

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ  
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**

**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
хімії ліків та лікарської токсикології  
(назва кафедри)

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

ТЕМА «Інструментальне підтвердження ступеню чистоти та кількісного співвідношення субстанцій діючих речовин синтетичних антибіотиків – імпіпенему та натрію циластатину»

Виконав: здобувач вищої освіти 3 курсу, групи Б1А  
напряму підготовки (спеціальності)

226 «Фармація, промислова фармація»  
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання  
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»

«Фармація»

(назва освітньої програми)

Чала Аліна Миколаївна

(прізвище та ініціали)

Керівник: к.б.н., асистент Мелешко Р.А.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: проф., д.фарм. н. Полова Ж.М.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

**Київ – 2023-2024 р.р.**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ КАРБАПЕНЕМІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови карбапенемів.....	10
1.2. Біологічна активність карбапенемів.....	16
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ІМПЕНЕМУ ТА ЦИЛАСТАТИНУ.....	21
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості імпенему та циластатину.....	21
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
SUMMARY.....	41
ДОДАТОК 1.....	42

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

МА – місцеві анестетики

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см<sup>-1</sup> – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР  $^1\text{H}$  – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$  – градуси Цельсія

CSN – циластатин

DHPS – дигідроптероатсинтази

ESBL – Бета-лактамази розширеного спектру дії

IPM – іміпенем

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спінової взаємодії, герци

MDR – мультирезистентні штами бактерій

pABA – пара-амінобензойна кислота

## ВСТУП

*Актуальність теми.* Карбапенеми – це клас бета-лактамних антибіотиків. Вони активні проти широкого спектру аеробних, анаеробних, грампозитивних та грамнегативних організмів. Тіенаміцин був першим карбапенемом. Карбапенеми відрізняються своєю здатністю інгібувати ферменти бета-лактамази. Бета-лактамаза – це тип ферменту, який знижує активність антибіотиків пеніциліну та цефаміцину. Карбапенеми серед бета-лактамних антибіотиків мають найширший спектр, найбільшу ефективність проти бактерій. Їх часто використовують для лікування важких інфекцій, як агенти «останньої лінії».

Іміпенем — це синтетичний  $\beta$ -лактамний антибіотик, що належить до хімічного класу карбапенемів. Іміпенем має високу стійкість до ферментів  $\beta$ -лактамаз, які виробляються стійкими до ліків грамнегативними бактеріями. Іміпенем відіграє важливу роль у лікуванні інфекцій, які неможна лікувати іншими антибіотиками. Іміпенем був розроблений шляхом тривалого пошуку більш стабільної версії натурального продукту тіенаміцину. Тіенаміцин виробляється бактерією *Streptomyces cattleya*. Тіенаміцин має антибактеріальну дію, але не має стабільності у водному розчині. З цієї причини його не використовують в медицині. Іміпенем особливо важливий, оскільки є активним проти видів *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterococcus*. Однак він не виявляє активності проти MRSA.

Іміпенем має наступний спектр чутливості та резистентності до бактерій: *Acinetobacter anitratus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis* і *Clostridium perfringens*. *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter spp.*, *Bacteroides fragilis* і *Enterococcus faecalis* розвинули стійкість до іміпенему. *Pseudomonas aeruginosa* і *Stenotrophomonas maltophilia* стійкі до іміпенему.

Імпінем має систематичну хімічну назву за ІЮПАК N-формімідоїлтієнаміцнн моногідрат або (5R,6S)-3-[[2-(формімідоїламіно)етил]тіо]-6-[(R)-1-гідроксиетил]-7-оксо-1-азабіцикло[3.2.0]гепт-2-єне-2-карбонова кислота моногідрат. Це – кристалічне похідне тієноміцину, який продукується *Streptomyces cattleya*. Це брудно-біла, негіроскопічна кристалічна сполука з молекулярною масою 317,37. Імпінем помірно розчинний у воді, малорозчинний у метанолі [1-3].

Циластатин пригнічує фермент дегідропептидазу, який міститься в нирках і відповідає за розщеплення антибіотика імпінему. Циластатин призначають внутрішньовенно з імпінемом, щоб захистити його від деградації. Імпінем сам по собі є ефективним антибіотиком, і його можна призначати без циластатину. Циластатин не має протибактеріальної активності, однак він активний відносно цинкзалежної бета-лактамази, яка зазвичай надає антибіотикорезистентність деяким бактеріям. Така властивість зумовлена фізико-хімічною схожістю між мембранною дипептидазою (МДП), та бактеріальною метало-бета-лактамазою. Комбінація імпінему з циластатином збільшує ефективність антибіотика, змінює фармакокінетику. Імпінем+циластатин є поширеним комбінованим продуктом.

