, S - powierzchnia błony komórkowej, t - czas inkubacji (w sekundach).

Związki o $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s są klasyfikowane jako o niskiej przepuszczalności i te o $P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s jako o wysokiej przepuszczalności [113]. Aby zweryfikować P_{app} , które określono dla przepuszczalności CTZ w postaciach wolnych i skompleksowanych zastosowano test ANOVA.

4.4.6. Aktywność bakteriobójcza proleków w obecności substancji pomocniczych

Aktywność przeciwbakteryjną proleków β -laktamowych w układach z wybranymi substancjami pomocniczymi badano stosując metodę studzienkową. W celu porównania aktywności mikrobiologicznej dla każdego z proleków β -laktamowych oraz ich układów binarnych z substancjami pomocniczymi wykonano oznaczenie minimalnych stężeń hamujących (MIC), czyli najniższych stężeń leku ($\mu\text{g/ml}$), hamujących wzrost bakterii w badaniach *in vitro*, prowadzono zgodnie z procedurą EUCAST (Ryc. 13). Oznaczenie to polegało na obserwacji zmętnienia podłoża (wzrost drobnoustrojów) po określonym czasie.



Ryc. 13. Schemat badania aktywności mikrobiologicznej metodą studzienkową.

Badania aktywności bakteriobójczej proleków prowadzono względem następujących szczepów bakteryjnych:

- *Klebsiella pneumoniae*- ATCC 31488
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Salmonella typhimurium*
- *Enterococcus faecalis*- ATCC 29212
- *Enterobacter hormaechei*
- *Proteus mirabilis*

- *Listeria monocytogenes*
- *Alcaligenes faecalis*

Szczepy bakteryjne obejmowały szczepy referencyjne ATCC i kliniczne wyizolowane przez Instytut Medycyny Laboratoryjnej w Poznaniu.

4.4.7. Badania chromatograficzne (HPLC)

Do oceny zmian stężenia proleków opracowano metody HPLC z detekcją za pomocą matrycy diodowej (DAD) (tabela 4). Opracowane metody HPLC-DAD zostały zwalidowane w odniesieniu do selektywności, liniowości, precyzji, dokładności oznaczeń badanych proleków β -laktamowych. Wyznaczono także limity wykrywalności LOD i oznaczalności LOQ badanych analitów. Opracowano i zwalidowano metodę HPLC z detekcją za pomocą matrycy diodowej (DAD) i detekcją detektora nano-ilościowego (NQAD) do oznaczania chlorowodoru cefetametu piwoksylu w obecności jego produktów degradacji powstałych podczas hydrolizy kwasowo-zasadowej, utleniania, termolizy i fotolizy, mając na uwadze jego znaczną nietrwałość.

Tabela 4. Warunki rozdzielania chromatograficznego oznaczenia wybranych proleków β -laktamowych

Metoda HPLC oznaczenia piwampicyliny
<p>Parametry rozdzielania chromatograficznego</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD, • Kolumna: LiChrospher RP 18 column (5 μm, 250 \times 4 mm), • Faza ruchoma: Bufor fosforanowy pH 7,0 : acetonitryl (30:70 V:V), • Szybkość przepływu: 1,0 ml/min, • Długość fali detektora: 220 nm, • Objętość nastrzyku: 10 μl, • Temperatura kolumny: 30°C.
Metoda HPLC oznaczenia cefetamet u piwoksylu
<p>Parametry rozdzielania chromatograficznego:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD oraz detektorem NQAD • Kolumna: Kinetex C-18 column (5 μm, 100 \times 2,1 mm), • Faza ruchoma: Octan amonu 10 mmol/L : metanol : acetonitryl (33:16:51 v/v/v), • Szybkość przepływu 0,8 ml/min, • Długość fali detektora: 254 nm, • Objętość natrzyku: 10 μl, • Temperatura kolumny: 30°C.
Metoda HPLC oznaczenia tebipenemu piwoksylu
<p>Parametry rozdzielania chromatograficznego:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD, • Kolumna: Lichrosphere C-18 column (4,1 μm, 250 \times 2,1 mm), • Faza ruchoma: Octan amonu 12 mmol/l : acetonitryl : trietyloamina (68:30:2 v/v/v), • Szybkość przepływu 0,8 ml/min, • Długość fali detektora: 330 nm, • Objętość natrzyku: 10 μl.

4.4.8. Walidacja metod chromatograficznych

Zastosowane w badaniach metody HPLC dla piwampicyliny i cefetametum piwoksylu, tebipenemu piwoksylu zostały zwalidowane zgodnie z wytycznymi ICH [112].

Przeprowadzono ich walidację w zakresie:

- selektywności,
- liniowości,
- precyzji pośredniej i bezpośredniej,
- dokładności,
- limitów wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ).

Tabela 5. Walidacja metod chromatograficznych do oceny zawartości piwampicyliny, cefetametum piwoksylu i tebipenemu piwoksylu

Metoda HPLC oznaczenia piwampicyliny	Metoda HPLC oznaczenia chlorowodorku cefetametum piwoksylu	Metoda HPLC oznaczenia chlorowodorku tebipenemu piwoksylu
Selektywność		
W celu określenia selektywności opracowanych metod chromatograficznych, przygotowano próbki proleków oraz substancji pomocniczych przed i po przeprowadzeniu badań przyspieszonego starzenia.		
Liniowość		
Zależności $P_i=f(c)$ dla badanych proleków β -laktamowych wyznaczono w wodzie. Przygotowano po 12 roztworów o stężeniu od 0,01 mg/ml do 0,24 mg/ml. Na kolumnę wprowadzono po 5 μ l każdego z roztworów i zarejestrowano chromatogramy. Każdy nastrzyk powtarzano trzykrotnie. Wykonano wykres $P_i=f(c)$ gdzie: P_i – pole powierzchni pików, c – stężenie [mg/ml]		
Precyzja		
Celem określenia precyzji bezpośredniej opracowanych oznaczeń wykonano po 6 oznaczeń roztworów badanych proleków β -laktamowych o stężeniach: 0,16 mg/ml; 0,20 mg/ml; 0,24 mg/ml co odpowiada 80, 100, 120% stężenia nominalnego piwampicyliny, cefetametum piwoksylu, tebipenemu piwoksylu.		
Dokładność		
Dokładność opracowanych metod analitycznych została określona na trzech poziomach stężeń: 0,16 mg/ml; 0,20 mg/ml; 0,24 mg/ml, co odpowiada 80, 100 i 120% stężenia nominalnego badanych antybiotyków β -laktamowych w trakcie badań trwałości. W tym celu dokonano oceny odzysku piwampicyliny, cefetametum piwoksylu i tebipenemu piwoksylu. Wykonano po 3 oznaczeń dla każdego stężenia.		
Granica wykrywalności i oznaczalności		
Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) dla piwampicyliny, cefetametum piwoksylu, tebipenemu piwoksylu obliczono z następujących wzorów: $DL = 3,3 \cdot S_y/a$ $QL = 10 \cdot S_y/a$ gdzie: S_y – odchylenie standardowe, a – nachylenie krzywej kalibracji		

4.4.9. Walidacja metod HPLC oznaczania proleków β -laktamowych

W tabeli 6. zestawiono walidowane parametry dla opracowanych metod HPLC oznaczania badanych analogów β -laktamowych.

Tabela 6. Wyniki dla walidowanych parametrów proleków β -laktamowych

Walidacja oznaczenia piwampicyliny
Krzywa kalibracyjna liniowa od 0,10 do 0,30 mg/ml
Współczynnik korelacji R^2 0,9981
Względne odchylenie standardowe od 0,3 do 1,3%
Średni odzysk 100,2%
LOD 0,003 mg/ml, LOQ 0,01 mg/ml
Walidacja oznaczenia cefetamet u piwoksyli
Krzywa kalibracyjna liniowa od 0,10 do 0,30 mg/ml
Współczynnik korelacji R^2 0,9997
Względne odchylenie standardowe od 0,2 do 2,0%
Średni odzysk 98,6%
LOD 0,004 mg/ml, LOQ 0,01 mg/ml
Wyniki dla detektora NQUAD
Krzywa kalibracyjna liniowa od 0,10 do 0,30 mg/ml
Współczynnik korelacji R^2 0,9946
Względne odchylenie standardowe od 2,1 do 2,4%
Średni odzysk 101,2%
LOD 0,004 mg/ml, LOQ 0,01 mg/ml

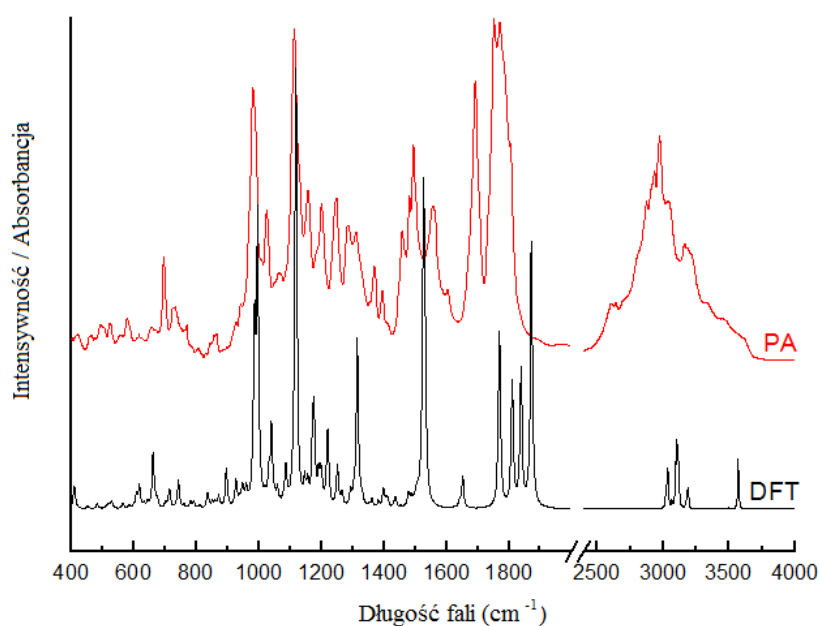
4.5. Analiza głównych składowych PCA

Analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis – PCA) została wykorzystana jako metoda analizy statystycznej heterogenicznych wyników uzyskanych w badaniach spektroskopowych, profilu rozpuszczania, przepuszczalności w modelu PAMPA i minimalnego stężenia hamującego (MIC). Uzyskane wartości, różniące się jednostkami i wartością oczekiwaną, zostały znormalizowane poprzez liniowe skalowanie do zerowej średniej i odchylenia standardowego równego jedności. Przeskalowane dane posiadały 49 wymiarów i zostały rzutowane na hiperpłaszczyznę o trzech wymiarach odpowiadających głównym składowym, wyjaśniając tym samym 93% wariancji zawartej w zbiorze danych. Na podstawie przeprowadzonej analizy określono związki pomiędzy zmiennymi, kierując się dystansem euklidesowym pomiędzy wektorami określającymi wkład danej zmiennej w tworzenie składowych.

5. WYNIKI

5.1.1. Badania tożsamości piwampicyliny w oparciu o zastosowanie spektroskopii w podczerwieni

Badania spektroskopowe w podczerwieni (FT-IR) wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.4.1. Identyfikację widm charakterystycznych dla piwampicyliny prowadzono w oparciu o porównanie z widmem teoretycznym wyznaczonym podczas obliczeń kwantowo-chemicznych, gdzie zdefiniowano położenie, rodzaj i intensywność pasm charakterystycznych dla piwampicyliny. W tabeli 7 zestawiono charakterystyczne pasma teoretyczne oraz eksperymentalne, istotne dla potwierdzenia tożsamości piwampicyliny. Natomiast rycina 14 prezentuje widma FT-IR piwampicyliny eksperymentalne i teoretyczne.



Ryc.14. Widmo FT-IR piwampicyliny eksperymentalne i teoretyczne.

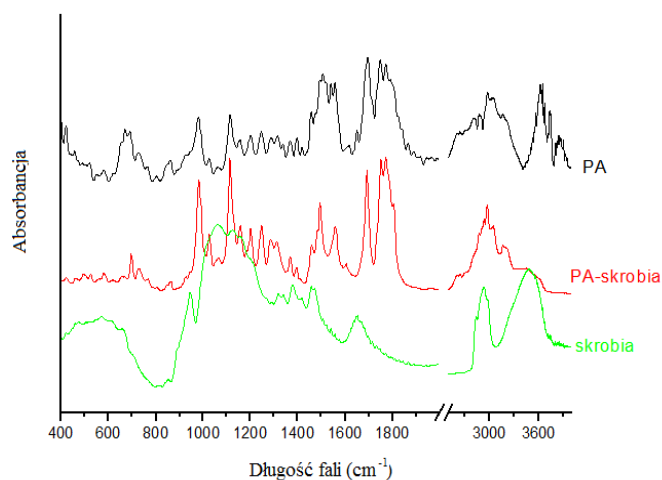
Analizę widm FT-IR układów preformulacyjnych przeprowadzono w odniesieniu do zmian w widmie piwampicyliny po jej wprowadzeniu do układów z wybranymi substancjami pomocniczymi. Jako referencyjne przyjęto widma izolowanych cząstek piwampicyliny oraz wybranej substancji pomocniczej.

Tabela 7. Wybrane charakterystyczne pasma dla piwampicyliny

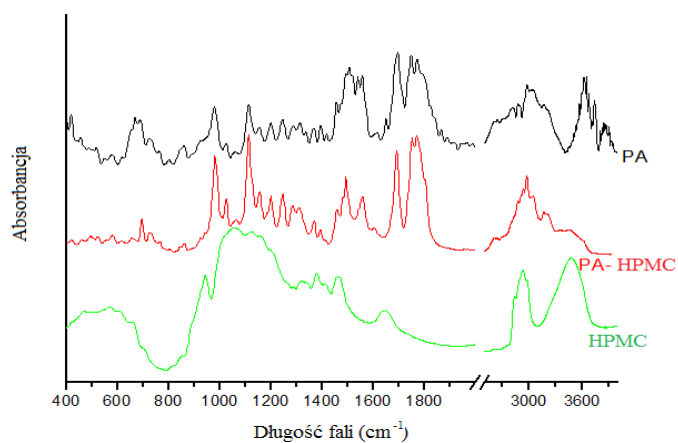
Położenie pasm			Przybliżony opis pasm
Eksperymentalne		Teoretyczne	
IR[cm ⁻¹]	Raman [cm ⁻¹]	[cm ⁻¹]	
		483	Def. całej cząsteczki
		529	Def. pierścienia ampicyliny
	587	587	C-S <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny
659		662	N-H <i>b op</i> w grupie amidynowej
	675	672	C-C <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny + def. pierścienia ampicyliny i grupy piwoksylowej
730		743	C-H <i>b op</i> w pierścieniu fenylowym + N-C=O <i>b op</i> w grupie aminowej
	791	791	Def. pierścienia fenylowego i aminy i grupie amidynowej
	844	853	C-C <i>s</i> i w pierścieniu ampicyliny + def. pierścienia
926		927	C-C <i>s</i> pomiędzy pierścieniem ampicyliny a w grupie piwoksylowej
981		996	C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej + C-N-C <i>b</i> w grupie amidynowej + C-H <i>b</i>
	1002	1009	C-C <i>s</i> w pierścieniu fenylowym
1025		1040	C-C <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny + C-O <i>s</i> w piwoksylu + C-H <i>b</i> w pierścieniu ampicyliny i w grupie piwoksylowej
	1030	1050	C-C <i>s</i> w pierścieniu fenylowym
1065		1086	C-N <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny + C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej
1113		1118	C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej
1158	1161	1175	C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej + O=C-O <i>sc</i> w grupie piwoksylowej + C-H <i>b</i> w pierścieniu ampicyliny i w grupie piwoksylowej
1201	1192	1218	C-C <i>s</i> i C-S <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny + C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej + C-H <i>b</i>
1247	1249	1253	N-H <i>b</i> w grupie amidynowej + C-N <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny
1283		1293	C-C <i>s</i> w grupie piwoksylowej
	1305	1305	C-H <i>b</i> w pierścieniu ampicyliny + C-N <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny
1312		1315	C-N <i>s</i> w pierścieniu ampicyliny + C-H <i>b</i> w pierścieniu ampicyliny
1371		1362	C-H <i>b</i> w pierścieniu ampicyliny
1396	1394	1398	C-H <i>b</i> w pierścieniu ampicyliny
1459	1452	1479	CH ₂ <i>sc</i> w grupie piwoksylowej
1496	1507	1527	N-H <i>b</i> w grupie amidynowej + C-N <i>s</i> w grupie amidynowej + C-H <i>b</i> w pierścieniu fenylowym i w grupie piwoksylowej
1558	1562	1624	C=C <i>s</i> i C-C <i>s</i> w pierścieniu fenylowym
1586	1586	1642	C=C i C-C w pierścieniu fenylowym
1603	1607	1652	N-H <i>sc</i> w grupie aminowej
1697	1697	1769	C=O <i>s</i> w grupie amidynowej
1751	1755	1810	C=O <i>s</i> i w grupie piwoksylowej blisko grupy 3CH ₃
1774	1779	1838	C=O <i>s</i> w grupie piwoksylowej
1806	1808	1872	C=O <i>s</i> w pierścieniu β-laktamowym

s-rozciągające, *b*-zginające, *r*-wahadłowe, *w*-wachlarzowe, *sc*-nożycowe, *ip*- w płaszczyźnie, *op*-poza płaszczyzną.

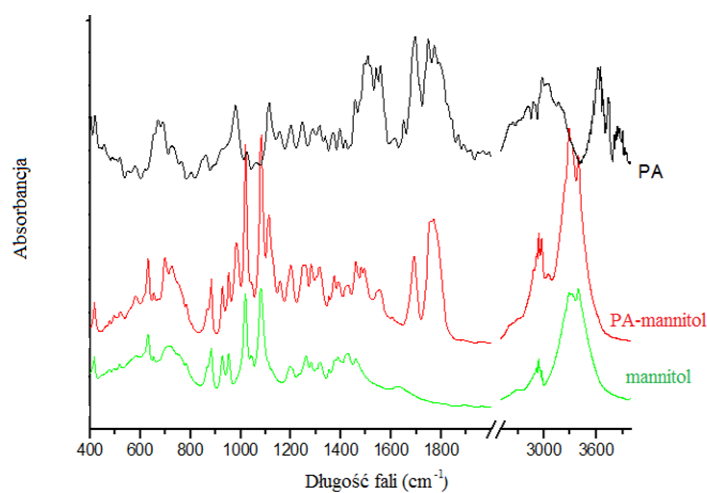
Na rycinach 15-19 zestawiono widma poszczególnych mieszanin piwampicyliny z substancjami pomocniczymi w postaci izolowanej oraz po sporządzeniu mieszanin preformulacyjnych.



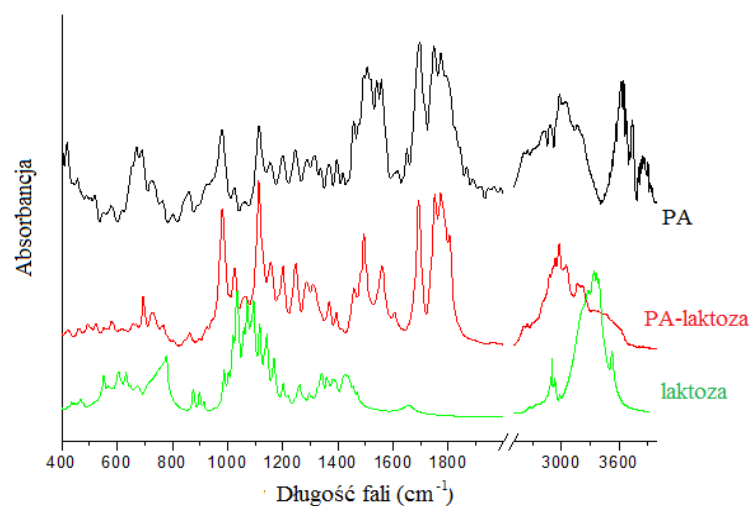
Ryc. 15. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie ze skrobią.



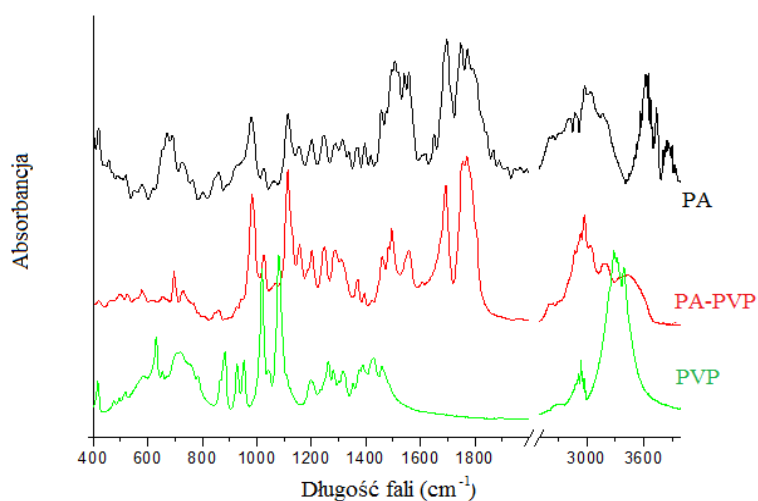
Ryc. 16. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z HPMC.



Ryc. 17. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z mannitolem.



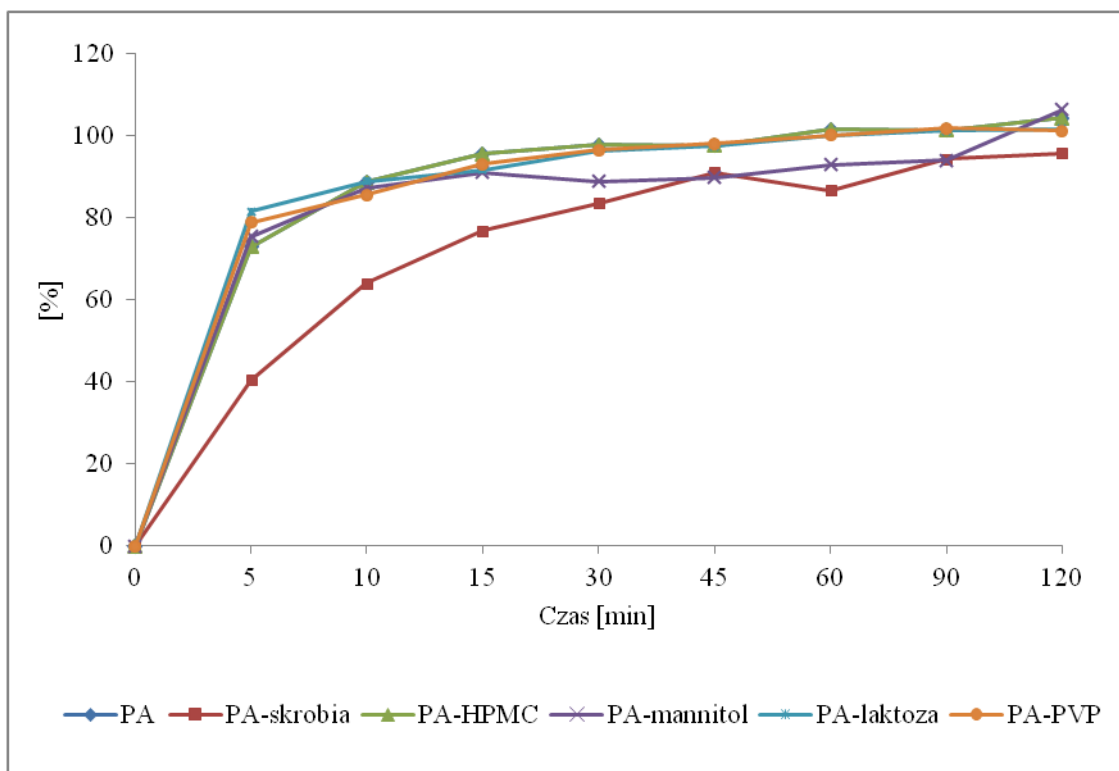
Ryc. 18. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z laktozą.