Хімічна назва циластатину – (Z)-7-[(2R)-2-аміно-3-гідрокси-3-оксопропіл]сульфаніл-2-{[1S]-2,2-диметилциклопропанкарбоніл}аміно}гепт-2-єноєва кислота.

Бета-лактамази розширеного спектру дії (ESBL) є ферментами, відповідальними за продукування мультирезистентних (MDR) штамів бактерій. Це робить β-лактамні препарати неефективними проти таких бактеріальних інфекцій. Авібактам і релебактам є двома неф-лактамними інгібіторами, схваленими в комбінації з іншими антибіотиками. З часом штами ESBL призводять до високого ступіню резистентності. Успішно розроблені ефективні препарати, що продукують ESBL. Створено нову серію сполук з

гідразидною функцією з подвійним механізмом дії: інгібування ферментів і краща афінність до пеніцилінзв'язуючого білка (РВР). Селективність цих молекул до зв'язування з РВР2 дала можливість комбінувати його з  $\beta$ -лактамними препаратами [4-8]. Такі аналоги ДВО нового покоління називають підсилювачами. Вони підвищують ефективність препаратів, а не відновлюють початкову активність. Сполуки з нових гідразидних рядів є активними, мають певні значення інгібуючої концентрації (МІК) проти *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii*.

У доклінічних і клінічних дослідженнях нові хімічні речовини (NCE) у поєднанні з  $\beta$ -лактамним лікарськими засобами показали ефективність проти грамнегативних патогенів.

WCK 5107 (зидебактам) і WCK 5153 є двома потужними підсилювачами  $\beta$ -лактаму. Комбінація цефепіму та зидебактаму (WCK 5222) є ефективним продуктом проти інфекційних хвороб (QIDP).

Стійкий до карбапенему комплекс *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (АСВ) став загрозою у світі. Визначена комбінація антибіотиків та синергічні механізми проти трьох пар АСВ (*A. baumannii*, *A. pittii* і *A. nosocomialis*). Іміпенем з фосфоміцином є найефективнішим до всіх штамів, крім АВ250. MurA.

Фосфоміцин не стимулює регуляцію murA, що вказує на незалежний від MurA шлях, присутній у всіх штамів. Фосфоміцин більше регулює шлях рециркуляції у синергічному штамі (A10). Іміпенем у комбінації знижує регуляцію шляху рециркуляції в A10, впливає на шлях рециркуляції, що призводить до синергізму через збудження метаболізму клітинної стінки. Гетерорезистентність до іміпенему спостерігалася лише у АВ250. Неочікувана активність іміпенему щодо активної рециркуляції клітинної стінки одночасно з гетерорезистентністю до іміпенему призводить до синергізму іміпенему та фосфоміцину [8-16].

Іміпенем та циластатин є небезпечними речовинами, проявляють побічні ефекти, токсичність, тому їх комбінація потребує обережного застосування у фармацевтичній практиці.

Контроль якості субстанцій іміпенему та циластатину потребує ретельних процедур за допомогою інструментальних методів. Якість лікарського засобу у комбінації іміпенему та циластатину, окремих субстанцій іміпенему і циластатину є важливою для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Іміпенем та циластатин – це органічна сполука, до хімічної структури якої входять фармакофорні угруповання. Окрім функціональних груп, молекули містять циклічні та біциклічні структури. Необхідно відмітити, молекули містять делокалізовану електронну густину та ароматичну спряжену систему. Субстанції іміпенему та циластатину аналізують за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів. Молекули є високоактивними у хімічних реакціях. Можливе у субстанціях внутрішньомолекулярних зв'язків вільними функціональними групами, деградація молекул, гідроліз та заміщення атомів Гідрогену. Під час синтезу субстанцій можливе утворення побічних продуктів, супровідних речовин, домішок, які впливають на якість субстанцій.

Завданням фармацевтичного аналізу субстанцій іміпенему та циластатину залишається якісне виявлення та кількісне визначення специфікованих і неспецифікованих домішок шляхом. Для цього необхідним є розширення кола сучасних інструментальних методів, які не описано у Фармакопеях.

Актуальним завданням даного експериментального дослідження є розробка умов хроматографування при дослідженні субстанцій іміпенему та циластатину методом ВЕРХ та підтвердження чистоти субстанцій, що дозволить зробити коректні висновки щодо їх якості.



*Мета і завдання дослідження.* Метою експериментального дослідження є розробка умов хроматографування, методик підготовки досліджуваних розчинів та експериментальних процедур зразків субстанцій іміпенему та циластатину.

*Завдання експериментального дослідження:*

- Розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанцій іміпенему та циластатину для визначення ступеню чистоти та їх кількісного співвідношення;
- розробити методики (ВЕРХ) хроматографування субстанцій іміпенему та циластатину;
- провести експериментальні дослідження зразків субстанцій іміпенему та циластатину та інтерпретувати результати досліджень.

*Методи дослідження.* Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

*Новизна та значення одержаних результатів.* Новизна експериментального дослідження полягає у розробці нових умов та методик досліджень методом ВЕРХ субстанцій іміпенему та циластатину з метою визначення ступеню чистоти та їх кількісного співвідношення.

*Апробація результатів дослідження.* Результат досліджень апробовано на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-23», Запоріжжя, 23-24 листопада 2023.

*Публікації:* За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

*Структура роботи:* загальну кількість сторінок – 42, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 24.

## ОСНОВНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ КАРБАПЕНЕМІВ

#### 1.1. Особливості хімічної будови карбапенемів

Іміпенем має систематичну хімічну назву за ІЮПАК N-формімідоїлтієнаміцмн моногідрат або (5R,6S)-3-[[2-(формімідоїламіно)етил]тіо]-6-[(R)-1-гідроксиетил]-7-оксо-1-азабіцикло[3.2.0]гепт-2-єне-2-карбонова кислота моногідрат. Хімічна формула іміпенему представлена на рисунку 1.1.1.

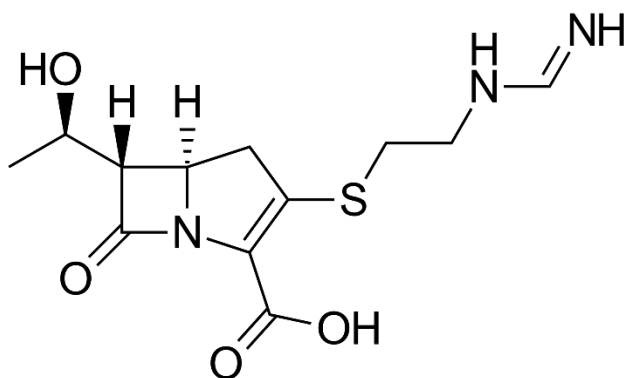


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула іміпенему.

Субстанція іміпенему – це кристалічне похідне тієноміцину, брудно-білого кольору, негігроскопічна кристалічна сполука. М.м. 317,37. Іміпенем субстанція помірно розчинний у воді, малорозчинний у метанолі.

Циластатин має систематичну номенклатурну назву за ІЮПАК – (Z)-7-[[2(R)-2-аміно-3-гідрокси-3-оксопропіл]сульфаніл-2-{{1(S)-2,2-диметилциклопропанкарбоніл}аміно}гепт-2-єноєва кислота. Хімічна формула циластатину представлена на рисунку 1.1.2.

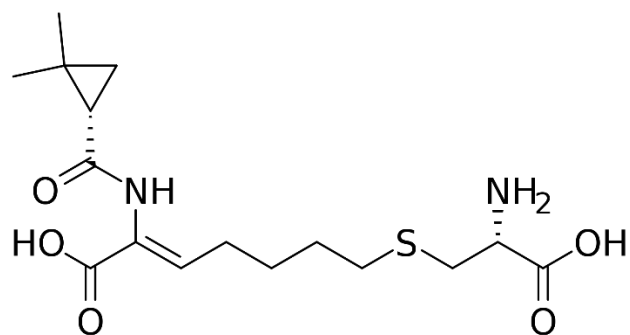


Рисунок 1.1.2. Хімічна формула циластатину.

Комбінація іміпенему та циластатину використовується для лікування бактеріальних інфекцій. Циластатин пригнічує ниркову дегідропептидазу I, подовжує період напіврозпаду іміпенему, збільшує його проникнення в тканини. Таким чином підвищується ефективність іміпенему як антибактеріального засобу [17-20] (рис. 1.1.3).