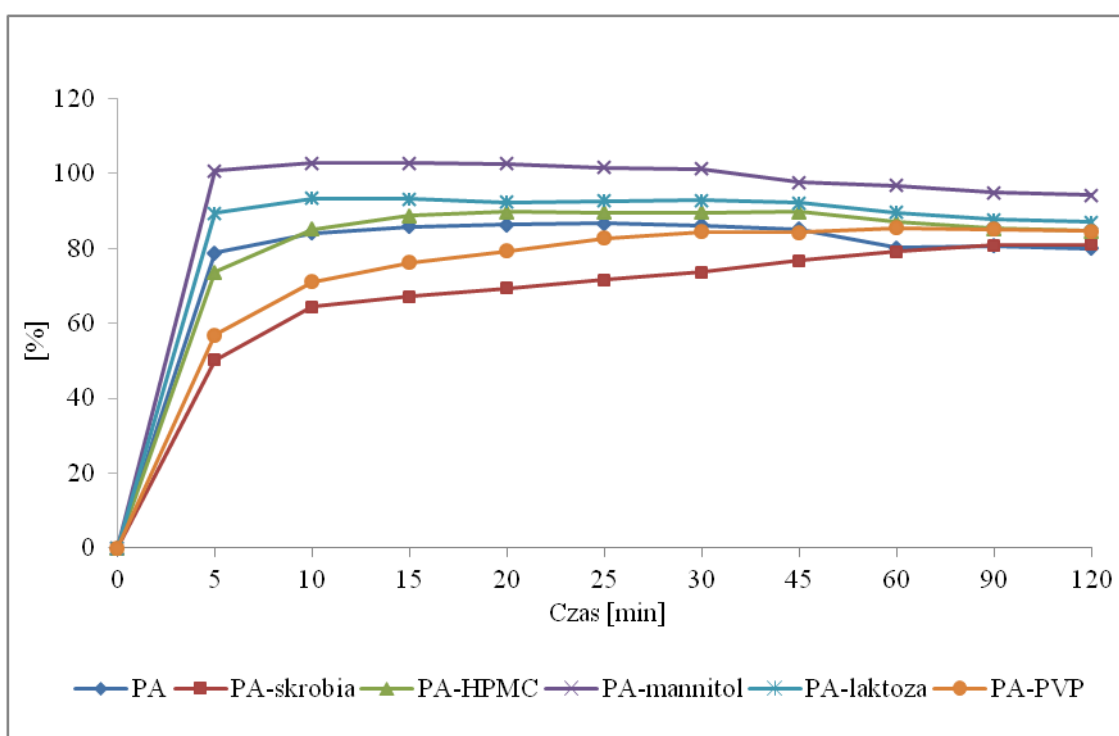
Ryc. 19. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z PVP.

5.1.2. Badania szybkości rozpuszczania piwampicyliny po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych

Badania szybkości rozpuszczania wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.4.3. Szybkość rozpuszczania piwampicyliny była oceniana w jej połączeniach z substancjami pomocniczymi takimi jak mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon. Stosunek wagowy proleku z wybraną substancją pomocniczą wynosił 1:1. Badania szybkości rozpuszczania prowadzono w płynie akceptorowym o pH 1,2 (0,1 mol/l HCl) i o pH 6,8 (bufor fosforanowy). W oparciu o oznaczenia chromatograficzne zmian stężeń piwampicyliny w płynie akceptorowym, wyznaczono profile szybkości rozpuszczania piwampicyliny oraz obliczono współczynniki f_1 oraz f_2 , celem porównania statystycznego otrzymanych wykresów.



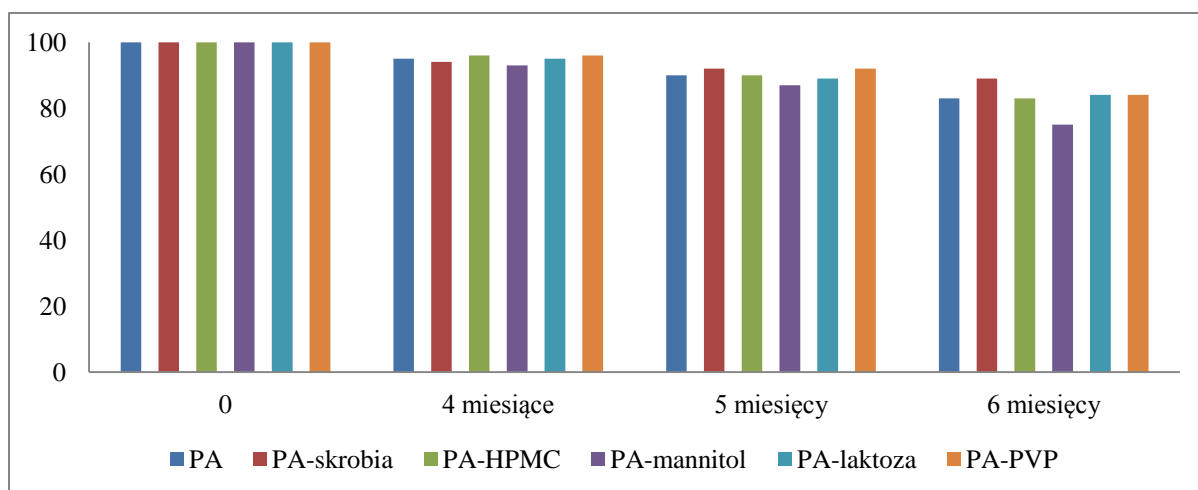
Wykres 1. Profil rozpuszczania piwampicyliny z substancjami pomocniczymi w pH 1,2.



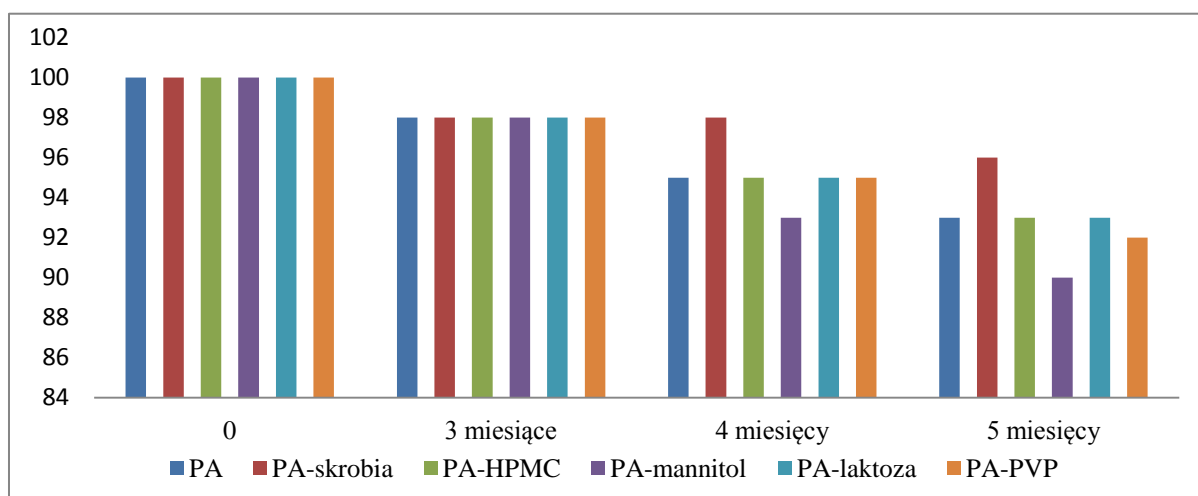
Wykres 2. Profil rozpuszczania piwampicyliny z substancjami pomocniczymi w pH 6,8.

5.1.3. Stabilność chemiczna piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi

Mieszanki piwampicyliny z wybranymi substancjami pomocniczymi przygotowano w celu zbadania zgodności pomiędzy ich składnikami. Mieszanki poddano badaniom przyspieszonego rozkładu. Trwałość mieszanin badano przy podwyższonej wilgotności względnej (76,5%) przy 348K (Wykres 3.) i w suchym powietrzu (0% wilgotności względnej) przy 363K (Wykres 4). W odstępach czasu, określonych przez szybkość degradacji, fiołki usunięto, schłodzono do temperatury pomieszczenia, a ich zawartość rozpuszczono w wodzie destylowanej i analizowano metodą HPLC-DAD potwierdzoną z wytycznymi ICH.



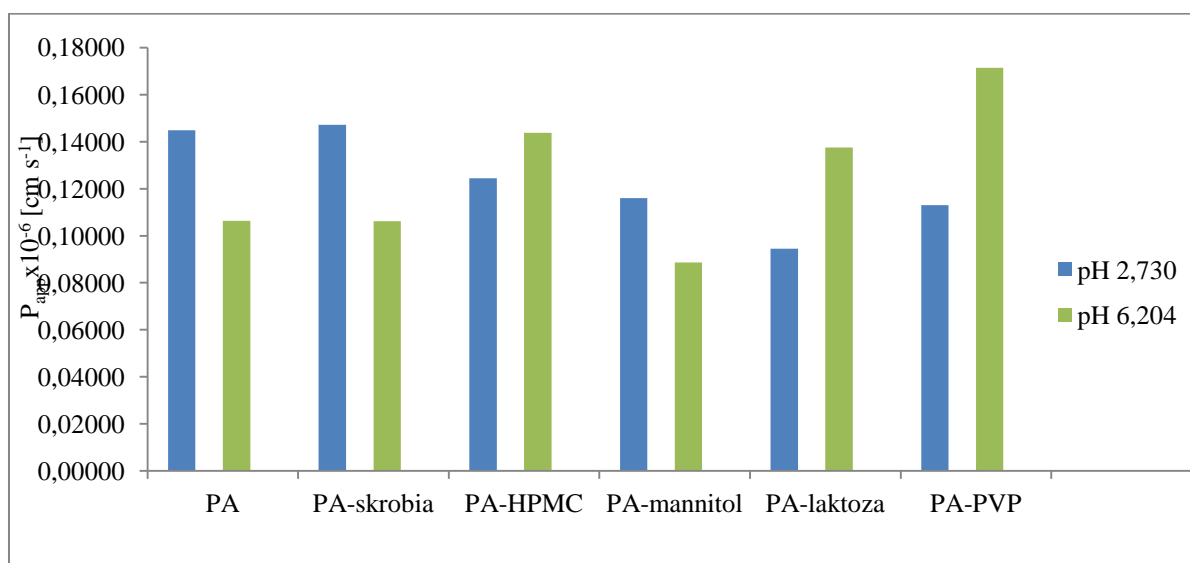
Wykres 3. Stabilność chemiczna piwampicyliny w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 348K, RH=70%.



Wykres 4. Stabilność chemiczna piwampicyliny w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 363K, RH=0%.

5.1.4. Badania przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych

Wartości pozornych stałych przenikalności piwampicyliny w postaci wolnej i mieszaninie z substancjami pomocniczymi przez błony symulujące nabłonek układu żołądkowo-jelitowego, badano za pomocą metody PAMPA zgodnie z metodą opisaną w pkt. 4.5.6. Otrzymane wyniki zestawiono na wykresie 5.



Wykres 5. Wartości pozornych współczynników przenikalności piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi.

5.1.5. Badania aktywności bakteriobójczej piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych

Do badań aktywności bakteriobójczej piwampicyliny w mieszaninach z substancjami pomocniczymi, zastosowano szczepy bakteryjne analizowane za pomocą analizy MIC, które obejmowały szczepy referencyjne ATCC i izolaty kliniczne z Instytutu Medycyny Laboratoryjnej w Poznaniu. Mikroorganizmy wskaźnikowe hodowano w bulionie sojowo-kazeinowym z ekstraktem drożdżowym dla mikroorganizmów o zwiększonych wymaganiach żywieniowych. Bakterie hodowano w warunkach tlenowych (300K, 24 godziny). Określono MIC w ciekłym ośrodku, stosując kolejną metodę rozcieńczania, wyniki zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wartości MIC piwampicyliny z substancjami pomocniczymi

Szczepy bakteryjne	PA	PA-skrobia	PA -HPMC	PA- mannitol	PA-laktoza	PA-PVP
	mg/L					
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	2	2	4	1↓	4	1↓
<i>Proteus mirabilis</i> c.i.	4	4	8	1↓	8	2↓
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	2	2	4	0,5↓	4	1↓
<i>Klebsiella pneumoniae</i> c.i.	4	4	8	2↓	8	1↓
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0,5	0,5	1	0,25↓	1	0,25↓
<i>Enterobacter aerogenes</i> c.i.	1	1	2	0,5↓	2	0,25↓
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2	2	4	1↓	4	1↓
<i>Enterococcus faecalis</i> c.i.	4	4	8	2↓	8	1↓
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	16	16	8	32	32
<i>Escherichia coli</i> c.i.	32	32	32	8	64	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64	64	64	64	64	64
<i>Staphylococcus aureus</i> c.i.	125	125	125	125	125	125
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	64	64	64	64	125	64
<i>Acinetobacter baumannii</i> c.i.	125	125	125	250	250	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	64	64	64	250	250	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> c.i.	125	125	125	250	250	250
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	8	8	8	8	8	62
<i>Salmonella enteritidis</i> c.i.	16	16	16	16	16	125
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	2	2	4	1↓	4	1↓
<i>Salmonella typhimurium</i> c.i.	4	4	8	1↓	8	2↓

PA. – Piwampicylina; HPMC- hydroksypropylometyloceluloza, PVP- poliwinylpirolidon
c.i. izolat kliniczny (ang. clinical isolates)

5.1.6. Analiza głównych składowych piwampicyliny w ocenie zależności zmian parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych

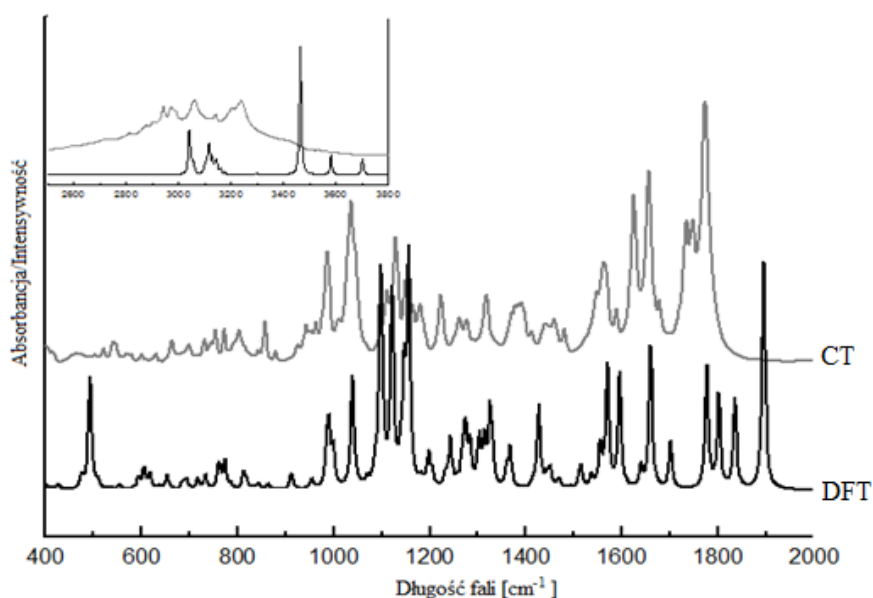
Otrzymane zależności w efekcie przeprowadzania analizy PCA zestawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Podobieństwa zmiennych dla układów piwampicyliny

Zmienna 1	Zmienna 2	Dystans Euklidesowy	R
AB ATCC	FTIR 1586 cm ⁻¹	0,101973	0,998943
FTIR 1774 cm ⁻¹	SE CI	0,172763	0,993553
FTIR 1774 cm ⁻¹	SE ATCC	0,172763	0,993553
PAMPA pH 2,730	SE CI	0,175513	0,914804
PAMPA pH 2,730	SE ATC	0,175513	0,914804
FTIR 1774 cm ⁻¹	PAMPA pH 2,730	0,196757	0,944275
SE CI	f1 pH 1,2	0,284887	0,988838
SE ATCC	f1 pH 1,2	0,284887	0,988838
PAMPA pH 2,730	f1 pH 1,2	0,317788	0,936368
FTIR 1774 cm ⁻¹	f1 pH 1,2	0,417860	0,982526
FTIR 1774 cm ⁻¹	PAMPA pH 7,296	0,475161	0,589356
FTIR 1396 cm ⁻¹	PA ATCC	0,528832	0,781078
PAMPA pH 7,296	SE ATCC	0,557893	0,504033
PAMPA pH 7,296	SE CI	0,557893	0,504033
FTIR 1312 cm ⁻¹	PA CI	0,645333	0,789684
FTIR 1751 cm ⁻¹	PAMPA pH 7,296	0,675939	0,811705
FTIR 1396 cm ⁻¹	PA CI	0,696928	0,624358
AB ATCC	FTIR 1558 cm ⁻¹	0,736109	0,942688
EF ATCC	FTIR 1459 cm ⁻¹	0,770742	0,927652
AB ATCC	FTIR 1283 cm ⁻¹	0,790193	0,929635
PAMPA pH 7,296	f1 pH 1,2	0,790695	0,544843
FTIR 1751 cm ⁻¹	SE CI	0,841536	0,836667
FTIR 1751 cm ⁻¹	SE ATC	0,841536	0,836667
EF ATCC	PAMPA pH 6,204	0,846301	0,907699
FTIR 1751 cm ⁻¹	PAMPA pH 2,730	0,847687	0,927833
FTIR 1312 cm ⁻¹	PA ATCC	0,868484	0,848519
FTIR 1806 cm ⁻¹	PAMPA pH 7,296	0,909327	0,837981
EF CI	FTIR 1459 cm ⁻¹	0,918057	0,909526
EF CI	PAMPA pH 6,204	0,954427	0,876907
SE – <i>Salmonella enteritidis</i> ; PA - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; AB - <i>Acinetobacter baumannii</i> ; EF - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC- szczepy referencyjne, CI- izolat kliniczny FTIR- Badania spektroskopowe w podczerwieni PAMPA- model równoległej przepuszczalności sztucznej membrany			

5.2.1. Badania tożsamości chlorowodoru cefetametu piwoksylu w oparciu o zastosowanie spektroskopii w podczerwieni

Badania spektroskopowe w podczerwieni (FT-IR) wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.4.1. Położenie rodzaj i intensywność pasm charakterystycznych dla cefetametum piwoksylu, otrzymano w oparciu o porównanie z pasmami referencyjnymi otrzymanymi na widmie teoretycznym cefetametum piwoksylu. Widma teoretyczne otrzymano poprzez wykorzystanie teorii funkcjonałów gęstości z bazą obliczeniową DFT. W tabeli 10 zestawiono charakterystyczne pasma teoretyczne oraz eksperymentalne istotne dla potwierdzenia tożsamości cefetametum piwoksylu na Ryc. 20 zaprezentowano widmo teoretyczne i eksperymentalne chlorowodoru cefetametum piwoksylu.



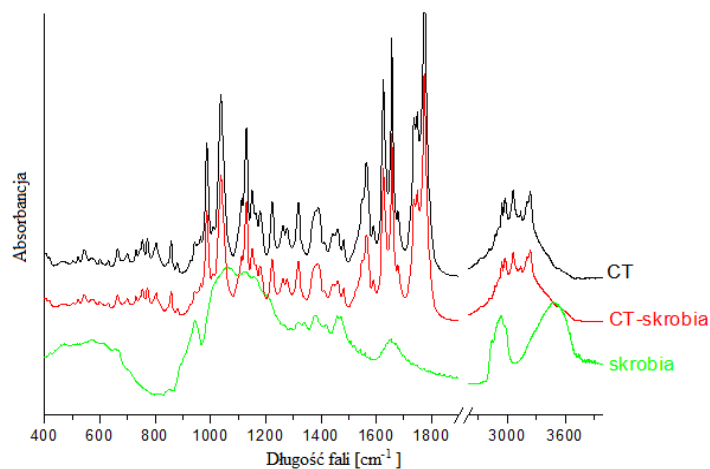
Ryc. 20. Widmo FT-IR chlorowodoru cefetametum piwoksylu eksperymentalne i teoretyczne.

Tabela 10. Wybrane charakterystyczne pasma dla chlorowodorku cefetametę piwoksyłu

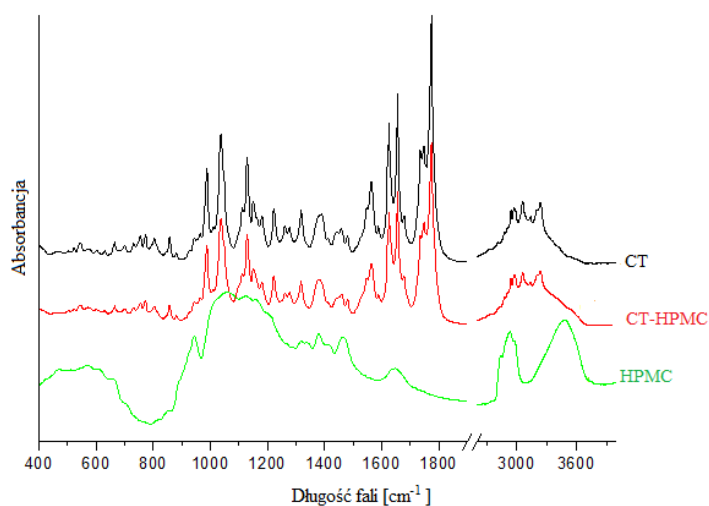
Położenie pasm			Przybliżony opis pasm
Eksperymentalna		Teoretyczna	
IR [cm ⁻¹]	Raman[cm ⁻¹]	[cm ⁻¹]	
697	700	688	C-S <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym
764		761	Def. cefemu w pierścieniu tiazolowym
774	775	774	C-C-C <i>b-ip</i> w cefemie + C-C <i>s</i> w pierścieniu cefemowym
804	803	819	C-S <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-C <i>s</i> w pierścieniu cefemu
	954	955	C-C <i>s</i> w pierścieniu cefemu
988	989	986 999	C-N <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-O <i>s</i> + N-O <i>s</i> pomiędzy tiazolem w pierścieniu cefemu + C-C <i>s</i> w pierścieniu cefemu + C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej + O-C-H <i>b-ip</i> pomiędzy tiazolem w pierścieniu cefemu
1038		1039	C-C <i>s</i> w pierścieniu cefemu + C-C-N <i>b-ip</i> w pierścieniu cefemu
	1050	1068	C=C-H <i>b-ip</i> w pierścieniu tiazolowym
1111		1101	C-O <i>s</i> pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu w grupie CH ₃ + C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej
1129		1122	C-N <i>s</i> w cefemie + def. pierścienia cefemu
1149		1146	C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej + CH ₂ <i>r</i> w grupie piwoksylowej
1164		1156	C-O <i>s</i> w grupie piwoksylowej obok grupy 3CH ₃
1180		1198	CH w grupie cefemu I w grupie pomiędzy tiazolem a pierścieniem cefemu
1222		1243	CH <i>w</i> w grupie cefemu I w grupie pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu
1277	1272	1275	C-C <i>s</i> pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu + C-N-H <i>b-ip</i> pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu
		1314-1275	CH <i>sc</i> w całej cząsteczce
1318	1319	1325	C-S <i>s</i> w tiazolu + C-N <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-N-H <i>b-ip</i> w tiazolu + CH <i>w</i> w cefemie i grupie piwoksylowej
1387	1385	1368	C-N <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + NH ₂ <i>r</i> w pierścieniu tiazolowym
1442	1446	1428	C-N <i>s</i> w pierścieniu cefemu + CH ₂ <i>w</i> w grupie piwoksylowej
1549	1548	1555	C=C <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym
1563	1562	1570	C=C <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + NH ₂ <i>sc</i> w pierścieniu tiazolowym + C=N <i>s</i> w tiazolu + NH w grupie pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu
1588	1590	1595	NH ₂ <i>sc</i> w pierścieniu tiazolowym + C=N <i>s</i> w tiazolu + NH <i>w</i> w grupie pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu
1627	1628	1640	C=N <i>s</i> pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu + NH ₂ <i>sc</i> w pierścieniu tiazolowym + C=C <i>s</i> w pierścieniu cefemu
1657	1660	1660	NH ₂ <i>sc</i> i NH ₂ w pierścieniu tiazolowym
1679	1678	1701	C=C <i>s</i> w pierścieniu cefemu
1734	1735	1777	C=O <i>s</i> w grupie pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu
1744		1802	C=O <i>s</i> w grupie piwoksylowej
1750		1836	C=O <i>s</i> w grupie piwoksylowej obok grupy 3CH ₃
1772	1773	1895	C=O <i>s</i> w pierścieniu cefemu
2810-3057		3039-3176	C-H <i>s</i>
3141		3297	C-H <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym
		3464	N-H <i>s</i> w grupie pomiędzy tiazolem i pierścieniem cefemu
		3580	N-H <i>s sym.</i> w pierścieniu tiazolowym
		3701	N-H <i>s anty-sym.</i> w pierścieniu tiazolowym

s-rozciągające, *b*-zginające, *r*-wahadłowe, *w*-wachlarzowe, *sc*-nożycowe, *ip*- w płaszczyźnie, *op*-poza płaszczyzną.

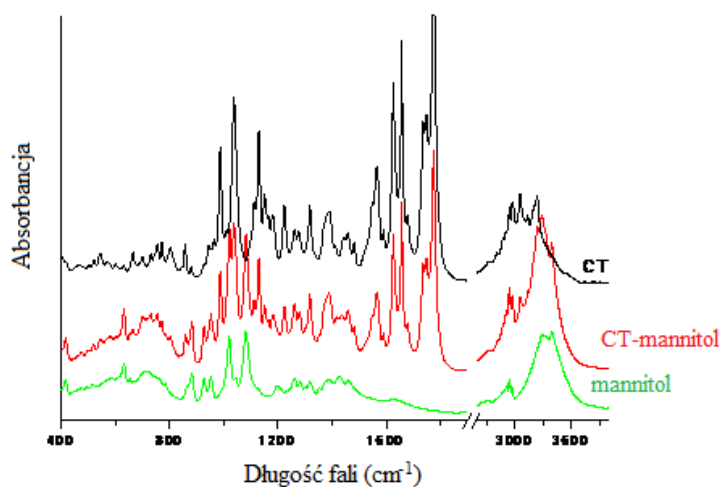
Na rycinach 21-25 zestawiono widma FT-IR chlorowodoru cefetametu piwoksylu w układach preformulacyjnych z badanymi substancjami pomocniczymi.



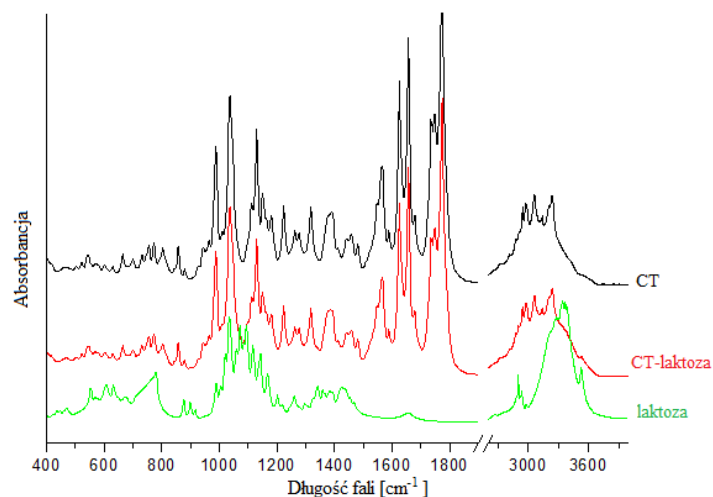
Ryc. 21. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet piwoksylu w mieszaninie ze skrobią.



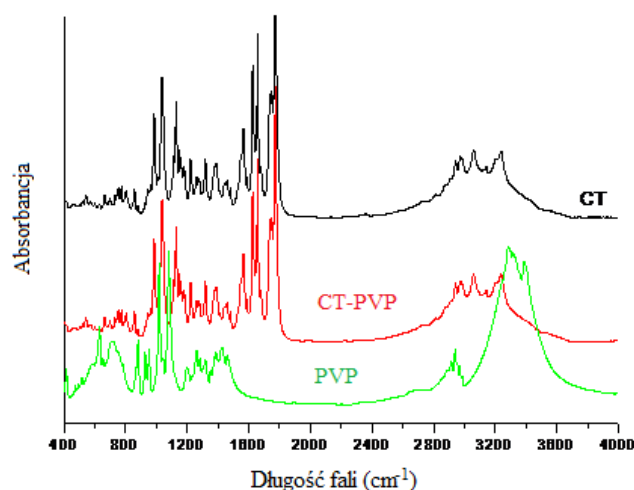
Ryc. 22. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet piwoksylu w mieszaninie z HPMC.



Ryc. 23. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet piwoksylu w mieszaninie z mannitolem.



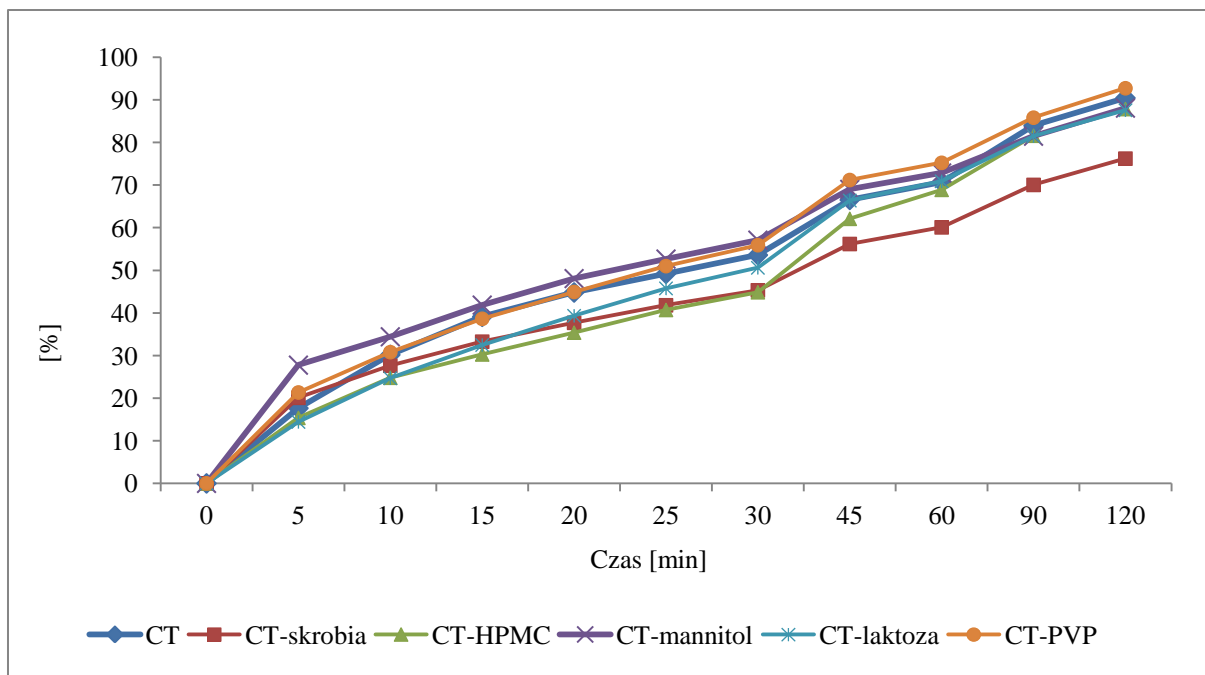
Ryc. 24. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w mieszaninie z laktozą.



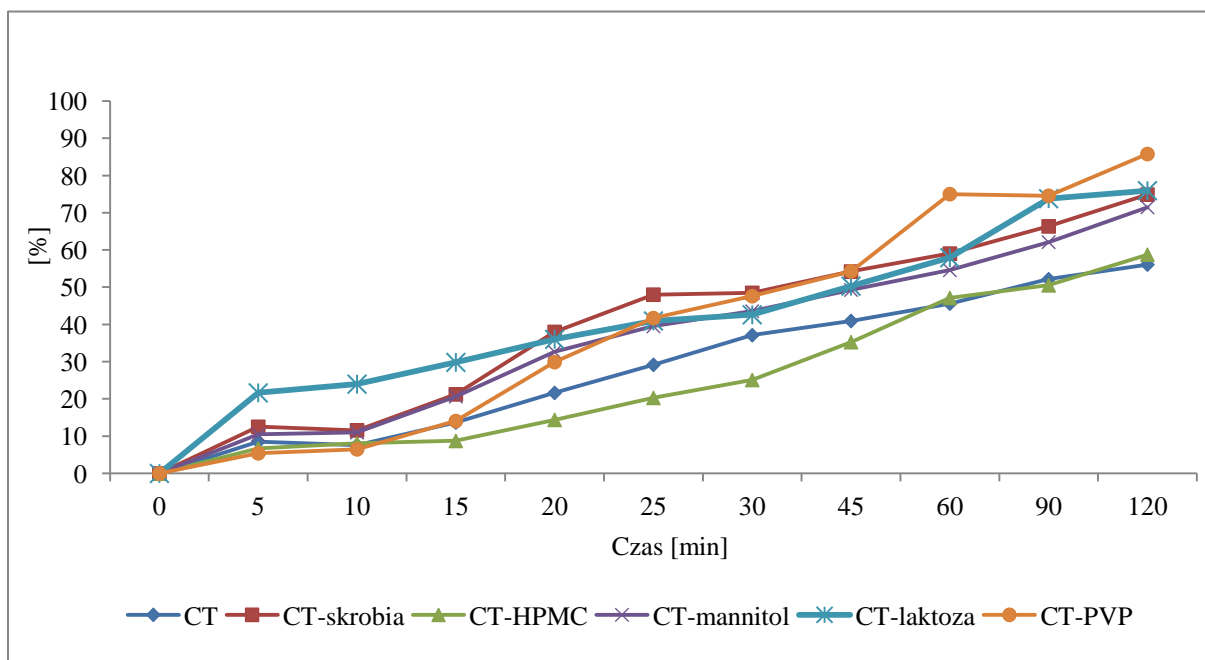
Ryc. 25. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksylu z PVP.

5.2.2. Badania szybkości rozpuszczania chlorowodoru cefetamet u piwoksylu po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych

Badania szybkości rozpuszczania wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.4.3. Szybkość rozpuszczania chlorowodoru cefetamet u piwoksylu była oceniana w jej połączeniach z substancjami pomocniczymi: mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon. Stosunek wagowy proleku z badanymi substancjami pomocniczymi wynosił 1:1. Badania szybkości rozpuszczania prowadzono w płynie akceptorowym o pH 1,2 (0,1 mol/l HCl) i o pH 6,8 (bufor fosforanowy). Wykonano profile szybkości rozpuszczania dla układów binarnych oraz obliczono współczynniki f_1 oraz f_2 .



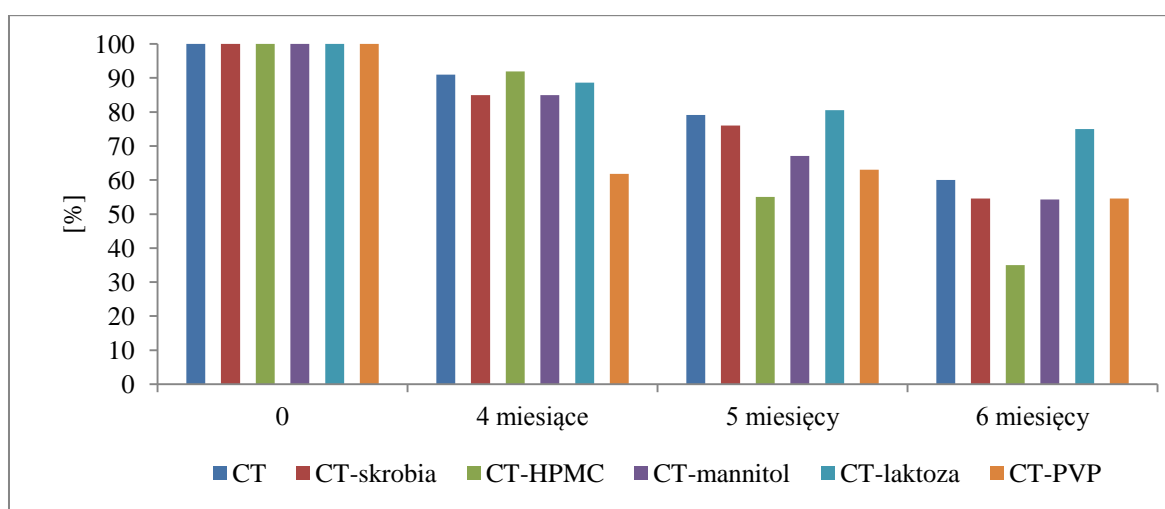
Wykres 6. Profil rozpuszczania cefetametum piwoksylu z substancjami pomocniczymi w pH 1,2



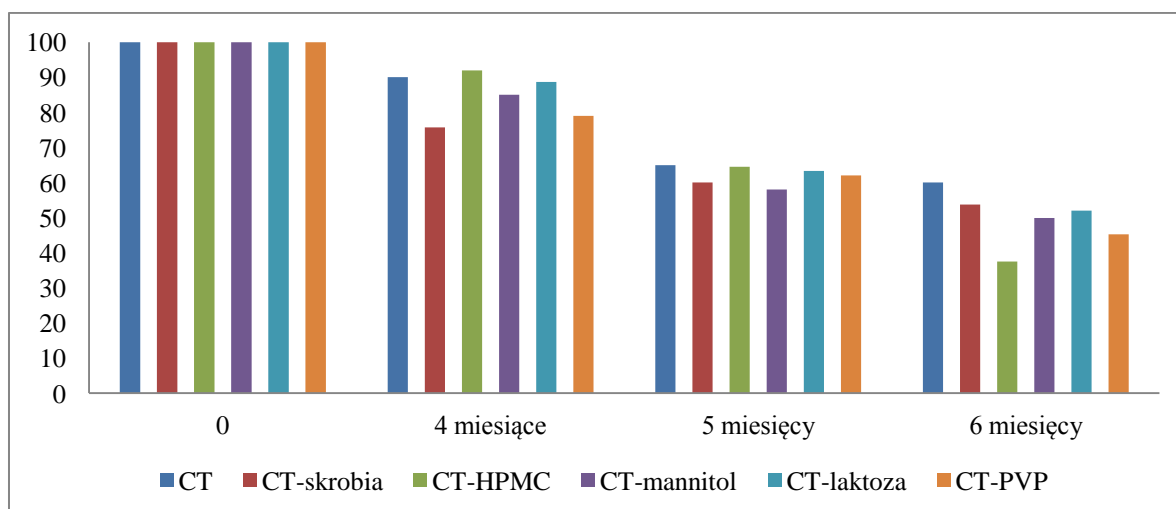
Wykres 7. Profil rozpuszczania cefetametum piwoksylu z substancjami pomocniczymi w pH 6,8.

5.2.3. Stabilność chemiczna chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi

Mieszaniny chlorowodoru cefetamet u piwoksylu z wybranymi substancjami pomocniczymi przygotowano w celu zbadania zgodności ich składników. Mieszaniny badano w warunkach przyspieszonego starzenia. Trwałość mieszanin badano przy podwyższonej wilgotności względnej (76,5%) przy 348K (Wykres 8.) i w suchym powietrzu (0% wilgotności względnej) przy 363K (Wykres. 9). W odstępach czasu, określonych przez szybkość degradacji, fiołki usunięto, schłodzono do temperatury pomieszczenia, a ich zawartość rozpuszczono w wodzie destylowanej i analizowano metodą HPLC-DAD potwierdzoną z wytycznymi ICH.



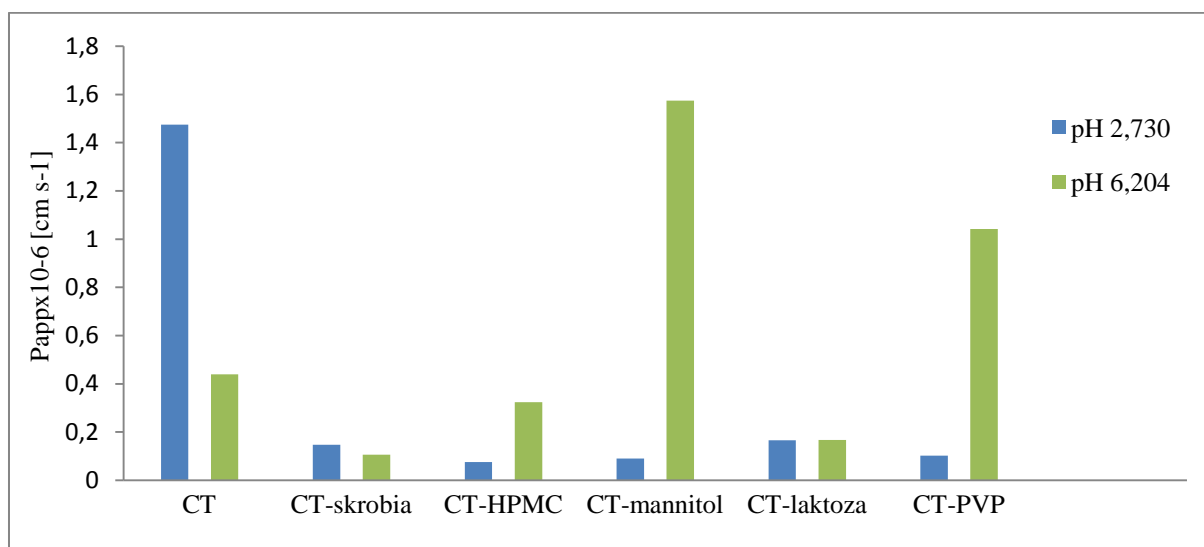
Wykres 8. Stabilność chemiczna chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 348K, RH=76,5%.



Wykres 9. Stabilność chemiczna chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 363K, RH=0%.

5.2.4. Badania przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych cefetametum piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych

Różnice w przenikalności cefetametum piwoksylu w postaci wolnej i mieszaninie z substancjami pomocniczymi przez błony symulujące nabłonek układu żołądkowo-jelitowego badano za pomocą metody PAMPA zgodnie z metodą opisaną w pkt.4.5.6. Otrzymane wyniki zestawiono na wykresie 10.



Wykres 10. Wartości pozornych współczynników przenikalności cefetametum piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi.

5.2.5. Badania aktywności bakteriobójczej cefetametum piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych

Do badań aktywności bakteriobójczej cefetametum piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi, zastosowano szczepy bakteryjne analizowane za pomocą analizy MIC. Obejmowały szczepy referencyjne ATCC i izolaty kliniczne z Instytutu Medycyny Laboratoryjnej w Poznaniu. Mikroorganizmy wskaźnikowe hodowano w bulionie sojowo-kazeinowym z ekstraktem drożdżowym dla mikroorganizmów o zwiększonych wymaganiach żywieniowych. Bakterie hodowano w warunkach tlenowych (300K, 24 godziny). Określono MIC w ciekłym ośrodku, stosując kolejną metodę rozcieńczania.