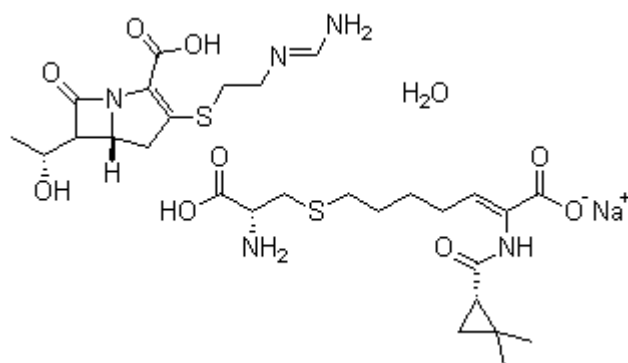


Рисунок 1.1.3. Хімічна формула комбінації іміпенему та циластатину.

Комбінований лікарський засіб іміпенему-циластатину випускається у формі порошку для приготування розчину для інфузії, співвідношення: 500 мг іміпенему – 500 мг циластатину. Лікарський засіб має побічні ефекти: підвищена чутливість до компонентів препарату, до препаратів карбапенему, анафілактичні реакції, реакції шкіри тяжкого ступеня, підвищена чутливість до інших  $\beta$ -лактамних антибіотиків: пеніциліну, цефалоспоринів.

Розроблено нестереоселективний синтез циластатину – інгібітору

ниркової дипептидази. 2-метилпропен та метилдіазаацетат реагують з утворенням рацемічного метил-2,2-диметилциклопропанкарбоксилату. У якості каталізатору використовували  $Rh_2(OAc)_4$ . Реакційну суміш використовували для отримання суміші циластатину та його епімеру (рис. 1.1.4).

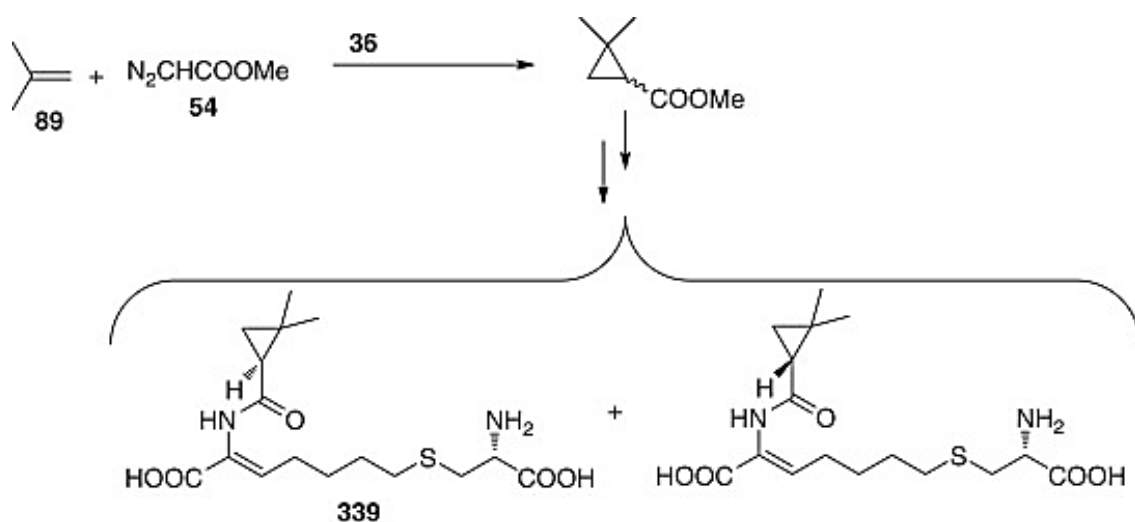


Рисунок 1.1.4. Нестереоселективний синтез циластатину та його епімеру.

Різні класи антимікробних агентів містять компоненти, які викликають нефротоксичність. До цих груп відносяться  $\beta$ -лактами (пеніциліни, цефалоспорини, карбапенеми), аміноглікозиди, протигрибковий засіб амфотерицин В, ванкоміцин, тетрацикліни.

Спектр нефротоксичних ефектів і механізму нефротоксичності у цих агентів різний. Потенціал нефротоксичної відповіді збільшують шляхом комбінування двох протимікробних препаратів, які викликають ниркову токсичність. Або комбінують нефротоксичний антимікробний препарат з іншими нефротоксичними препаратами.