Tabela 11. Wartości MIC cefetamet u piwoksylu z substancjami pomocniczymi

Szczepy bakteryjne	CT	CT - skrobia	CT - HPMC	CT - mannitol	CT - laktoza	CT - PVP
	mg/L					
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1	4	1	4	4	0,5↓
<i>Proteus mirabilis</i> c.i.	1	8	1	4	8	0,5↓
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	0,25	1	0,25	1	8	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> c.i.	4	1	2↓	4	8	2↓
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	2	2	2	4	16	1↓
<i>Enterobacter aerogenes</i> c.i.	4	4	2↓	4	32	1↓
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2	1↓	2	4	32	2
<i>Enterococcus faecalis</i> c.i.	4	1↓	4	16	32	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1	0,5↓	4	32	0,25↓
<i>Escherichia coli</i> c.i.	1	1	0,5↓	4	32	0,25↓
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	125	32↓	125	250	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> c.i.	125	64↓	125	250	250	125
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	8	8	8	16	16	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> c.i.	16	16	16	32	32	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	125	250	32↓	250	250	64↓
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> c.i.	125	250	32↓	250	250	64↓
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	125	125	125	125	62↓	125
<i>Salmonella enteritidis</i> c.i.	250	250	250	250	62↓	250
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	125	125	62↓	125	62↓	125
<i>Salmonella typhimurium</i> c.i.	250	250	62↓	250	62↓	250

CT –cefetamet piwoksyl
 HPMC- hydroksypropylometyloceluloza
 PVP- poliwinylpiperolidon
 c.i. izolat kliniczny (ang. clinical isolates)

5.2.6. Analiza głównych składowych chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w ocenie zależności zmian parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych

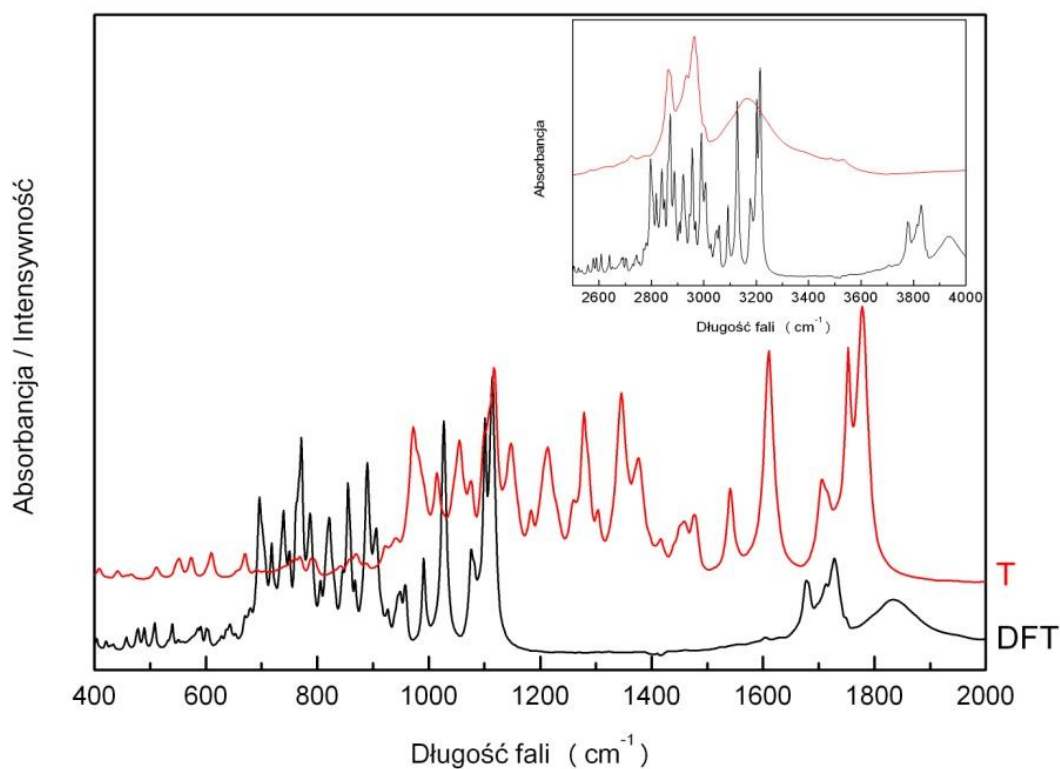
Otrzymane zależności w efekcie przeprowadzania analizy PCA zestawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Podobieństwa zmiennych dla układów chlorowodoru cefetamet u piwoksylu

Zmienna 1	Zmienna 2	Dystans Euklidesowy	R
PA ATCC	f1 pH 6,8	0,075831	0,443404
PA CI	f1 pH 6,8	0,075831	0,443404
PAMPA pH 2,730	PM CI	0,268409	0,878474
PM ATCC	f1 pH 6,8	0,335052	0,290982
393K RH 0 6m	PA ATCC	0,466757	0,923139
393K RH 0 6m	PA CI	0,466757	0,923139
393K RH 0 6m	f1 pH 6,8	0,482093	0,715649
373K RH >70 5m	PAMPA pH 2,730	0,492119	0,953773
373K RH >70 5m	PM CI	0,569966	0,931505
373K RH >70 5m	f1 pH 6,8	0,623839	0,773164
373K RH >70 5m	PM ATCC	0,626902	0,799221
373K RH >70 5m	PA ATCC	0,697730	0,853866
373K RH >70 5m	PA CI	0,697730	0,853866
393K RH 0 6m	PM ATCC	0,740004	0,840036
373K RH >70 6m	f1 pH 6,8	0,867385	0,858480
373K RH >70 5m	373K RH >70 6m	0,880726	0,891443
PAMPA pH 2,730	PM ATCC	0,881764	0,619530
373K RH >70 5m	393K RH 0 6m	0,900110	0,912975
373K RH >70 6m	PA CI	0,904551	0,679829
373K RH >70 6m	PA ATCC	0,904551	0,679829
373K RH >70 6m	PM ATCC	0,928771	0,579790
PM CI	f1 pH 6,8	0,960838	0,519231
SA ATCC	f2 pH 1,2	0,969351	0,822432
SA – <i>Staphylococcus aureus</i> ; PA - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; PM - <i>Proteus mirabilis</i> ; ATCC- szczepy referencyjne, CI- izolat kliniczny FTIR- Badania spektroskopowe w podczerwieni PAMPA- model równoległej przepuszczalności sztucznej membrany			

5.3.1. Badania tożsamości tebipenemu piwoksylu w oparciu o zastosowanie spektroskopii w podczerwieni

Badania spektroskopowe podczerwieni (FT-IR) wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.4.1. Identyfikację widm charakterystycznych dla tebipenemu piwoksylu, prowadzono w oparciu o porównanie z widmem teoretycznym wyznaczonym podczas obliczeń kwantowo-chemicznych, gdzie zdefiniowano położenie, rodzaj i intensywność pasm charakterystycznych dla tebipenemu piwoksylu. W tabeli 13 zestawiono charakterystyczne pasma teoretyczne oraz eksperymentalne istotne dla potwierdzenia tożsamości tebipenemu piwoksylu. Na rycinie 26 zestawiono widma teoretyczne i eksperymentalne tebipenemu piwoksylu [114].



Ryc. 26. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksylu eksperymentalne i teoretyczne.

Analizę FT-IR układów preformulacyjnych przeprowadzono w odniesieniu do zmian w widmie tebipenemu piwoksylu po wprowadzeniu do układów z wybranymi substancjami pomocniczymi. Jako referencyjne przyjęto widma izolowanych cząstek tebipenemu piwoksylu oraz wybranej substancji pomocniczej.

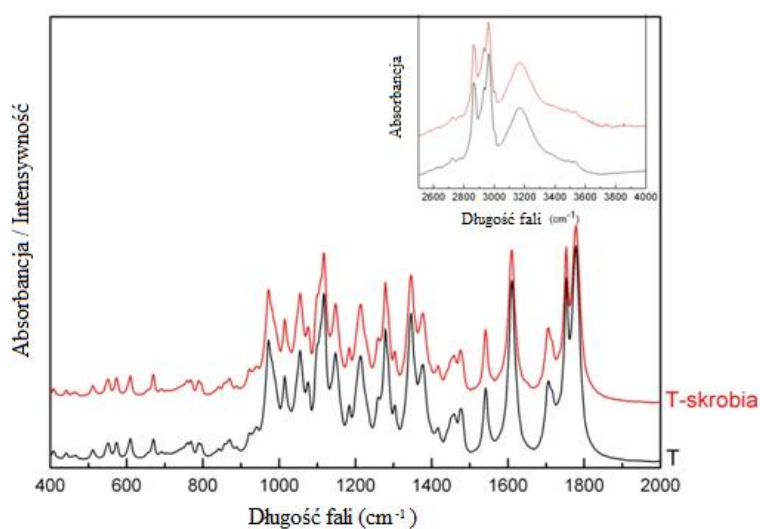
Na rycinach 27-32 zestawiono widma poszczególnych składników układów tebipenemu piwoksylu z substancjami pomocniczymi w postaci izolowanej oraz po sporządzeniu mieszanin preformulacyjnych przeznaczonych do badań oceny efektów oddziaływań wybranych substancji pomocniczych z prolekiem.

Tabela 13. Wybrane charakterystyczne pasma tebipenemu piwoksylu

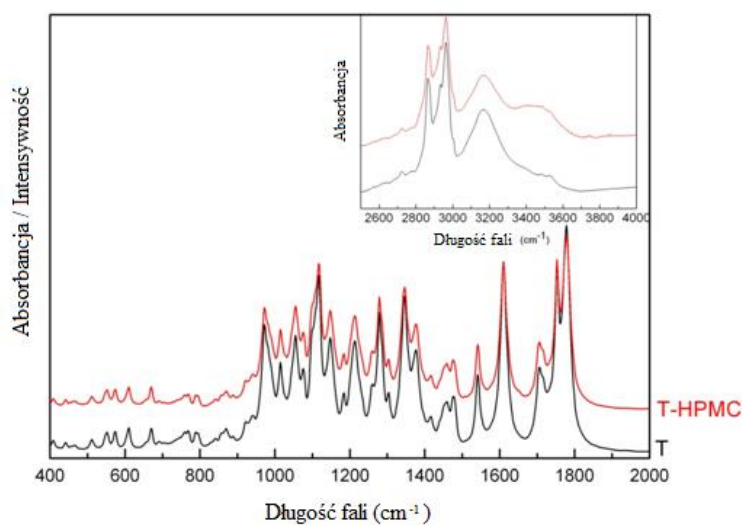
Położenie pasm			Przybliżony opis pasm
Eksperymentalne		Teoretyczne	
IR [cm ⁻¹]	Raman[cm ⁻¹]	[cm ⁻¹]	
	633	564	C-S <i>s</i> pomiędzy azetydyną a pierścieniem bicyklicznym + C-O <i>b</i> w grupie karboksylowej + CH ₂ <i>t</i> pierścienia azetydyny
	636	553	C-S <i>s</i> pomiędzy azetydyną a pierścieniem bicyklicznym + CH ₂ <i>t</i> pierścienia azetydyny
650		655	C-S <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-S <i>s</i> pomiędzy azetydyną a pierścieniem bicyklicznym
650		670	C-S <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-S <i>s</i> pomiędzy azetydyną a pierścieniem bicyklicznym
693		686	C-S <i>s</i> pomiędzy azetydyną a pierścieniem bicyklicznym
	711	700	C-S <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + CH ₂ w pierścieniu tiazolowym
	713	705	C-S <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + CH ₂ w pierścieniu tiazolowym
900		855	Def. pierścienia 4-5 bicyklicznego + C-O i CH ₃ <i>w</i> w estrze
	923	895	C-C w pierścieniu 4-5 bicyklicznym + C-C pomiędzy pierścieniem 4-5 bicyklicznym i grupą CH ₃ + C-C w pierścieniu tiazolowym
	923	891	C-C w pierścieniu 4-5 bicyklicznym + C-C pomiędzy pierścieniem 4-5 bicyklicznym i grupą CH ₃ + C-C w pierścieniu tiazolowym
1036		1019	C-N <i>s</i> w pierścieniach azetydyny i tiazolu
1036		1015	C-N <i>s</i> w pierścieniach azetydyny i tiazolu
1140		1137	CH ₂ <i>at</i> pierścienia azetydyny
	1140	1137	CH ₂ <i>at</i> pierścienia azetydyny
1142		1118	CH ₂ <i>at</i> pierścienia azetydyny
	1164	1167	CH ₂ <i>t</i> przy azetydynie, tiazolu
	1164	1147	CH ₂ <i>t</i> przy azetydynie, tiazolu
	1186	1160	CH ₃ <i>w</i> w estrze
1199		1218	C-O-H <i>b</i> w grupie karboksylowej + C-N w azetydynie i bicyklicznym 4:5 pierścieniu
1189		1213	C-O-H <i>b</i> w grupie karboksylowej + C-N <i>s</i> bicyklicznym 4:5 pierścieniu
	1239	1229	CH ₂ w bicyklicznym 4:5 pierścieniu
	1229	1217	CH ₂ w bicyklicznym 4:5 pierścieniu
1284		1288	C-O-H <i>b</i> w grupie karboksylowej + C-N w azetydynie i bicyklicznym 4:5 pierścieniu
	1284	1271	C-O-H <i>b</i> w grupie karboksylowej + C-N w azetydynie i bicyklicznym 4:5 pierścieniu
1284	1280		C-O-H <i>b</i> w grupie karboksylowej + C-N w azetydynie i bicyklicznym 4:5 pierścieniu
	1301	1293	CH ₂ w azetydynie, tiazolu i bicykliczne pierścienie 4: 5
	1336	1320	CH ₂ w azetydynie i tiazolowe pierścienie
	1335	1306	CH ₂ w azetydynie i tiazolowe pierścienie
1344		1346	C-C <i>s</i> + C-O <i>s</i> w estrze + CH ₂ <i>w</i> w estrze
1388		1376	C-N <i>s</i> pomiędzy azetydyną a pierścieniami tiazolowymi
1514		1449	CH ₂ <i>sc</i> + CH ₂ <i>w</i> i CH ₃ <i>w</i> + CH ₃ <i>w</i> , <i>t</i> w estrze
	1514	1449	CH ₂ <i>sc</i> + CH ₂ <i>w</i> i CH ₃ <i>w</i> + CH ₃ <i>w</i> , <i>t</i> w estrze
1535		1476	CH ₂ <i>sc</i> w pierścieniach azetydyny + CH ₃ <i>sc</i> w estrze
1604		1540	C=C <i>s</i> w bicyklicznym 4:5 pierścieniu
	1604	1541	C=C <i>s</i> w bicyklicznym 4:5 pierścieniu
1710		1608	C=N <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym
	1710	1610	C=N <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym

Położenie pasm			Przybliżony opis pasm
Eksperymentalne		Teoretyczne	
IR [cm ⁻¹]	Raman[cm ⁻¹]	[cm ⁻¹]	
1816		1703	C=O <i>s</i> w grupie karboksylowej + C=O <i>s</i> w estrze
	1816	1705	C=O <i>s</i> w grupie karboksylowej + C=O <i>s</i> w estrze
1878		1778	C=O <i>s</i> grupa ketonowa + C=O <i>s</i> w estrze
3014		2958	C-H <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-H <i>s</i> w estrze
	3014	2964	C-H <i>s</i> w pierścieniu tiazolowym + C-H <i>s</i> w estrze
	3062	3005	C-H <i>s</i> w pierścieniu azetydyny + CH <i>s</i> w grupie CH ₃ + C-H <i>s</i> w estrze

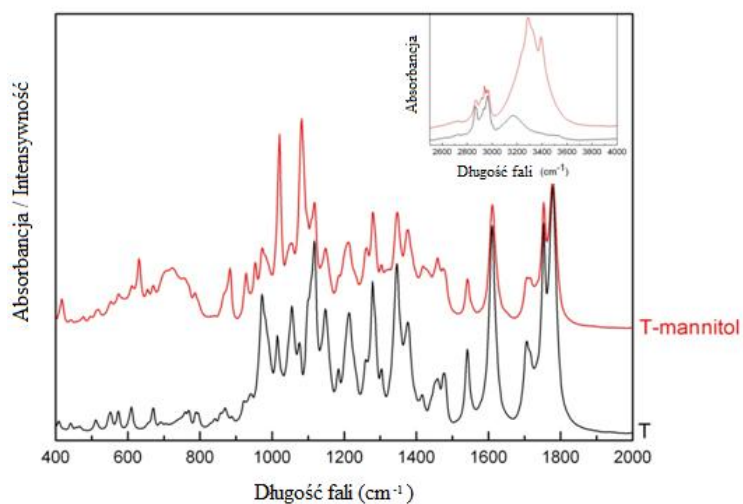
s-rozciągające, *b*-zginające, *r*-wahadłowe, *w*-wachlarzowe, *sc*-nożycowe, *ip*- w płaszczyźnie, *op*-poza płaszczyzną.



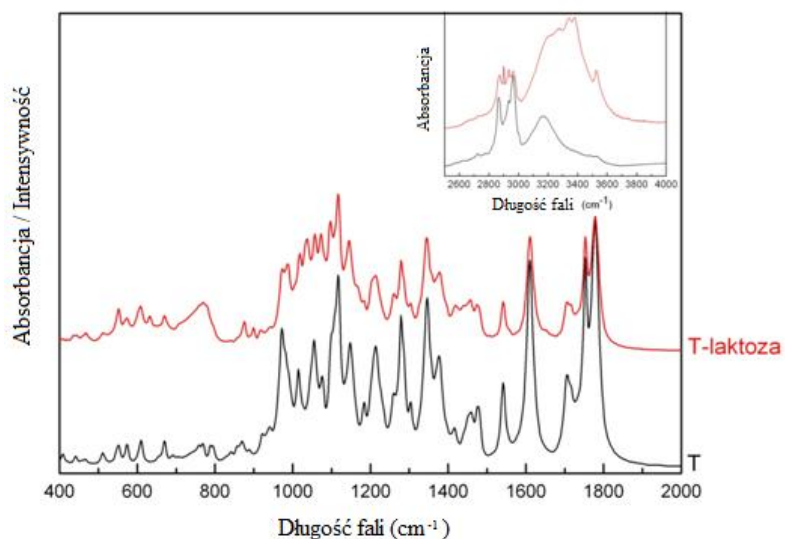
Ryc. 27. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksylu w mieszaninie ze skrobią.



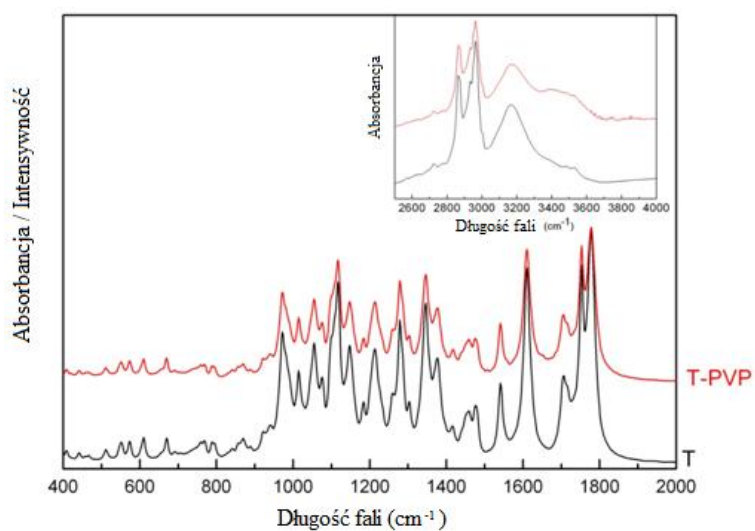
Ryc. 29. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksylu w mieszaninie z HPMC.



Ryc. 30. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksylu w mieszaninie z mannitolem.



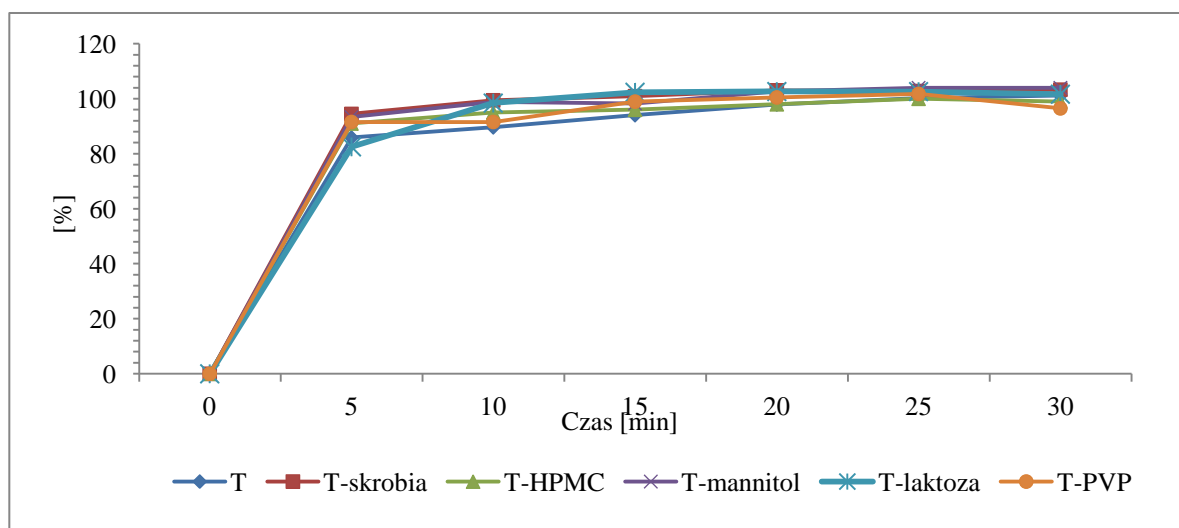
Ryc. 31. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksylu w mieszaninie z laktozą.



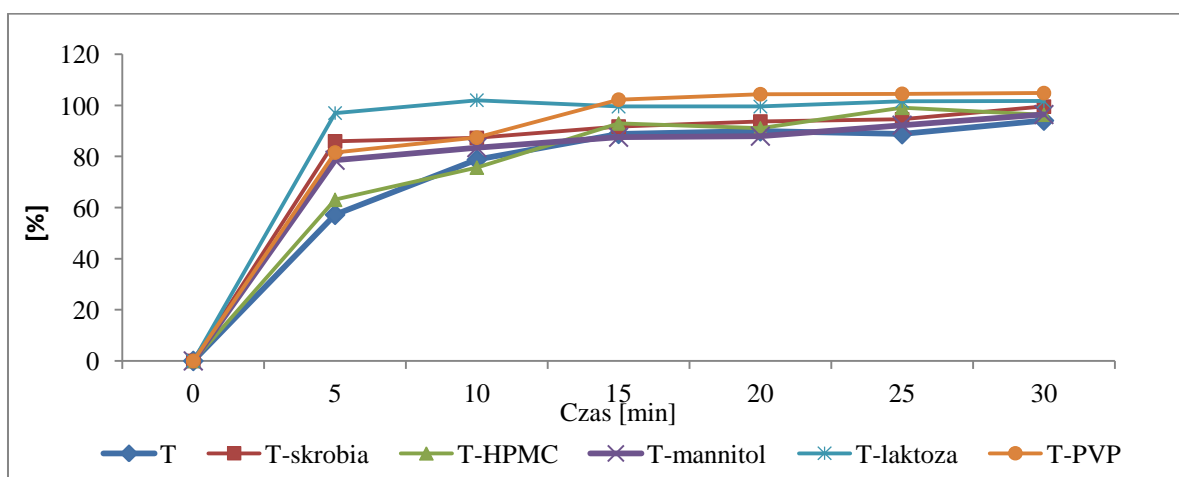
Ryc. 32. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksylu w mieszaninie z PVP.

5.3.2. Badania szybkości rozpuszczania tebipenemu piwoksylu po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych

Badania szybkości rozpuszczania wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.4.3. Szybkość rozpuszczania tebipenemu piwoksylu była oceniana w jej połączeniach z substancjami pomocniczymi: mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon. Stosunek wagowy proleku z badanymi substancjami pomocniczymi wynosił 1:1. Badania szybkości rozpuszczania prowadzono w płynie akceptorowym o pH 1,2 (0,1 mol/l HCl) i o pH 6,8 (bufor fosforanowy) Wykonano profile szybkości rozpuszczania dla układów binarnych oraz obliczono współczynniki f_1 oraz f_2 celem prównania statystycznego otrzymanych wykresów.



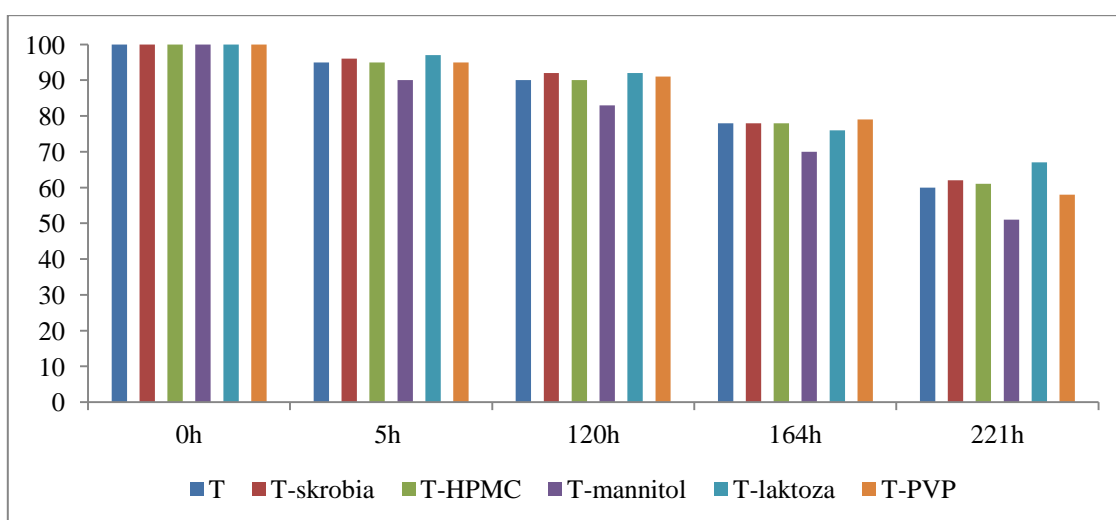
Wykres 11. Profil rozpuszczania tebipenemu piwoksylu z substancjami pomocniczymi w pH 1,2.



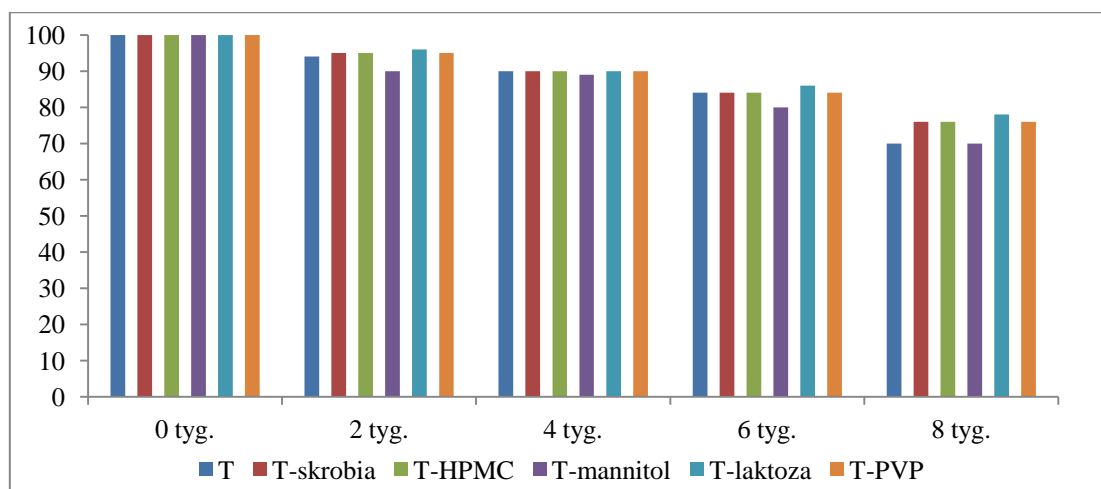
Wykres 12. Profil rozpuszczania tebipenemu piwoksylu z substancjami pomocniczymi w pH 6,8.

5.3.3. Stabilność chemiczna tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi

Mieszaniny tebipenemu piwoksylu z wybranymi substancjami pomocniczymi przygotowano w celu zbadania zgodności ich składników. Mieszaniny badano w warunkach stresowych. Trwałość mieszanin badano przy podwyższonej wilgotności względnej (76,5%) przy 348K (Wykres 13.) i w suchym powietrzu (0% wilgotności względnej) przy 363K (Wykres. 14). W odstępach czasu, określonych przez szybkość degradacji, fiołki usunięto, schłodzono do temperatury pomieszczenia, a ich zawartość rozpuszczono w wodzie destylowanej i analizowano metodą HPLC-DAD potwierdzoną z wytycznymi ICH.



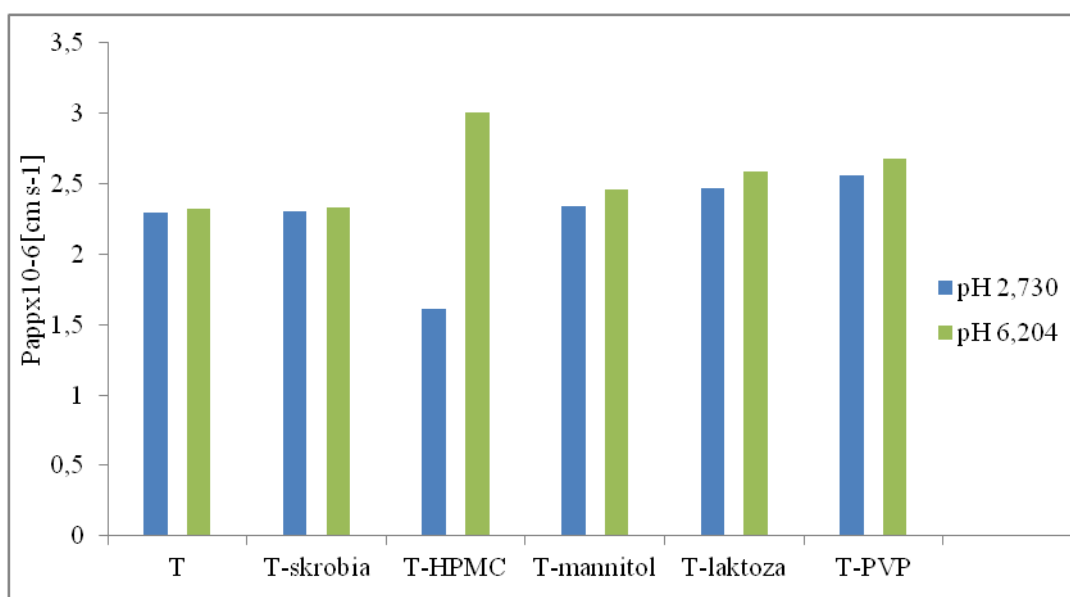
Wykres 13. Stabilność chemiczna tebipenemu piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 348K, RH=76,5%.



Wykres 14. Stabilność chemiczna tebipenemu piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 363K, RH=0%.

5.3.4. Badania przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych

Wartości pozornych współczynników przenikalności tebipenemu piwoksylu w postaci wolnej i mieszaninie z substancjami pomocniczymi przez błony symulujące nabłonek układu żołądkowo-jelitowego badano za pomocą metody PAMPA zgodnie z metodą opisaną w pkt. 4.5.6. otrzymane wyniki zestawiono na wykresie 15.



Wykres 15. Wartości pozornych współczynników tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi.

5.3.5. Badania aktywności bakteriobójczej tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych

Do badań aktywności bakteriobójczej tebipenemu piwoksylu w mieszaninach z substancjami pomocniczymi zastosowano szczepy bakteryjne analizowane za pomocą analizy MIC. Obejmowały szczepy referencyjne ATCC i izolaty kliniczne z Instytutu Medycyny Laboratoryjnej w Poznaniu. Mikroorganizmy wskaźnikowe hodowano w bulionie sojowo-kazeinowym z ekstraktem drożdżowym dla mikroorganizmów o zwiększonych wymaganiach żywieniowych. Bakterie hodowano w warunkach tlenowych (300K, 24 godziny). Określono MIC w ciekłym ośrodku, stosując kolejną metodę rozcieńczania wyniki zestawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Wyniki aktywności mikrobiologicznej tebipenemu piwoksylu z substancjami pomocniczymi

Szczepy bakteryjne	T	T - skrobia	T - laktoza	T - HPMC	T - mannitol	T - PVP
	mg/L					
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	64	125	0,5↓	62	15↓	1↓
<i>Proteus mirabilis</i> c.i.	125	125	1↓	62	15	1↓
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	125	15	15	15	8↓	0,5↓
<i>Klebsiella pneumoniae</i> c.i.	125	15	15	15	8↓	1↓
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	125	1	0,03↓	0,5↓	1	4
<i>Enterobacter aerogenes</i> c.i.	250	1	0,03↓	1	1	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	250	125	125	125	15	125
<i>Enterococcus faecalis</i> c.i.	250	125	125	125	15	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15	1	0,03↓	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> c.i.	15	1	0,03↓	1	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	250	15	125	125	125	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> c.i.	250	15		125	125	125
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0,5	15	15	1	4	125
<i>Salmonella typhimurium</i> c.i.	1	15	15	2	8	125

T –tebipenem piwoksyl, HPMC- hydroksypropylometyloceluloza, PVP- poliwinylpirolidon, c.i. izolat kliniczny (ang. clinical isolates)

5.3.6. Analiza głównych składowych oznaczania zależności zmian fizykochemicznych i mikrobiologicznych po wprowadzeniu do układu preformulacyjnego tebipenemu piwoksylu.

Otrzymane zależności w efekcie przeprowadzenia analizy PCA zestawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Podobieństwa zmiennych dla układów tebipenemu piwoksylu

Zmienna 1	Zmienna 2	Dystans Euklidesowy	R
393K RH 0 51h	EA ATC	0,171710	0,996199
PAMPA 60	f2 pH 1,2	0,797413	0,934018
373K RH 0 51h	EA ATC	0,828970	0,294203
363K RH 0 51h	f2 pH 1,2	0,834127	0,814798
383K RH 0 51h	f2 pH 6,8	0,839721	0,909791
373K RH 0 51h	f2 pH 1,2	0,871408	0,876590
313K RH >76 51h	EF ATC	0,892513	0,919856
313K RH >76 51h	KP ATC	0,892513	0,919856
373K RH 0 51h	PAMPA 60	0,956503	0,837315
383K RH 0 51h	PAMPA 60	0,968840	0,906083
363K RH 0 51h	EA ATC	0,985536	0,055880
363K RH 0 51h	PAMPA 60	1,084025	0,731188
ST ATC	f1 pH 1,2	1,208938	0,677530
323K RH >76 51h	KP ATC	1,334943	0,737157
323K RH >76 51h	EF ATC	1,334943	0,737157

6. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Zaprezentowane w pracy korzyści stosowania proleków dla wybranych analogów β -laktamowych w pełni argumentują obserwowany trend modyfikacji chemicznej, prowadzącej do otrzymania „leków” o lepszych właściwościach organoleptycznych, większej trwałości chemicznej i biodostępności. Z drugiej strony należy mieć na uwadze ograniczenia związane z tą formą chemiczną. Istnieją bowiem pewne wyzwania wynikające z modyfikacji ukierunkowanych na otrzymanie proleków i w konsekwencji zmian fizykochemicznych i mikrobiologicznych wynikających z łączenia z wybranymi substancjami pomocniczymi celem otrzymania formulacji spełniającej wymagane kryteria pierwotne dla API.

Rosnąca oporność bakterii na dużą liczbę różnych grup antybiotyków, w tym antybiotyków β -laktamowych, jest obecnie poważnym problemem klinicznym. Skuteczność leczenia infekcji bakteryjnych antybiotykami β -laktamowymi jest znacznie ograniczona przez ich niestabilność chemiczną i niską biodostępność, co ogranicza ich zdolność do osiągnięcia koniecznego stężenia bakteriobójczego po podaniu doustnym w warunkach *in vivo*. Proleki antybiotyków β -laktamowych stosuje się także w celu zmniejszenia tych ograniczeń. Należy jednak pamiętać, że zwiększona lipofilność analogu β -laktamowego zmniejsza jego rozpuszczalność, modyfikuje działanie bakteriobójcze i biodostępność. Połączenie antybiotyków β -laktamowych z substancjami pomocniczymi może powodować zmiany chemiczne wynikające z nietrwałości zarówno wiązań estrowych (przy C-2) i amidowych bicyklicznego układu pierścieniowego (C-7). Nietrwałość analogów β -laktamowych w postaci kwasowej to ważny aspekt powodujący znaczące zmiany fizykochemiczne indukujące profil działania proleku i jego bezpieczeństwa. Dlatego ważne jest dokładne określenie wpływu substancji pomocniczych na wybrane proleki, zwłaszcza te zawierające kilka nietrwałych wiązań chemicznych, które mogą wykazywać już nietrwałość podczas badań preformulacyjnych.

W związku z tym, w pierwszym etapie badań skupiłem się na ocenie oddziaływań wybranych proleków z wybranymi substancjami pomocniczymi, takimi jak: mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia preżelowana, laktoza jednowodna i poliwinylpirolidon. W drugim etapie badań, określiłem profil modyfikacji fizykochemicznych i biologicznych proleków po ich wprowadzeniu do układów preformulacyjnych. Jako modelowe proleki w ramach prowadzonych badań zaproponowałem analogi z gupy pochodnych penamu - penicylin – piwampicylinę, z grupy pochodnych cefemu

- cefalosporyn – chlorowodorek cefetamet u piwoksylu oraz z grupy penemu – karbapenemów
- tebipenem piwoksyl.

Analiza tożsamości każdego z badanych proleków była prowadzona w dwóch obszarach: oceny proleku w postaci wolnej oraz po przygotowaniu mieszanin proszkowych wybranych proleków z substancjami pomocniczymi dla układów przygotowanych w stosunkach 1:1. W obu obszarach analizowano pasma charakterystyczne, ich intensywność i położenie w widmach (FT-IR). Jako referencyjne wartości przyjęto obecność pasm i ich intensywność na widmie FT-IR samych proleków.

W zakresie oceny efektów wprowadzenia proleku do układów preformulacyjnych wybranej substancji pomocniczej oceniano: zmiany szybkości rozpuszczania proleku, jego trwałości chemicznej, przenikalności proleku przez układy sztucznych błon biologicznych modelu żołądkowo-jelitowego oraz aktywności bakteriobójczej proleku w układzie preformulacyjnym.

Jako pierwszy prolek badano pochodną penemu – piwampicylinę. W efekcie prac preformulacyjnych przygotowano układy piwampicyliny z mannitolem, hydroksypropylometylocelulozą, skrobią przeżelowaną, laktozą jednowodną, stearynianem magnezu, poliwinylpirolidonem w stosunkach wagowych 1:1.

Badania tożsamości piwampicyliny prowadzono w oparciu o analizę położenia i intensywności pasm na widmach FT-IR opisanych w odniesieniu do pasm charakterystycznych, opisanych na widmie teoretycznym wygenerowanym przez zastosowanie teorii funkcyjonału gęstości (ang. density functional theory) z odpowiednim potencjałem obliczeniowym. Charakterystyczne pasma dla piwampicyliny w postaci wolnej zestawiono w tabeli 7. Analiza przesunięć pasm charakterystycznych na widmach w podczerwieni, zmiana ich intensywności pozwala wskazać jako zaangażowane w oddziaływania z substancjami pomocniczymi dwie domeny piwampicyliny: układ 7-okso-4-tia-1-azabicykloheptano-2-karboksyłanowy oraz podstawnik 2-amino-2-fenylacetylaminowy. Jako zmiany wskazujące na zaangażowanie domeny 7-okso-4-tia-1-azabicykloheptano-2-karboksyłanowej w oddziaływania z substancjami pomocniczymi należy wskazać zmiany kształtu i intensywności pasm odpowiadających drganiom rozciągającym pomiędzy wiązaniami C-C w zakresach $650\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, $850\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ oraz $1200\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$. Zmiany te z różną intensywnością były obecne na widmach w podczerwieni dla wszystkich badanych układów. Dla wybranych układów substancji pomocniczych to jest ze skrobią i

hydroksypropylometylocelulozą, zaobserwowano także zmiany w intensywności i kształtach pasm piwampicyliny, odpowiadających drganiom rozciągającym wiązań C–C w pierścieniu fenolowym w zakresach 1000–1080 cm⁻¹, drganiom zginającym wiązania N–C w grupie amidowej, co pozwala wskazać zaangażowanie szczególnie podstawnika 2-amino-2-fenylacetamidu w oddziaływania z tymi substancjami pomocniczymi. Co ciekawe, obserwowane zmiany kształtu i intensywności pasm odpowiadającym drganiom nożycowym dla wiązania C–H w zakresie 1450 cm⁻¹ i drganiom rozciągającym wiązań C=O w zakresie 1750–1820 cm⁻¹ dodatkowo mogą sugerować, że podstawnik piwaloilooksymetylowy także oddziałuje z takimi substancjami pomocniczymi jak: skrobia i hydroksypropylometyloceluloza.

Badania efektów wprowadzenia piwampicyliny do układów preformulacyjnych substancji pomocniczych: jej szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej oraz przenikalności przez układy błon biologicznych oceniano w oparciu o oznaczenia chromatograficzne. W tym celu opracowano metody HPLC-DAD lub HPLC-NQAD. Parametry walidacyjne metody HPLC-DAD zestawiono w tabeli 5. Wykazano selektywność opracowanej metody do oznaczeń zmian stężeń piwampicyliny w obecności produktu jej rozkładu ampicyliny oraz substancji pomocniczych. Jak wspomniano, piwampicylina mimo lipofilnego charakteru dobrze rozpuszcza się w wodzie, co jest efektem obecności formy obojnaczej. Żadna z użytych substancji pomocniczych, nie zmieniła istotnie pH roztworu zawierającego piwampicylinę. Przełożyło się to na fakt, że modyfikacje szybkości rozpuszczania piwampicyliny indukowane były tylko faktem utworzenia wiązań międzycząsteczkowych pomiędzy składnikami badanych mieszanin. Zmiany w szybkości rozpuszczania odnotowano dla układów piwampicyliny i skrobi w płynie akceptorowym o pH 1,2 (Wykres 1, strona 48) oraz płynie o wyższym pH (6,8) dla układów z mannitolem (Wykres 2, strona 48). Piwampicylina po wprowadzeniu do układu ze skrobią, rozpuszczała się z mniejszą szybkością w płynie akceptorowym o pH 1,2, natomiast w obecności mannitolu szybkość rozpuszczania piwampicyliny była większa w płynie akceptorowym o pH 6,8.

Badania trwałości chemicznej piwampicyliny prowadzono w warunkach podwyższonej wilgotności względnej i temperatury (RH 76,5% przy 348K) oraz warunkach niekontrolowanej wilgotności i podwyższonej temperatury (RH 0% przy 363K) pozwalając wskazać że substancje pomocnicze poliwinylpirolidon, laktoza i hydroksypropylometyloceluloza nie wpływają katalitycznie na konwersję piwampicyliny do ampicyliny, podczas gdy mannitol katalizował rozkład piwampicyliny. Wartościowym wnioskiem jest stabilizujący wpływ skrobi na trwałość piwampicyliny w odniesieniu do obu

labilnych wiązań: estrowego i amidowego. Należy zaznaczyć, że spadek trwałości chemicznej piwampicyliny w żadnym z badanych układów preformulacyjnych nie wiązał się ze zmianą kinetycznego mechanizmu rozkładu piwampicyliny. We wszystkich układach, obserwowany rozkład przebiegał zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Obecność skrobi, wobec obserwowanego jej oddziaływania z piwampicyliną oraz konsekwencji oddziaływań międzycząsteczkowych w zmniejszeniu szybkości rozpuszczania w płynie akceptorowym pH 1,2, była także istotna dla dynamiki przenikania przez układy symulujące błony jelitowe w płynie akceptorowym o pH 2,73. W badanym modelu z użyciem PAMPA, układ piwampicyliny ze skrobią wykazywał lepszą przenikalność po rozpuszczeniu w płynie akceptorowym o pH 2,73. Natomiast w układach, w płynie akceptorowym o pH 6,204 układy piwampicyliny z poliwinylpirolidonem, laktozą i hydroksypropylometylocelulozą sprzyjały jej większej przenikalności (Wykres 5, strona 50). W płynie akceptorowym o pH 6,204 piwampicylina gorzej przenikała z układów preformulacyjnych mannitolu i skrobi. Spadek przenikalności piwampicyliny w układach z mannitolem można łączyć paradoksalnie ze wzrostem jej rozpuszczalności, co może stanowić ograniczenie dyfuzji w warstwie błony lipofilnej. Obecność swego rodzaju filmu wokół piwampicyliny przez cząsteczki skrobi może być sugerowana jako przyczyna spadku rozpuszczalności i blokowania kontaktu piwampicyliny z układami błonowymi użytymi w eksperymencie.

Uzupełnieniem dla badań fizykochemicznych przeprowadzonych z udziałem układów substancji pomocniczych zawierających piwampicylinę były badania aktywności mikrobiologicznej. Badania bakteriobójcze działania piwampicyliny wykazały spadek aktywności obserwowany w formie obniżenia wartości MIC. Dla układów połączeń piwampicyliny z substancjami pomocniczymi hydroksypropylometylocelulozą i poliwinylpirolidonem odnotowano polepszenie aktywności bakteriobójczej względem szczepów klinicznych *Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium*. W przypadku pozostałych połączeń nie obserwowano spadku aktywności bakteriobójczej piwampicyliny po jej wprowadzeniu do układów preformulacyjnych (Tabela 8, str. 51).

Mimo, że piwampicylina stosowana jest w leczeniu od roku 1986, w literaturze przedmiotu znajduje się niewiele wyników badań definiujących jej specyfikę zachowania w układach z substancjami pomocniczymi w obszarze wyznaczania szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej i biodostępności. Uzyskane wyniki badań, prezentowane w niniejszej pracy, potwierdzają wcześniejsze obserwacje. Najważniejsze spójne obszary to:

- zwiększona nietrwałość chemiczna piwampicyliny wyznaczona podczas badań trwałości w fazie stałej, po jej połączeniu z mannitolem, sprzyjającym utworzeniu warunków do hydrolizy kwasowej. Wyniki wcześniejszych prac traktujących o nietrwałości chemicznej piwampicyliny w środowisku jelit wskazywały tą samą ścieżkę rozkładu jako preferencyjną uwarunkowaną pierwszeństwem rozpadu wiązania estrowego wobec wiązania amidowego w strukturze proleku [115],
- możliwe różnice w przenikaniu przez błony biologiczne symulujące układ pokarmowy w zależności od mikrośrodowiska (głównie zmian pH), determinującego występowanie jonu obojnego piwampicyliny, której obecność jest skorelowana z rozpuszczalnością i przenikalnością piwampicyliny. Wyniki badań przenikalności piwampicyliny w postaci wolnej z użyciem modelu Caco-2 potwierdzają zmienność wchłaniania piwampicyliny zdeterminowaną obecnością przenośników białkowych oraz zmianą ładunku wynikającą ze zmiany jonu obojnego piwampicyliny podczas jej konwersji do ampicyliny, która jest kwasową pochodną [116].
- modyfikacje aktywności bakteriobójczej w efekcie oddziaływania chemioterapeutyku z biopolimerami, gdzie mechanizm wzrostu aktywności bakteriobójczej po połączeniu z wybranym biopolimerem może wynikać z opóźnionego uwalniania z jego struktury, chelatowania jonów metali centrów aktywnych β -laktamaz czy oddziaływania z kanałami porynowymi bakterii i hamowaniem procesu *efflux* [117, 116].

Drugim z badanych analogów β -laktamowych był chlorowoderek cefetamet u piwoksylu. Jest on przedstawicielem pochodnych cefemu. W pierwszym etapie badań przygotowano układy cefetamet u z substancjami pomocniczymi: mannitolem, hydroksypropylometylocelulozą, przeżelowaną skrobią, laktozą, poliwinylpirolidonem i połączono w stosunkach wagowych 1:1. Łącząc badania tożsamości chemicznej chlorowodoru cefetamet u piwoksylu oraz badania preformulacyjne przygotowanych układów, zastosowano podejście do analizy zmian widm w podczerwieni cefetamet u piwoksylu po jego wprowadzeniu do układu z substancjami pomocniczymi, stosując wartości referencyjne położenie, intensywność i rodzaj pasm charakterystycznych na widmach chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w postaci wolnej. Dokładna analiza pasm charakterystycznych na widmach w podczerwieni badanego związku była prowadzona w oparciu o widmo teoretyczne wygenerowane w wyniku obliczeń kwantowo chemicznych opartych na wykorzystaniu teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory) z odpowiednim potencjałem obliczeniowym. Pasma charakterystyczne istotne dla potwierdzenia tożsamości chlorowodoru cefetamet u piwoksylu zestawiono w

tabeli 10 na str. 54. Analiza zmian na widmach w podczerwieni wyznaczonych dla układów preformulacyjnych pozwoliła wskazać układ z mannitolem jako wyróżniający się w odniesieniu do występowania oddziaływań międzycząsteczkowych proleku-substancji pomocniczej. Zmiany w pasmach położonych przy 988 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym pomiędzy wiązaniem C-C grupy piwoksylowej i występujące przy 1038 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym C-N i N-O układu sprzężonego pierścienia β -laktamowego z pierścieniem tiazolowym pozwalają wskazywać jako domeny analogu cefemu zaangażowaną w oddziaływanie z substancjami pomocniczymi 2-metoksyiminoacetylaminową grupę i układ sprzężonych pierścieni. Podobne zmiany, chociaż o bardziej subtelnym charakterze zostały także zaobserwowane dla układu chlorowodoru cefetamet u piwoksylu z poliwinylpirolidonem. W przypadku pozostałych układów preformulacyjnych nie odnotowano żadnych zmian w widmach antybiotyku po jego wprowadzeniu w odniesieniu do pasm wskazanych jako charakterystyczne dla chlorowodoru cefetamet u piwoksylu w postaci wolnej.

Drugim obszarem badań była ocena efektów powstania układów chlorowodoru cefetamet u piwoksylu z substancjami pomocniczymi (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna i poliwinylpirolidon). Podobnie jak w przypadku pozostałych pochodnych oceniono szybkość rozpuszczania, trwałość chemiczną oraz przenikalność przez układy błon biologicznych proleku. Zmiany stężenia chlorowodoru cefetamet u piwoksylu monitorowano stosując metody HPLC-DAD i HPLC-NQUAD. Zastosowanie detektora NQUAD pozwoliło na sprawdzenie ścieżki rozkładu badanego związku. Rozkład wiązania estrowego w badanym analogu cefemu był jedyną ścieżką rozkładu w badanych warunkach. W tabeli 5 zestawiono parametry walidacyjne oznaczania cefetamet u we wszystkich otrzymanych płynach akceptorowych. Oznaczenia chromatograficzne pozwoliły wykluczyć istotne zmiany w szybkościach rozpuszczania chlorowodoru cefetamet u piwoksylu po jego wprowadzeniu do układów substancji pomocniczych. Brak zdefiniowanego wpływu substancji pomocniczych na rozpuszczanie cefetamet u jest uzasadnione brakiem występowania istotnych oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy substancją pomocniczą a badanym prolekiem ($f_1 \geq 0$ i $f_2 \leq 0$). Charakter obojnaczy badanego związku jest efektem obecności zarówno wiązania estrowego, jak i formy soli, co uzasadnia jego inertność w oddziaływaniu z substancjami pomocniczymi wyznaczone na podstawie widm podczerwieni FT-IR. Taka struktura analogu cefemu zapewnia jednak jemu pH-zależność, dynamikę szybkości rozpuszczania w odniesieniu do pH środowiska akceptorowego, w którym badana była szybkość rozpuszczania. Szybkość

rozpuszczania chlorowodoru cefetamet piwoksylu w postaci wolnej oraz układach z substancjami pomocniczymi w płynie akceptorowym o pH 6.8 była mniejsza niż w przypadku płynu akceptorowego o pH 1,2. Nie odnotowano różnic w szybkości rozpuszczania dla badanych układów preformulacyjnych.

Badania trwałości chemicznej chlorowodoru cefetamet piwoksylu prowadzono w warunkach o podwyższonej wilgotności względnej (RH=70%, T=348K) oraz warunkach niekontrolowanej wilgotności i podwyższonej temperatury (RH=0, T=363K). Obserwowana zmiana stężeń cefetamet w funkcji czasu ekspozycji na działanie temperatury i podwyższonej wilgotności pozwoliły na wskazanie, że rozkład analogu cefemu przebiegł zgodnie z reakcją pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu. Niezależnie także od warunków rozkładu powstawały te same produkty, będące efektem rozpadu wiązania estrowego. Na podstawie wielkości zmian stężeń badanego proleku można wskazać, że połączenie z poliwinylpirolidonem i hydroksypropylometylocelulozą indukowały katalityczny wpływ na rozkład cefetamet (Wykres 8, 9, strona 58).

Obok badań trwałości chemicznej chlorowodoru cefetamet piwoksylu, prowadzono badania oceny przenikalności cefetamet po jego rozpuszczeniu w płynach akceptorowych, przez błony symulujące nabłonek układu pokarmowego odpowiadających pH treści żołądkowej (pH 2,73) oraz treści jelitowej (pH 6,20). Co ciekawe, samo już pH było czynnikiem determinującym wchłanianie cefetamet piwoksylu. W środowisku zasadowym cefetamet piwoksyl wykazywał lepszą przenikalność niż w przypadku płynu akceptorowego o pH kwasowym. Wyniki tych badań stanowią potwierdzenie korzystnego wpływu wzrostu biodostępności dla postaci soli. Wyznaczone pozornie współczynniki przenikalności chlorowodoru cefetamet piwoksylu po jego wprowadzeniu do układów preformulacyjnych wybranych substancji pomocniczych osiągnęły niższe wartości niż dla proleku dla postaci wolnej (Wykres 10, Strona 59). Wszystkie z zastosowanych substancji pomocniczych (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia preżelowana, laktoza jednowodna i poliwinylpirolidon) ograniczały wchłanianie chlorowodoru cefetamet piwoksylu z płynu akceptorowego o pH 2,73. W przypadku płynu akceptorowego o pH 6,20 połączenia chlorowodoru cefetamet piwoksylu z mannitolem i poliwinylpirolidonem zwiększały jego przenikalność. Podobnie jak w przypadku układów preformulacyjnych piwampicyliny także połączenia chlorowodoru cefetamet piwoksylu z wybranymi substancjami pomocniczymi (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia preżelowana, laktoza jednowodna i poliwinylpirolidon) zostały ocenione pod kątem aktywności bakteriobójczej układów (Tabela 11, strona 60). Najniższe wartości MIC odnotowano dla gatunków *Proteus mirabilis*,

Klebsiella pneumoniae, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*). Dodatek substancji pomocniczych modyfikujący wartości MIC chlorowodoru cefetametu piwoksylu w połączeniu z mannitolem i laktozą powodował wzrost wartości MIC, co można tłumaczyć dostarczeniem potencjalnego źródła węgla wykorzystywanego przez bakterie w wybranych procesach metabolicznych. Wyjątkiem od tej zależności były uzyskiwane wartości MIC dla połączeń mannitolu i laktozy w ocenie potencjału bakteriobójczego chlorowodoru cefetametu piwoksylu względem *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* oraz *Salmonella typhimurium*. Połączenia cefetamet z poliwinylpirolidonem i hydroksypropylometylocelulozą charakteryzowały się obniżonymi wartościami MIC. Różnice w MIC wyznaczonych dla samego antybiotyku oraz jego układów z substancjami pomocniczymi były największe wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*. Szczególnie duże różnice były obserwowane dla MIC wyznaczonych wobec *Pseudomonas aeruginosa*.

Chlorowodorek cefetamet piwoksylu jest stosowany w leczeniu od roku 1988. Otrzymane wyniki badań w zakresie oceny szybkości rozpuszczania, przenikania przez błony biologiczne symulujące układ pokarmowy miały charakter pionierski. W literaturze przedmiotu znajdują się informacje na temat badań preformulacyjnych cefetamet z substancjami pomocniczymi, ukierunkowane na maskowanie jego gorzkiego smaku [118]. Wybór substancji pomocniczych w badaniach opublikowanych przez inne zespoły badawcze oraz te wybrane do badań prezentowanych w niniejszej pracy był spójny. Skrobia, hydroksypropylometyloceluloza, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon były substancjami pomocniczymi najczęściej dedykowanymi do prowadzenia badań preformulacyjnych z udziałem cefetamet [119]. Badania trwałości chemicznej chlorowodoru cefetamet piwoksylu po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych były uzupełnieniem badań literaturowych .

Ostatnim z badanych proleków był pierwszy doustny karbapenem – tebipenem piwoksyl. Procedura badań otrzymania preformulacyjnych układów tebipenemu piwoksylu była taka sama jak w przypadkach dwóch pozostałych proleków. Jako substancje pomocnicze do badań preformulacyjnych zastosowano: mannitol, hydroksypropylometylocelulozę, skrobię przeżelowaną, laktozę jednowodną, poliwinylpirolidon. Opierając się na obliczeniach kwantowo-chemicznych wygenerowano widmo teoretyczne tebipenemu piwoksylu, na którym wyznaczono charakterystyczne pasma istotne dla potwierdzenia tożsamości badanego proleku (Ryc. 26, Tabela 13). Po przygotowaniu układów preformulacyjnych tebipenemu

piwoksylu oszacowano oddziaływania prolek-substancja pomocnicza w przygotowanych układach, wykorzystując pasma charakterystyczne, ich intensywność oraz położenie dla tebipenemu piwoksylu w postaci wolnej jako wartości odniesienia. Dla układów preformulacyjnych skrobi, hydroksypropylometylocelulozy, poliwinylpirolidonu nie odnotowano zmian w położeniu pasm charakterystycznych. Natomiast w układach preformulacyjnych mannitolu i laktozy z tebipenemem piwoksylem odnotowano zmiany, które pozwalają stwierdzić obecność oddziaływań międzycząsteczkowych o potencjalnym wpływie na właściwości fizykochemiczne proleku. W układach preformulacyjnych tebipenemu piwoksylu z mannitolem zmiany te dotyczyły intensywności, zmian kształtu i położenia pasm. Najistotniejsze zmiany odnotowano dla pasm położonych przy 1800 cm^{-1} , odpowiadają one drganiom rozciągającym pomiędzy C=O w grupie karbonylowej, dla pasm przy 1211 cm^{-1} odpowiadającym drganiom zginającym wiązania C-O-H w grupie karboksylowej oraz drganiom wiązania N-C położonym przy ok. 1710 cm^{-1} układu pierścieni zawierający strukturę β -laktamową oraz pasm dla drgań rozciągających wiązania C=N w układzie pierścieni β -laktamowych. Nie należy zapominać też o zmianach w obrębie pasm leżących powyżej 3000 cm^{-1} , które informują nas o zmianach drgań rozciągających dla wiązań O-H w badanym układzie preformulacyjnym mannitolu.

Analiza widm układu preformulacyjnego tebipenemu piwoksylu z laktozą pozwoliła wskazać jako obszary ze zmienioną intensywnością pasm i kształtem zakresy $500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, $1300\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ oraz powyżej 3000 cm^{-1} . Zmiany intensywności w obszarze do 1200 cm^{-1} należy łączyć z zaangażowaniem w oddziaływania z laktozą pierścienia β -laktamowego. Podczas gdy w zakresie $1300\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ szczególne zmiany obserwowane były przy 1450 cm^{-1} , co odpowiadało zmianom intensywności drgań nożycowych, wachlarzowych w łańcuchu alifatycznym podstawnika estrowego.

Po przeprowadzeniu badań tożsamości układów preformulacyjnych opracowano metody HPLC-DAD, odpowiednio selektywne do oznaczenia tebipenemu piwoksylu w obecności produktów jego rozkładu (tebipenemu) oraz substancji pomocniczych. Metoda HPLC-DAD stosowana w niniejszej pracy była adaptacją metody dla oznaczenia tebipenemu piwoksylu w warunkach przyspieszonego starzenia [120]. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono rewalidację metody HPLC-DAD mając na uwadze zmiany rozpuszczalności w zastosowanych płynach akceptorowych podczas badań szybkości rozpuszczania.

Podobnie jak w przypadkach poprzednich proleków ocenę właściwości fizykochemicznych po wprowadzeniu proleku do układów preformulacyjnych prowadzono w odniesieniu do

zmian szybkości rozpuszczania, ocenę trwałości chemicznej oraz dynamiki przenikalności przez układy błon biologicznych na drodze dyfuzji biernej, stosując model PAMPA GIT.

Tebipenem piwoksyl nie wykazywał zależności zmian szybkości rozpuszczania od pH płynu akceptorowego ($f_1 \geq 0$ i $f_2 \leq 100$). W obu badanych układach akceptorowych krzywe rozpuszczania tebipenemu piwoksylu miały podobne kształty i osiągały poziomy „plateau” dla takich samych poziomów wysycenia substancji rozpuszczanej. Nieznaczne odstępstwa obserwowano dla mieszaniny preformulacyjnej z laktozą ale miały one charakter zmian subtelnych ($f_1=20,89$ i $f_2=73,89$).

Badania trwałości tebipenemu piwoksylu w mieszaninach preformulacyjnych były prowadzone w warunkach podwyższonej wilgotności (RH=70%, T=363K) oraz niekontrolowanej wilgotności (RH=0, T=363K) przy podwyższonych temperaturach. Niezależnie od warunków ekspozycji podczas badań przyspieszonego starzenia tebipenem piwoksyl rozkładał się zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Niezależnie od użytych substancji pomocniczych do przygotowania układów preformulacyjnych, podwyższona wilgotność powietrza była czynnikiem silnie predysponującym rozkład tebipenemu piwoksylu. W przypadku układów preformulacyjnych, dla których odnotowano fakt obecności wiązań międzycząsteczkowych rozkład tebipenemu piwoksylu był większy, zwłaszcza w układach z mannitolem. Układy preformulacyjne z mannitolem i laktozą, nie wyróżniały się natomiast w odniesieniu modyfikacji wartości współczynników przenikania, niezależnie od pH płynów akceptorowych. Przenikalność tebipenemu piwoksylu po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych była porównywalna w odniesieniu do jego przenikalności w postaci wolnej. Wyróżnikiem była przenikalność tebipenemu piwoksylu w układzie preformulacyjnym z hydroksypropylometylocelulozą po rozpuszczeniu w płynie akceptorowym o pH 6,204 (Wykres 15, str. 68).

Podobnie jak w przypadkach pozostałych proleków wymaganym uzupełnieniem były badania aktywności bakteriobójczej po wprowadzeniu proleku do układu preformulacyjnego. Co ciekawe w przypadku wszystkich badanych układów preformulacyjnych odnotowano spadek wartości minimalnego stężenia hamującego. Spadki te były obserwowane także w przypadku badań aktywności bakteriobójczej wobec szczepów klinicznych. Największe różnice były obserwowane w ocenie potencjału bakteriobójczego tebipenu piwoksylu w układzie preformulacyjnym z laktozą, hydroksypropylometylocelulozą, mannitolem, poliwinylpirolidonem wobec *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* (Tabela 14 str. 69).

W literaturze przedmiotu znajdują się wyniki badań traktujące o ograniczeniu terapii karbapenemami, wynikające z ich znacznej nietrwałości chemicznej. Uzyskane wyniki badań, prezentowane w niniejszej pracy, potwierdzają i są spójne z wcześniej prowadzonymi badaniami nad tebipenem piwoksyliem. Najważniejsze spójne obszary to:

- wyznaczenie podobnego profilu rozkładu tebipenemu piwoksyliu w obecności substancji pomocniczej w odniesieniu do mechanizmu kinetycznego rozkładu tebipenemu w postaci wolnej [121],
- wyznaczenie spójnego profilu aktywności bakteriobójczej tebipenemu piwoksyliu, która może być pozytywnie modyfikowana poprzez łączenie z biopolimerami hamującymi zjawisko effluxu bakteryjnego, istotnego dla występowania oporności bakteryjnej [120, 122].

Mając na uwadze równowagę zmiennych definiujących zmiany fizykochemiczne i aktywność biologiczną proleków po wprowadzeniu ich do wybranych układów preformulacyjnych w końcowym etapie pracy zastosowałem analizę głównych składowych (PCA). Otrzymane dane dla kolejnych układów preformulacyjnych badanych proleków wystandaryzowano do zerowej średniej i jednostkowego odchylenia standardowego. W efekcie możliwe było traktowanie otrzymanych zmiennych jako wystandaryzowanych zmiennych regresji liniowej

$$X_1+X_2+\dots+X_n+-Z_1+-Z_2\dots+-Z_m=y$$

gdzie x_1-x_2 zmienne o współczynniku dodatnim oraz z_1-z_2 zmienne o współczynniku ujemnym a y to nieznaną miarę oceny układu. Ostatecznie wynikami powyższego równania były możliwości uzyskania połączeń piwampicyliny z hydroksypropylometylocelulozą, chlorowodoru cefetamet piwoksyliu z poliwinylpirolidonem oraz tebipenemu piwoksyliu z poliwinylpirolidonem jako preformulacyjny układ z największym potencjałem zmian we wszystkich badanych obszarach.

7. WNIOSKI

Badania preformulacyjne proleków β -laktamowych antybiotyków dostarczyły istotnych wskazówek dotyczących modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej, przenikalności przez błony biologiczne symulujące ściany układu pokarmowego oraz aktywności bakteriobójczej.

Zastosowane metody analityczne: spektrofotometria w podczerwieni do oceny tożsamości badanych proleków β -laktamowych w fazie stałej oraz oznaczenia chromatograficzne zmian stężenia w roztworach badanych proleków analogów β -laktamowych spełniały wszystkie wymagania zadane do analizy labilnych substancji aktywnych, włączając wykluczenie zmian analitów w warunkach oznaczeń.

Domeny analogów β -laktamowych zaangażowane w oddziaływania międzycząsteczkowe z substancjami pomocniczymi obejmowały różne grupy funkcyjne i elementy szkieletu β -laktamowego, jak również podstawnika estrowego.

Szybkość rozpuszczania kolejnych analogów β -laktamowych była silnie uwarunkowana ich formą jonową oraz pH płynu akceptorowego, w którym prowadzono eksperyment. Wpływ użytych substancji pomocniczych odgrywał drugoplanową rolę w modyfikowaniu dynamiki szybkości rozpuszczania dla badanych proleków analogów β -laktamowych.

Badania trwałości chemicznej analogów β -laktamowych wykluczyły możliwość zmiany kinetycznego mechanizmu ich rozkładu w warunkach badań przyspieszonego rozkładu. Stabilizujący i katalityczny wpływ użytych substancji pomocniczych został potwierdzony w przypadkach modelowych wybranych proleków antybiotyków β -laktamowych.

Dynamika przenikania przez błony symulujące transport przez ściany układu żołądkowo-jelitowego była wypadkową ładunku badanych proleków β -laktamowych, stabilności formy estrowej, pH środowiska płynu akceptorowego oraz obecności substancji pomocniczych.

Aktywność bakteriobójcza układów preformulacyjnych proleków β -laktamowych (piwampicylina, cefetamet piwoksył, tebipenem piwoksył) ulegała silnym modyfikacjom. Wszystkie zaobserwowane zmiany zwiększały potencjał działania bakteriobójczego użytych w badaniu analogów proleków β -laktamowych.

8. STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie badań układów preformulacyjnych proleków z grup antybiotyków β -laktamowych z wybranymi substancjami pomocniczymi. Jako modelowe proleki o aktywności bakteriobójczej wybrano piwampicylinę (pochodną penamu), chlorowodorek cefetamet u piwoksylu (pochodną cefemu) oraz tebipenem piwoksyl (pochodną karbapenemu). Układy preformulacyjne przygotowano w stosunku wagowym 1:1 z substancjami pomocniczymi (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon).

Badania tożsamości piwampicyliny, chlorowodorku cefetamet u piwoksylu oraz tebipenem u piwoksylu prowadzono w oparciu o identyfikację oraz charakterystykę pasm na widmach spektroskopowych w podczerwieni. Wsparciem w identyfikacji charakterystycznych pasm były obliczenia kwantowo-chemiczne. Zmiany położenia, intensywności pasm charakterystycznych w spektroskopii w podczerwieni proleków po ich wprowadzeniu do układów preformulacyjnych pozwoliły wskazać domeny proleków zaangażowane w oddziaływanie z kolejnymi substancjami pomocniczymi. Efektami wprowadzenia proleku do układów preformulacyjnych były modyfikacje w odniesieniu do szybkości rozpuszczania proleku, jego aktywności chemicznej i przenikalności przez układ modelowy PAMPA GIT. Zmiany stężeń proleków oznaczano chromatograficznie. W tym celu opracowano i zwalidowano odpowiednie metody HPLC-DAD/NQAD. Uzupełnieniem badań fizykochemicznych były oznaczenia mikrobiologicznej aktywności bakteriobójczej proleków antybiotyków β -laktamowych po ich wprowadzeniu do układów preformulacyjnych. Oznaczenie aktywności bakteriobójczej proleków prowadzono metodą studzienkową, oznaczając minimalne stężenie hamujące (MIC).

Zmiany intensywności i położenia charakterystycznych pasm w spektroskopii w podczerwieni piwampicyliny po jej wprowadzeniu do układów preformulacyjnych pozwala wskazać układ 7-okso-4-tia-1-azabicykloheptanowy-2-karboksyloaminowy i podstawnik 2-amino-fenylacetyloaminowy jako zaangażowane w oddziaływanie ze skrobią i hydroksypropylometylocelulozą. Analiza zmian fizykochemicznych piwampicyliny po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych wykazała: zmiany szybkości rozpuszczania piwampicyliny dla układów ze skrobią i mannitolem w płynach akceptorowych o różnym pH ($f_1=7,08$ i $f_2=51,08$), katalityczny wpływ mannitolu na rozkład piwampicyliny w warunkach

przyspieszonego starzenia oraz zmiany przenikalności przez błony modelu PAMPA GIT dla wszystkich układów preformulacyjnych, w zależności pH płynu akceptorowego.. Dla układów połączeń piwampicyliny z substancjami pomocniczymi hydroksypropylometylocelulozą i poliwinylpirolidonem odnotowano polepszenie aktywności bakteriobójczej względem szczepów klinicznych *Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella typhimurium*. W przypadku pozostałych połączeń nie obserwowano spadku aktywności bakteriobójczej piwampicyliny po jej wprowadzeniu do układu preformulacyjnego. Analiza PCA pozwoliła wskazać układ preformulacyjny piwampicyliny z hydroksypropylometylocelulozą jako najbardziej optymalny w odniesieniu do wszystkich obserwowanych zmian.

W strukturze chlorowodoru cefetamet piwoksyli w oddziaływaniu z substancjami pomocniczymi: mannitolem i poliwinylpirolidonem były zaangażowane grupa 2-metoksyiminoaminowa i układ pierścieniowy. Zastosowane substancje pomocnicze nie wpływały na szybkość rozpuszczania chlorowodoru cefetamet piwoksyli ($f_{1\geq 0}$ i $f_{2\leq 100}$), tylko pH płynu akceptorowego. Podczas badań przyspieszonego starzenia rozkład chlorowodoru cefetamet piwoksyli był katalizowany przez poliwinylpirolidon i hydroksypropylometylocelulozę. W zasadowym płynie akceptorowym chlorowodorek cefetamet piwoksyli wykazuje lepszą przenikalność przez błony biologiczne w modelu PAMPA GIT niż w płynie akceptorowym o pH kwasowym. Substancje pomocnicze ograniczały przenikalność chlorowodoru cefetamet piwoksyli. Większość układów preformulacyjnych charakteryzowało się lepszą aktywnością bakteriobójczą niż sam prolek. Tylko układy preformulacyjne z mannitolem i laktozą miały niższą aktywność bakteriobójczą wobec wybranych drobnoustrojów. Bazując na wynikach analizy zmiennych składowych jako najlepszy należy wskazać układ chlorowodoru cefetamet piwoksyli z poliwinylpirolidonem.

Tebipenem piwoksyli oddziaływał poprzez grupy karbonylową i karboksylową oraz układ strukturalny pierścienia β -laktamowego z mannitolem i laktozą w układach preformulacyjnych. Żadna z zastosowanych substancji pomocniczych ($f_{1\geq 0}$ i $f_{2\leq 100}$), nie wpływała na zmianę szybkości rozpuszczania proleku. Wyniki badań przyspieszonego rozkładu, wykazały że silniejszym czynnikiem determinującym rozkład tebipenemu piwoksyli była wilgotność niż fakt łączenia z substancjami pomocniczymi. Także podczas

badania przenikania, zastosowane substancje pomocnicze nie zmieniały znacząco wartości pozornych stałych przenikania. Badane układy preformulacyjne charakteryzował lepszy potencjał działania bakteriobójczego niż w przypadku samego proleku. Analiza głównych składników pozwala wskazać układ preformulacyjny tebipenemu piwoksylu z poliwinylpirolidonem jako najbardziej strategiczny dla rozwoju przyszłych formułacji.

9. SUMMARY

The aim of this study was to conduct research on preformulations of prodrugs from β -lactam antibiotics with selected excipients. As the model prodrugs with bactericidal activity, pivampicillin (penam), cefetamet pivoxil hydrochloride (cefem) and tebipenem pivoxil (carbapenem) were selected. Preformulation systems were prepared in a 1: 1 weight ratio with excipients (mannitol, hydroxypropylmethylcellulose, starch, lactose monohydrate, polyvinylpyrrolidone).

Identity studies of pivampicillin, cefetamet pivoxil hydrochloride and tebipenem pivoxil were carried out based on the identification and characterization of bands of infrared spectra. Quantum-chemical calculations were a support in identifying characteristic bands. Changes in the position, intensity of characteristic bands of infrared spectroscopy of prodrugs after their introduction into preformulation systems allowed to indicate prodrug domains involved in interaction with further excipients. The effects of introducing the prodrug into the preformulation systems were investigated in relation to the dissolution rate of the prodrug, its chemical stability and permeability through the PAMPA GIT model system. Changes in the concentrations of prodrugs were determined chromatographically. The HPLC-DAD/(NQAD) methods were developed and validated. The supplementation of physicochemical tests was the determination of microbial bactericidal activity of β -lactam antibiotic prodrugs after their introduction into preformulation systems. Determination of bactericidal activity of prodrugs was carried out using the well method, determining the minimum inhibitory concentration (MIC).

Changes in the intensity and position of characteristic bands of infrared spectra of pivampicillin after its introduction into preformulation systems indicate the 7-oxo-4-thia-1-azabicycloheptane-2-carboxylate system and 2-amino-phenylacetamino substituent as involved in interaction with starch and hydroxypropylmethylcellulose. Analysis of physicochemical changes of pivampicillin after introduction into preformulation systems revealed changes in dissolution rate in acceptor fluids ($f_1=7,08$ i $f_2=51,08$) with different pH for starch and mannitol systems, catalytic mannitol influence on degradation of pivampicillin under accelerated aging conditions and change of permeability through PAMPA GIT membranes for all preformulation systems, in pH dependence of the acceptor liquid. For the

combination of pivampicillin with the excipients hydroxypropylmethylcellulose and polyvinylpyrrolidone, an improvement in bactericidal activity against the clinical strains *Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* was noted. In the case of the remaining joints, no decrease in the bactericidal activity of pivampicillin was observed after its introduction into the preformulation system. PCA analysis allowed to indicate the preformulation system of pivampicillin with hydroxypropylmethylcellulose as the most optimal for all observed changes.

The 2-methoxyimino amino group and the ring system were involved in the structure of cefetamet pivoxil hydrochloride in interactions with excipients mannitol and polyvinylpyrrolidone. The used excipients did not affect the dissolution rate of cefetamet pivoxil hydrochloride ($f_1 \geq 0$ i $f_2 \leq 100$), only the pH of the acceptor fluid. During the study, the degradation of the cefetamet pivoxil hydrochloride was catalysed by polyvinylpyrrolidone and hydroxypropylmethylcellulose. In the basic acceptor fluid, the cefetamet pivoxil hydrochloride shows better permeability through the biological membranes of the PAMPA GIT model than in the acceptor with acidic pH. Excipients reduced the permeability of cefetamet pivoxil hydrochloride. Most preformulation systems were characterized by better bactericidal activity than the prodrug itself. Only the preformulation systems with mannitol and lactose against selected microorganisms had higher bactericidal activity. Based on the results of the variable component analysis, the system of cefetamet pivoxil hydrochloride and polyvinylpyrrolidone should be indicated as the best.

The tebipenem pivoxil interacted with the carbonyl and carboxyl groups and the structural system of the β -lactam ring with mannitol and lactose in the preformulations. None of the applied excipients changes in the rate of prodrug solubility ($f_1 \geq 0$ i $f_2 \leq 100$). The results of the accelerated decomposition studies showed that the stronger factor determining the degradation of tebipenem pivoxil was the humidity than the presence of individual excipients. Also during permeation tests, the used excipients did not significantly change the apparent values of coefficients of permeability. The preformulation systems tested had better bactericidal potential than those of the prodrug itself. Analysis of the main components allows to indicate as a preformulation system for tebipenem pivoxil with polyvinylpyrrolidone as the most strategic for the development of future formulation

10. SPIS RYSUNKÓW

Ryc. 1. Budowa chemiczna układu β -laktamowego pochodnych penemu.	4
Ryc. 2. Budowa chemiczna układu β -laktamowego pochodnych cefemu.	5
Ryc. 3. Budowa chemiczna układu β -laktamowego pochodnych penemu.	7
Ryc. 4. Budowa aztreonamu.	8
Ryc. 5. Budowa kwasu klawulanowego.	9
Ryc. 6. Wpływ pH na trwałość CPS, CSS i CZH w roztworach wodnych [33].	12
Ryc. 7. Półlogarytmiczne wykresy zależności $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$ reakcji rozkładu ertapenemu (●)	13
Ryc. 8. Miejsce estyfikacji prowadzącej do utworzenia proleków dla kolejnych grup analogów β -laktamowych.	14
Ryc. 9. Wzór strukturalny piwampicyliny.	17
Ryc. 10. Produkty rozkładu piwampicyliny powstające pod wpływem esteraz tkankowych..	17
Ryc. 11. Wzór strukturalny cefetamet u piwoksyłu.	18
Ryc. 12. Wzór strukturalny tebipenemu piwoksyłu.	19
Ryc. 13. Schemat badania aktywności mikrobiologicznej metodą studzienkową.	39
Ryc. 14. Widmo FT-IR piwampicyliny eksperymentalne i teoretyczne.	44
Ryc. 15. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie ze skrobią.	46
Ryc. 16. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z HPMC.	46
Ryc. 17. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z mannitolem.	46
Ryc. 18. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z laktozą.	47
Ryc. 19. Widma FT-IR piwampicyliny w mieszaninie z PVP.	47
Ryc. 20. Widmo FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu eksperymentalne i teoretyczne.	53
Ryc. 21. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu w mieszaninie ze skrobią.	55
Ryc. 22. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu w mieszaninie z HPMC.	55
Ryc. 23. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu w mieszaninie z mannitolem.	55
Ryc. 24. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu w mieszaninie z laktozą.	56
Ryc. 25. Widma FT-IR chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu z PVP.	56
Ryc. 26. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksyłu eksperymentalne i teoretyczne.	62
Ryc. 27. Widmo FT-IR tebipenemu piwoksyłu w mieszaninie ze skrobią.	64

11. SPIS TABEL

Tabela 1. Zestawienie parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych wybranych przykładów proleków [48]	16
Tabela 2. Warunki rozdzielania techniki cienkowarstwowej chromatografii cieczowej wybranych analogów β -laktamowych.....	24
Tabela 3. Warunki rozdzielania chromatograficznego HPLC-DAD wybranych analogów β -laktamowych	24
Tabela 4. Warunki rozdzielania chromatograficznego oznaczenia wybranych proleków β -laktamowych	41
Tabela 5. Walidacja metod chromatograficznych do oceny zawartości piwampicyliny, cefetametu piwoksylu i tebipenemu piwoksylu	42
Tabela 6. Wyniki dla walidowanych parametrów proleków β -laktamowych.....	43
Tabela 7. Wybrane charakterystyczne pasma dla piwampicyliny	45
Tabela 8. Wartości MIC piwampicyliny z substancjami pomocniczymi.....	51
Tabela 9. Podobieństwa zmiennych dla układów piwampicyliny	52
Tabela 10. Wybrane charakterystyczne pasma dla chlorowodoru cefetamet u piwoksylu.....	54
Tabela 11. Wartości MIC cefetamet u piwoksylu z substancjami pomocniczymi	60
Tabela 12. Podobieństwa zmiennych dla układów chlorowodoru cefetamet u piwoksylu.....	61
Tabela 13. Wybrane charakterystyczne pasma tebipenemu piwoksylu	63
Tabela 14. Wyniki aktywności mikrobiologicznej tebipenemu piwoksylu z substancjami pomocniczymi	69
Tabela 15. Podobieństwa zmiennych dla układów tebipenemu piwoksylu	69

12. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Profil rozpuszczania piwampicyliny z substancjami pomocniczymi w pH 1,2.	48
Wykres 2. Profil rozpuszczania piwampicyliny z substancjami pomocniczymi w pH 6.8.	48
Wykres 3. Stabilność chemiczna piwampicyliny w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 348K, RH=70%.	49
Wykres 4. Stabilność chemiczna piwampicyliny w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 363K, RH=0%.	49
Wykres 5. Wartości pozornych współczynników przenikalności piwampicyliny w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi.	50
Wykres 6. Profil rozpuszczania cefetamet u piwoksyl u z substancjami pomocniczymi w pH 1,2.....	57
Wykres 7. Profil rozpuszczania cefetamet u piwoksyl u z substancjami pomocniczymi w pH 6,8.....	57
Wykres 8. Stabilność chemiczna chlorowodoru cefetamet u piwoksyl u w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 348K, RH=76,5%.	58
Wykres 9. Stabilność chemiczna chlorowodoru cefetamet u piwoksyl u w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 363K, RH=0%.	58
Wykres 10. Wartości pozornych współczynników przenikalności cefetamet u piwoksyl u w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi.	59
Wykres 11. Profil rozpuszczania tebipenemu piwoksyl u z substancjami pomocniczymi w pH 1,2.....	66
Wykres 12. Profil rozpuszczania tebipenemu piwoksyl u z substancjami pomocniczymi w pH 6,8.....	66
Wykres 13. Stabilność chemiczna tebipenemu piwoksyl u w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 348K, RH=76,5%.	67
Wykres 14. Stabilność chemiczna tebipenemu piwoksyl u w mieszaninach z substancjami pomocniczymi 363K, RH=0%.	67
Wykres 15. Wartości pozornych współczynników tebipenemu piwoksyl u w mieszaninach preformulacyjnych z substancjami pomocniczymi.	68

13. PIŚMIENNICTWO

- [1] M. G. P. Page, „Beta-Lactam Antibiotics.,” *Antibiotic Discovery and Development*, pp. 79-117, 19 Listopad 2011.
- [2] X. Li, P. Plésiat i H. Nikaido, „The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria.,” *Clinical Microbiology Reviews*, tom 28(2), pp. 337-418, 2015.
- [3] T. Welte, T. Scheeren, A. Rodriguez, A. Demange i M. Engelhardt, „Efficacy of ceftobiprole in intensive care unit (ICU) patients with hospital-acquired pneumonia (HAP).,” *European Respiratory Journal*, tom 44(58), p. 4643, 2014.
- [4] J. G. Cannon, „Pharmacology. Principles and Practice.,” w *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, pp. 216-217.
- [5] A. Albert, „Chemical aspects of selective toxicity.,” *Nature*, tom 182, pp. 421-423, 1958.
- [6] J. A. Olmsted, „Synthesis of Aspirin: A General Chemistry Experiment.,” *Journal of Chemical Education*, tom 75(10), pp. 1262-1263, 1998.
- [7] R. L. Chayrov, E. K. Stylos, M. V. Chatziathanasiadou, K. N. Chuchkov i A. I. Tencheva, „Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation.,” w *Amino Acids*, Springer, 2018, p. 1131–1143.
- [8] P. N. Harris i J. K. Ferguson, „Antibiotic therapy for inducible AmpC beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides?,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, tom 40, pp. 297-305, 2012.
- [9] M. Zając, E. Pawełczyk i A. Jelińska, *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*, Poznań: Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2006.
- [10] W. Janiec, „Farmakodynamika, podręcznik dla studentów farmacji.,” Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008, pp. 1114-1121.
- [11] S. Tamura, S. Miyazaki, K. Tateda, A. Ohno, Y. Ishii i T. Matsumoto, „In Vivo

- Antibacterial Activities of Sanfetrinem Cilexetil, a New Oral Tricyclic Antibiotic.,” *Antimicrob Agents Chemother*, tom 42, nr 7, pp. 1858-1861, 1998.
- [12] P. Wieczorek, P. Sacha, K. Leszczynska, P. Jakoniuk i M. Zalewska, „Sanfetrinem, przedstawiciel trinemow - aktywnosc in vitro wobec szczepow *Klebsiella pneumoniae* wytwarzajacych ESBL.,” *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, tom 1, p. 58, 2006.
- [13] C. Duplessis i N. Crum-Cianflone, „Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),” *Clinical Medicine Reviews in Therapeutics*, tom 30(4), pp. 375-389, 2011.
- [14] A. Liapikou, C. Cillóniz i A. Torres, „Ceftobiprole for the treatment of pneumonia: a European perspective.,” *Drug Design, Development and Therapy*, tom 9, p. 4565–4572, 2015.
- [15] N. Greer, „Doripenem (Doribax): the newest addition to the carbapenems.,” *Baylor University Medical Center Proceedings*, tom 21(3), pp. 337-341, 2008.
- [16] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski i M. Paczkowska, „The Chromatographic Approach to Kinetic Studies of Tebipenem Pivoxil.,” *Journal of Chromatographic Science*, tom 53(2), pp. 325-330, 2015.
- [17] N. Brewer i W. Hellinger, „The monobactams.,” *Mayo Clinic Proceedings*, tom 66, nr 11, pp. 1152-1157, 1991.
- [18] R. Brogden i R. Heel, „Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use.,” *Drugs*, tom 31, nr 2, pp. 96-130, 1986.
- [19] N. Brewer i W. Hellinger, „The monobactams.,” *Mayo Clinic Proceedings*, tom 66(11), pp. 1152-1157, 1991.
- [20] K. Tahlan, H. Park, A. Wong, P. Beatty i S. Jensen, „Two Sets of Paralogous Genes Encode the Enzymes Involved in the Early Stages of Clavulanic Acid and Clavam Metabolite Biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*.,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 48, nr 3, pp. 930-939, 2004.
- [21] R. Rigo-Bonnin, J. Gomez-Junyent, L. Garcia-Tejada, E. Benevant i L. Soldevila, „Measurement of ceftolozane and tazobactam concentrations in plasma by UHPLC-MS/MS. Clinical application in the management of difficult-to-treat osteoarticular infections.,” *Clinica Chimica Acta*, tom 488, pp. 50-60, 2018.

- [22] G. Wu i E. Cheon, „Meropenem-vaborbactam for the treatment of complicated urinary tract infections including acute pyelonephritis.,” *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, tom 19, nr 13, pp. 1495-1502, 2018.
- [23] N. Kaku, K. Kosai, K. Takeda, N. Uno, Y. Morinaga, H. Hasegawa, T. Miyazaki, K. Izumikawa, H. Mukae i K. Yanagihara, „Efficacy and Pharmacokinetics of the Combination of OP0595 and Cefepime in a Mouse Model of Pneumonia Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*.,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 61, 2017.
- [24] E. Rhee, M. Rizk, N. Calder, M. Nefliu, S. Warrington, M. Schwartz, E. Mangin, K. Boundy, P. Bhagunde, F. Colon-Gonzalez, P. Jumes, Y. Liu i J. Butterson, „Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Single and Multiple Doses of Relebactam, a β -Lactamase Inhibitor, in Combination with Imipenem and Cilastatin in Healthy Participants.,” *Antimicrob Agents Chemother*, tom 62(9), 2018.
- [25] M. Castanheira, P. Rhomberg, R. Flamm i R. Jones, „Effect of the β -Lactamase Inhibitor Vaborbactam Combined with Meropenem against Serine Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae.,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 60(9), 2016.
- [26] J. Karlowsky, K. Kazmierczak, M. Hackel, D. Sahn i P. Bradford, „In Vitro Activity of Aztreonam-Avibactam against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated by Clinical Laboratories in 40 Countries from 2012 to 2015.,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 61(9), 2017.
- [27] M. Castanheira, H. Sader, D. Farrell, R. Mendes i R. Jones, „Activity of Ceftaroline-Avibactam Tested against Gram-Negative Organism Populations, including Strains Expressing One or More β -Lactamases and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Various Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types.,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 56(9), pp. 4779-4785, 2012.
- [28] H. Sader, P. Rhomberg, R. Flamm, R. Jones i M. Castanheira, „WCK 5222 (cefepime/zidebactam) antimicrobial activity tested against Gram-negative organisms producing clinically relevant β -lactamases.,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, tom 72(6), pp. 1696-1703, 2017.
- [29] A. Long, I. Clifton, P. Roach, J. Baldwin, P. Rutledge i C. Schofield, „Structural studies on the reaction of isopenicillin N synthase with the truncated substrate analogues delta-

- (L-alpha-aminoadipoyl)-L-cysteinyl-glycine and delta-(L-alpha-aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-alanine,” *Biochemistry*, tom 44, p. 6619–6628, 2005.
- [30] A. Albert, „Chemical aspects of selective toxicity,” *Nature*, tom 182, pp. 421-423, 1958.
- [31] P. Zalewski, R. Skibiński, M. Paczkowska, P. Garbacki, A. Talaczyńska i C.-P. J., „Stability of cefozopran hydrochloride in aqueous solutions,” *Drug Development and Industrial Pharmacy*, tom 42, nr 4, pp. 1-6, 2015.
- [32] B. Medenecka, A. Jelińska, M. Zajac i I. Oszczapowicz, „Stability of the crystalline form of cefaclor monohydrate and its pharmaceutical preparations,” *Acta poloniae pharmaceutica*, tom 66, nr 5, pp. 563-569, 2009.
- [33] A. Jelińska, B. Medenecka, M. Zajac i M. Knajsiak, „The stability of cefprozil in oral suspension CEFZIL,” *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, tom 65, nr 2, pp. 261-265, 2008.
- [34] A. Jelińska, I. Dudzińska, M. Zajac i I. Oszczapowicz, „The stability of the amorphous form of cefuroxime axetil in solid state,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 41, nr 3, pp. 1075-1081, 2006.
- [35] M. Zajac, J. Siwek i I. Muszalska, „The mechanism of ceftazidime degradation in aqueous solutions,” *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, tom 55, nr 4, pp. 275-278, 1998.
- [36] M. Dąbrowska, M. Starek, J. Krzek, E. Papp i P. Król, „A degradation study of cefepime hydrochloride in solutions under various stress conditions by TLC–densitometry,” *Biomedical Chromatography*, tom 29, nr 3, pp. 388-395, 2015.
- [37] A. Mendez, M. Steppe i E. Schapoval, „Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 33(5), pp. 47-54, 2003.
- [38] L. Eveleigh, I. Hasnaou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy i E. Caudron, „Rapid discrimination and determination of antibiotics drugs in plastic syringes using near infrared spectroscopy with chemometric analysis: Application to amoxicillin and penicillin,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 138, pp. 249-255, 2017.
- [39] J. Cielecka-Piontek, M. Paczkowska, K. Lewandowska, B. Barszcz, P. Zalewski i P.

- Garbacki, „Solid-state stability study of meropenem – solutions based on spectrophotometric analysis,” *Chem Cent J.*, p. 98, 2013.
- [40] J. Cielecka-Piontek i A. Jelińska, „Catalytic effect of buffers on the degradation of doripenem in aqueous solutions.,” *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, tom 102, nr 1, pp. 37-47, 2011.
- [41] J. Cielecka-Piontek, M. Zajac i A. Jelińska, „A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state.,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 46, nr 1, pp. 52-57, 2008.
- [42] K. Papp-Wallace, A. Endimiani, M. Taracila i R. Bonomo, „Carbapenems: past, present, and future.,” *Antimicrob Agents Chemother*, tom 55(11), pp. 4943-4960, 2011.
- [43] D. Kalman i S. Barriere, „Review of the Pharmacology, Pharmacokinetics, and Clinical Use of Cephalosporins.,” *Tex Heart Inst J.*, tom 17(3), pp. 203-205, 1990.
- [44] S. Anderson i J. Gums, „Ceftobiprole: an extended-spectrum anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin.,” *Ann Pharmacother*, tom 42(6), pp. 806-816, 2008.
- [45] D. Dauner, R. Nelson i T. D.C., „Ceftobiprole: A Novel, Broad-spectrum Cephalosporin with Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.,” *American Journal of Health-System Pharmacy*, tom 67(12), pp. 983-993, 2010.
- [46] J. Sjövall, L. Magni i T. Bergan, „Pharmacokinetics of Bacampicillin Compared with Those of Ampicillin, Pivampicillin, and Amoxicillin.,” *Antimicrob Agents Chemother.*, tom 14(4), p. 90–96, 1978.
- [47] K. Kato, Y. Shirasaka, E. Kuraoka i A. Kikuchi, „Intestinal absorption mechanism of tebipenem pivoxil, a novel oral carbapenem: involvement of human OATP family in apical membrane transport.,” *Mol Pharm.*, tom 7(5), pp. 747-756, 2010.
- [48] Y. Takeuchi, Y. Takebayashi, M. Sunagawa, Y. Isobe, Y. Hamazume i A. Uemura, „The stability of a novel carbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338), in a solid state formulation for injection.,” *Chem Pharm Bull*, tom 41(11), pp. 1998-2002, 1993.
- [49] J. Cielecka-Piontek, K. Michalska, P. Zalewski i A. Jelinska, „Recent Advances in Stability Studies of Carbapenems,” *Current Pharmaceutical Analysis*, tom 7, pp. 213-227, 2011.
- [50] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, B. Barszcz, K. Lewandowska i M. Paczkowska, „Stress Degradation Studies of Tebipenem and a Validated Stability-Indicating LC

- Method,” *Chromatographia*, pp. 381-386, 2013.
- [51] H. Horton, S. Weston i C. Hewitt, „Allergy to antibiotics: T-cell recognition of amoxicillin is HLA-DR restricted and does not require antigen processing,” *Allergy*, tom 53, nr 1, pp. 83-88, 1998.
- [52] R. Morin i M. Gorman, *Penicillins and Cephalosporins.*, New York: Academic Press, 1982.
- [53] J. Koup, U. Dubach, R. Brandt, R. Wyss i K. Stoeckel, „Pharmacokinetics of cefetamet (Ro 15-8074) and cefetamet pivoxil (Ro 15-8075) after intravenous and oral doses in humans,” *Antimicrob Agents Chemother.*, tom 32(4), pp. 573-579, 1988.
- [54] H. Bryson i R. Brogden, „Cefetamet pivoxil. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use,” *Drugs*, tom 45(4), pp. 589-621, 1993.
- [55] N. Sato, K. Kijima, T. Koresawa i N. Mitomi, „Population Pharmacokinetics of Tebipenem Pivoxil (ME1211), a Novel Oral Carbapenem Antibiotic, in Pediatric Patients with Otolaryngological Infection or Pneumonia,” *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, tom 23, pp. 434-446, 2008.
- [56] A. Jain, L. Utley, P. T. Z. T. i M. Pucci, „Tebipenem, the first oral carbapenem antibiotic,” *Expert Rev Anti Infect Ther.*, tom 16(7), pp. 513-522, 2018.
- [57] T. Muratani, K. Doi i T. Nakamura, „Antimicrobial activity of tebipenem against various clinical isolates from various specimen, mainly urinary tract,” *The Japanese Journal of Antibiotics*, tom 62(2), pp. 116-126, 2009.
- [58] I. Karpiuk i S. Tyski, „Looking for the new preparations for antibacterial therapy,” *Przegląd epidemiologiczny*, tom 66, pp. 567-573, 2012.
- [59] M. Basetti, M. Merelli, C. Temperoni i A. Astilean, „New antibiotics for bad bugs: where are we?,” *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.*, tom 12(1), p. 22, 2013.
- [60] B. Spellberg, J. Powers, E. Brass, L. Miller i J. J. Edwards, „Trends in antimicrobial drug development: implications for the future,” *Clinical Microbiology Infections*, tom 10, pp. 18-22, 2004.
- [61] M. Brewster i T. Loftsson, „Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, tom 59(7), pp. 645-666, 2007.
- [62] O. Aleem, B. Kuchekar, Y. Pore i S. Late, „Effect of β -cyclodextrin and hydroxypropyl

- β -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 47(3), pp. 535-540, 2008.
- [63] W. Gao, C. Y., Y. Zhang, Q. Zhang i L. Zhang, „Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery.,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, tom 127, pp. 46-57, 2017.
- [64] P. Gao, X. Nie, M. Zou, Y. Shi i G. Cheng, „Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system.,” *The Journal of antibiotics*, tom 64(9), pp. 625-634, 2011.
- [65] O. Kumar i A. Rani, „Effect of Polyvinylpyrrolidone on Complexation and Dissolution Rate of Beta Cyclodextrin and Hydroxypropyl Beta Cyclodextrin Complexes of Piroxicam.,” *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, tom 1(5), p. 301, 2012.
- [66] M. Paczkowska, M. Mizera, D. Szymanowska-Powałowska, K. Lewandowska, W. Błaszczak, J. Gościańska, R. Pietrzak i J. Cielecka-Piontek, „ β -Cyclodextrin complexation as an effective drug delivery system for meropenem.,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, tom 99, pp. 24-34, 2016.
- [67] J. Chen, J. Zhang, Z. Shen, J. Zhong i J. J., „Preparation and Characterization of Amorphous Cefuroxime Axetil Drug Nanoparticles with Novel Technology: High-Gravity Antisolvent Precipitation.,” *Industrial Engineering Chemistry Research*, tom 45, nr 25, pp. 8723-8727, 2006.
- [68] M. Davis i M. Brewster, „Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, tom 3, pp. 1023-1035, 2004.
- [69] E. Del Valle, „Cyclodextrins and their uses: a review.,” *Process Biochemistry.*, tom 39(9), pp. 1033-1046, 2004.
- [70] T. Higuchi i K. Connors, „Phase-solubility techniques.,” *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, tom 4, pp. 117-122, 1965.
- [71] J. Imperiale i A. Sosnik, „Cyclodextrin complexes for treatment improvement in infectious diseases.,” *Nanomedicine*, tom 10(10), pp. 1621-1641, 2015.
- [72] S. Sapte i Y. Pore, „Inclusion complexes of cefuroxime axetil with β -cyclodextrin: Physicochemical characterization, molecular modeling and effect of L-arginine on complexation.,” *Journal of Pharmaceutical Analysis*, tom 6(5), 2016.
- [73] S. Bhargava i G. Agrawal, „Preparation & characterization of solid inclusion complex

- of cefpodoxime proxetil with beta-cyclodextrin.," *Current Drug Delivery*, tom 5(1), pp. 1-6, 2008.
- [74] K. Rohitash, M. Anvesh i S. Mohammed, „Formulation and Evaluation of Two-Pulse Drug Delivery System of Amoxicillin Trihydrate.," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, tom 13(10), pp. 1593-1600, 2014.
- [75] P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim i J. Kim, „Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability.," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, tom 9(6), pp. 304-316, 2014.
- [76] S. Sapte i Y. Pore, „Inclusion complexes of cefuroxime axetil with β -cyclodextrin: Physicochemical characterization, molecular modeling and effect of l-arginine on complexation.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 6(5), pp. 300-306, 2016.
- [77] D. Haznar-Garbacz i S. Polak, „Czynniki fizjologiczne wpływające na biodostępność substancji leczniczej.," *biofarmacja*, tom 67(7), pp. 459-470, 2011.
- [78] A. Desphande i K. Baheti, „Degradation of β -lactam antibiotics.," *Current Science*, tom 87(12), pp. 1684-1695, 2004.
- [79] V. Nairi, L. Medda, M. Monduzzi i A. Salis, „Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica.," *Journal of Colloid and Interface Science*, tom 497, pp. 217-225, 2017.
- [80] E. Abdel-Moety, N. Elragehy i N. Hassan, „Selective Determination of Ertapenem and Imipenem in the Presence of Their Degradants.," *Journal of Chromatographic Science*, tom 48, pp. 624-630, 2010.
- [81] M. Breser, V. Felipe, L. P. Bohl i M. Orellano, „Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase-negative Staphylococcus isolates from chronic bovine mastitis.," *Scientific Reports*, tom 8, p. 5081, 2018.
- [82] J. Pages, J. Lavigne, L.-G. V., E. Marcon, F. Bert, L. Noussair i M. Nicolas-Chanoine, „Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates.," *Plos One*, tom 4(3), p. 1371, 2009.
- [83] R. J. Worthington i C. Melander, „Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics.," *The Journal of Organic Chemistry*, tom 78(9), pp. 4207-4213, 2013.
- [84] R. Pranckute, A. Kaunietis, N. Kuisiene i D. Citavicius, „Development of synbiotics

- with inulin, palatinose, alpha-cyclodextrin and probiotic bacteria.," *Polish Journal of Microbiology*, tom 63, nr 1, pp. 33-41, 2014.
- [85] H. Sohi, S. Y. i R. Khar, „Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches.," *Drug Development and Industrial Pharmacy* , tom 30(5), pp. 429-448, 2004.
- [86] M. Paczkowska, M. Mizera, J. Dzitko, K. Lewandowska, P. Zalewski i J. Cielecka-Piontek, „Vibrational (FT-IR, Raman) and DFT analysis on the structure of labile drugs. The case of crystalline tebipenem and its ester.," *Journal of Molecular Structure*, tom 1134, pp. 135-142, 2017.
- [87] M. Paczkowska, M. Mizera, D. Szymanowska-Powałowska, K. Lewandowska, W. Błaszczak, J. Gościńska, R. Pietrzak i J. Cielecka-Piontek, „β-Cyclodextrin complexation as an effective drug delivery system for meropenem.," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, tom 99, pp. 24-34, 2016.
- [88] C. d. M02-A11, „Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed.," Clinical and Laboratory Standards Institute , 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA., 2012.
- [89] CLSI, „Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline.," CLSI document M44-A, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, , 2004.
- [90] J. Jorgensen i M. Ferraro, „Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices.," *Clinical Infectious Diseases*, tom 49(11), pp. 1749-1755, 2009.
- [91] B. Kreger, D. Craven i W. McCabe, „ Gram-negative bacteremia. IV. Re- evaluation of clinical features and treatment in 612 patients.," *The American Journal of Medicine*, tom 68, p. 344–355, 1980.
- [92] R. White, D. Burgess i M. Manduru, „Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy : time-kill, checkerboard, and E test.," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 40, p. 1914–1918, 1996.
- [93] A. Marston, „Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry.," *Journal of Chromatography A*, tom 1218, p. 2676–2683, 2011.
- [94] S. Dewanjee, M. Gangopadhyay i N. Bhattacharya, „ Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*

- Analysis*, tom 5, pp. 75-84, 2015.
- [95] M. Pfaller, D. Sheehan i J. Rex, „Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization.” *Clinical Microbiology Reviews*, tom 17, pp. 268-280, 2004.
- [96] CLSI, „Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed.” CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, , 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
- [97] J. Jorgensen i M. Ferraro, „Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices.” *Clinical Infectious Diseases*, tom 49, p. 1749–1755, 2009.
- [98] C. d. M07-A9., „Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically,” Approved Standard, 9th ed., 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
- [99] A. Al-Bakri i F. Afifi, „Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration.” *Journal of Microbiological Methods*, tom 68, pp. 19-25, 2007.
- [100] A. Gehrt, J. Peter, P. Pizzo i T. Walsh, „Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by both microdilution method.” *Journal of Clinical Microbiology*, tom 33, pp. 1302-1307, 1995.
- [101] J. Meletiadis, J. Meis i J. Mouton, „Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media.” *Journal of Clinical Microbiology*, tom 39, pp. 478-484, 2001.
- [102] A. Gomez-Lopez, A. Aberkane i E. Petrikkou, „Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp.” *Journal of Clinical Microbiology*, tom 43, pp. 1251-1255, 2005.
- [103] J. Rodriguez-Tudela, E. Chryssanthou i E. Petrikkou, „Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi.” *Journal of Clinical Microbiology*, tom 41, pp. 5236-5237, 2003.
- [104] S. Arikan, „Current status of antifungal susceptibility testing methods.” *Medical Mycology*, tom 45, pp. 569-587, 2007.
- [105] CLSI, „Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents.” CLSI

- document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500,Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998.
- [106] CLSI, „Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guideline, 2nd. ed., CLSI document M45-A2.” Clinical and Laboratory Standards Institute, , 950 West Valley Roadn Suite 2500,Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2010.
- [107] C. Baker, S. Stocker i D. Culver, „Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria.” *Journal of Clinical Microbiology*, tom 29, pp. 533-538, 1991.
- [108] N. Andreu, T. Fletcher i N. Krishnan, „Rapid measurement of antituberculosis drug activity in vitro and in macrophages using bioluminescence.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, tom 67, pp. 404-414, 2012.
- [109] A. Paparella, L. Taccogna i I. Aguzzi, „Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*.” *Food Control*, tom 19, p. 1174–1182, 2008.
- [110] L. Green, P. Marder i L. Mann, „LY303366 exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeast viability.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, tom 43, pp. 830-835, 1999.
- [111] Y. Tang i C. Stratton, „Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, 2nd ed.” New York Heidelberg Dordrecht, London, Springer, , 2013, p. 937.
- [112] ICH, „The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use,” w *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 1996.
- [113] H. Gill, B. Pufon, P. Dykstra i D. Cheney, „Development of high throughput PAMPA as an in vitro model of passive transcellular permeability.” w *Conference: 9th European Regional International society for the study of xenobiotics Meeting*, 2006.
- [114] M. Paczkowska, M. Mizera, J. Dzitko, K. Lewandowska, P. Zalewski i J. Cielecka-Piontek, „Vibrational (FT-IR, Raman) and DFT analysis on the structure of labile drugs. The case of crystalline tebipenem and its ester.” *Journal of Molecular Structure*, tom 1134, pp. 135-142, 2016.
- [115] H. Bundgaard i U. Klixbüll, „Hydrolysis of pivampicillin in buffer and plasma

- solutions. Formation of a 4-imidazolidinone from ampicillin and formaldehyde.” *International Journal of Pharmaceutics*, tom 27, nr 2-3, pp. 175-183, 1985.
- [116] H. Chanteux, F. Van Bambeke, M. Mingeot-Leclercq i P. Tulkens, „Accumulation and Oriented Transport of Ampicillin in Caco-2 Cells from Its Pivaloyloxymethylester Prodrug, Pivampicillin.” *Antimicrob Agents Chemother*, tom 49, nr 4, pp. 1279-1288, 2005.
- [117] X. He, M. Sugawara, Y. Takekuma i K. Miyazaki, „Absorption of Ester Prodrugs in Caco-2 and Rat Intestine Models.” *Antimicrob Agents Chemother*, tom 48, nr 7, pp. 2604-2609, 2004.
- [118] S. Sateesha, A. Rajamma, H. Shekar i G. Divakar, „Formulation development and rheological studies of palatable cefetamet pivoxil hydrochloride dry powder suspension.” *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, tom 19, nr 2, pp. 118-125, 2011.
- [119] S. A. Bandgar, A. V. Yadav i S. S. Patil, „Formulation and Evaluation of Cefetamet Pivoxil Hydrochloride Dispersible Tablet by Using Taste Masking (Particle Coating) Approach.” *Journal of Pharmacy Research*, tom 2, nr 11, pp. 1789-1793, 2009.
- [120] S. Hazra, H. Xu i J. Blanchard, „Tebipenem, a New Carbapenem Antibiotic, Is a Slow Substrate That Inhibits the β -Lactamase from *Mycobacterium tuberculosis*.” *Biochemistry*, tom 53, nr 22, pp. 3671-3678, 2014.
- [121] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, B. Barszcz, K. Lewandowska i M. Paczkowska, „Stress Degradation Studies of Tebipenem and a Validated Stability-Indicating LC Method.” *Chromatographia*, tom 76, nr 7-8, pp. 381-386, 2013.
- [122] J. Cielecka-Piontek, M. Paczkowska, P. Zalewski, A. Talaczyńska i M. Mizera, „Tebipenem pivoxyl. Derivative spectroscopy study of stability of the first oral carbapenem.” *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, tom 135, pp. 14-19, 2015.
- [123] J. Dzitko, M. Mizera i J. Cielecka-Piontek, „Proleki antybiotyków β -laktamowych.” *Farmacja Współczesna*, tom 8, pp. 220-226, 2015.
- [124] B. Xing, J. Rao i R. Liu, „Novel beta-lactam antibiotics derivatives: their new applications as gene reporters, antitumor prodrugs and enzyme inhibitors.” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, tom 8(5), pp. 455-471, 2008.
- [125] L. Zhang, W. Zhu, L. Song, Y. Wang, H. Jiang i S. Xian, „Effects of Hydroxylpropyl- β -Cyclodextrin on in Vitro Insulin Stability.” *International Journal of Molecular*

- Sciences*, tom 10(5), pp. 2031-2040, 2009.
- [126] A. Alanis, „Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?,” *Archives of Medical Research*, tom 36(6), pp. 697-705, 2005.
- [127] B. English, „Limitations of beta-lactam therapy for infections caused by susceptible Gram-positive bacteria,” *J Infect.*, tom 69, pp. 5-9, 2014.
- [128] P. Dellamonica, „Cefuroxime axetil,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, tom 4(1), pp. 23-36, 1994.
- [129] J. Edwards i M. Betts, „Carbapenems: the pinnacle of the β -lactam antibiotics or room for improvement?,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, tom 45(1), pp. 1-4, 2000.
- [130] M. Ehrnebo, S. Nilsson i L. Boréus, „Pharmacokinetics of ampicillin and its prodrugs bacampicillin and pivampicillin in man,” *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, tom 7(5), pp. 426-451, 1979.
- [131] D. Kuhn, C. Coates, K. Daniel, D. Chen, M. Bhuiyan, A. Kaz i E. Turos, „Beta-lactams and their potential use as novel anticancer chemotherapeutic drugs,” *Front Biosci.*, tom 9, pp. 2605-2617, 2004.
- [132] A. Liapikou, C. Cillóniz i A. Torres, „Ceftobiprole for the treatment of pneumonia: a European perspective,” *Drug Design, Development and Therapy*, tom 9, pp. 4565-4572, 2015.
- [133] K. M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M. Taracila i R. A. Bonomo, „Carbapenems: Past, Present, and Future,” *Antimicrob Agents Chemother.*, tom 55(11), p. 4943-4960, 2011.
- [134] S. Tamura, S. Miyazaki, K. Tateda i A. Ohno, „In Vivo Antibacterial Activities of Sanfetrinem Cilexetil, a New Oral Tricyclic Antibiotic,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tom 42(7), pp. 1858-1861, 1998.
- [135] P. Williams i S. Harding, „The absolute bioavailability of oral cefuroxime axetil in male and female volunteers after fasting and after food,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, tom 13(2), pp. 191-196, 1984.
- [136] M. J. A. K. Nakashima M., „Pharmacokinetics and safety of tebipenem pivoxil tablets in healthy volunteers and in patients with reduced renal function,” *Japanese journal of clinical oncology*, Tomy %1 z %251(S-1), pp. 109-114, 2009.
- [137] K. Gutleben, J. Eller, J. Vöckler, M. Rau, P. Koeppel, J. Kotwas i H. Lode, „Pharmacokinetics of cefetamet pivoxil and interaction with cisapride and N-

acetylcysteine.”

JessicaVöckleraMargotRauaPeterKoeppelJochenKotwasbHartmutLodea, tom 3(2), pp. 170-174, 1997.

- [138] W. Symonds, J. Hyatt, J. Wilton, M. Teal i P. A. M. Reidenberg, „Comparative pharmacokinetics of oral ceftibuten, cefixime, cefaclor, and cefuroxime axetil in healthy volunteers.” *Pharmacotherapy*, tom 17, nr 1, pp. 121-125, 1997.
- [139] S. Salvo, A. De Sarro, A. Caputi i G. Polimeni, „Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanate: a safety review.” *Expert Opinion on Drug Safety*, tom 8, nr 1, pp. 111-118, 2009.
- [140] M. Breser, V. Felipe, L. Bohl, M. Orellano, I. P., A. Conesa i C. Porparatto, „Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase-negative Staphylococcus isolates from chronic bovine mastitis.” *Scientific Reports* volume, p. 5081, 2018.
- [141] I. Wiegand, K. Hilpert i R. Hancock, „Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.” *Nature Protocols*, tom 3, pp. 163-175, 2008.
- [142] J. Cielecka-Piontek, M. Zając i A. Jelińska, „A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 46, nr 1, pp. 52-57, 2008.
- [143] C. Simon, „In vitro activity of Ro 15-8074 and Ro 19-5247 in comparison to cefaclor and cefalexin.” *Infection*, tom 15, nr 2, pp. 122-124, 1987.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.:

„Badanie układów: proleków wybranych analogów β -laktamowych z substancjami pomocniczymi pod kątem możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości, przenikalności i aktywności mikrobiologicznej”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych

Imię i nazwisko

podpis.....

Data, podpis.....

.....
Imię i nazwisko

Poznań,

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że jestem autorem rozprawy doktorskiej pt

„Badanie układów: proleków wybranych analogów β -laktamowych z substancjami pomocniczymi pod kątem możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości, przenikalności i aktywności mikrobiologicznej”

Informuję, że udzielam nieodpłatnie Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu (UMP) licencji niewyłącznej do korzystania z ww. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji

- przechowywanie i archiwizowanie pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania, udostępniania i obrotu w formie elektronicznej
- udostępnienie pracy w Czytelnicy Naukowej Biblioteki Głównej UMP

Jednocześnie informuję, że

- wyrażam zgodę na nieodpłatne opublikowanie całości manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (WBC)
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej, ponieważ zobowiązuję się
 - w terminie nie dłuższym niż 6 miesięcy od daty podpisania niniejszego oświadczenia do przygotowania publikacji opartej na wynikach pracy doktorskiej i wysłania do wydawnictwa,
 - opublikowania ww. wyników w okresie kolejnych 18 miesięcy,
 - afiliowania ww. pracy na rzecz Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej z uwagi na zawarty w niej niejawnny charakter informacji

Przyjąłem do wiadomości fakt obowiązku niezwłocznego poinformowania Dziekanatu Wydziału Farmaceutycznego UMP o wysłaniu manuskryptu do wydawnictwa oraz przyjęciu publikacji do druku. W przypadku niepoinformowania Dziekanatu w terminie o ww. faktach zezwalam Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu na opublikowanie całości mojej pracy doktorskiej w WBC¹.

.....
Data i podpis

¹ Art. 14, ust. 1, Ustawa o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dz.U. 1994 Nr 24 poz. 83)