$\beta$ -лактамі протимікробні препарати (пеніциліни, цефалоспорини, карбапенеми) хімічно споріднені за рахунок наявності чотиричленного кільця з атомом Нітрогену при карбонільній групі  $\beta$ -лактаманого кільця.  $\beta$ -лактамане

кільце надає антимікробну дію препаратам. Гідроліз кільця призводить до дезактивації препаратів.

Ці лікарські засоби є слабокислими, активно виділяються системою транспорту органічних аніонів проксимального каналця. Вони можуть концентруватися у сегменті нефрону під час секреторного процесу.

Нефротоксичність після введення  $\beta$ -лактамного антибіотика може виникнути за різними механізмами. Вона залежить від використовуваного антибіотика, параметрів пацієнта (рис. 1.1.5).

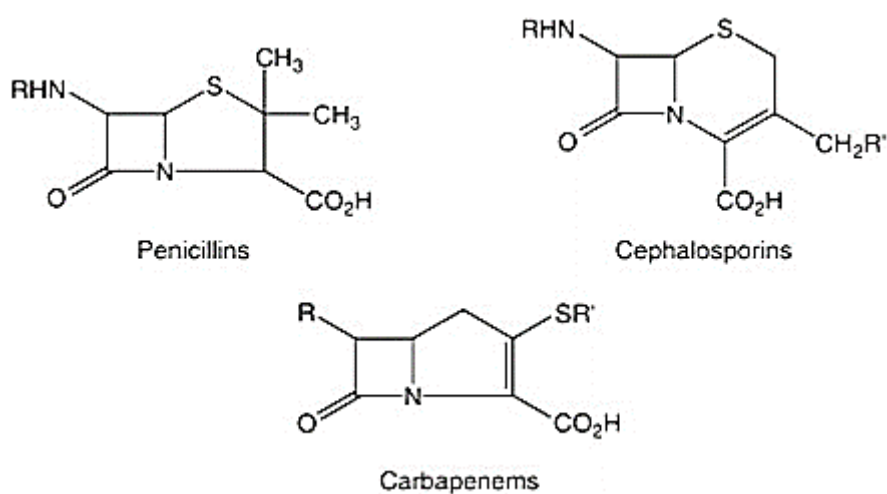


Рисунок 1.1.5. Структура бета-лактамних антибіотиків.

Ниркова токсичність, спричинена пеніциліном, розглядається як алергічний ГН. Метицилін є найпоширенішим пеніциліном для індукції АІН. Використання пеніциліну G, ампіциліну, амоксициліну, оксациліну та карбеніциліну також приводить до розвитку АІН.

Гостра ниркова недостатність виникає після 1 або 2 тижнів лікування з лихоманкою або висипаннями. Іноді вони виникають перед нирковою дисфункцією. Видалення пеніциліну дозволяє нормалізувати функцію нирок протягом кількох днів.

АІН також може бути індукований певними цефалоспоринами (цефалотин, цефалексин, цефрадин, цефокситин, цефотаксим) та

не- $\beta$ -лактамами протимікробними засобами (сульфаніламидами, рифампіцином, тетрациклінами, еритроміцином).

Деякі цефалоспори́ни (цефалоридин, цефалогліцин, цефаклор та цефалотин) є безпосередньо токсичними для проксимальних каналців. Накопичення їх в тубулярних клітинах є важливим етапом нефротоксичності цефалоспоринів. Пригнічення транспорту цефалоспоринів пробенецидом послаблює нефротоксичність цефалоспоринів. Місце ураження нирок, спричиненого цефалоспоринами, корелює з проксимальним тубулярним сегментом [21, 22].

Клітинний механізм нефротоксичності, спричиненої цефалоспоринами, включає кілька можливих дій цефалоспоринів. Нефротоксичні цефалоспори́ни індують перекисне окислення ліпідів, пошкодження клітинних мембран, ацилюють клітинні білки. Мітохондріальне дихання пригнічується через ацилювання мітохондріальних транспортерів для метаболічних субстратів. Утворення аденозинтрифосфату (АТФ), який є необхідним для постачання клітинної енергії, знижується, щоб пригнічувати енергозалежні клітинні функції.

Імпенем – це карбапенемовий протимікробний засіб. Він має нефротоксичний потенціал. Нефротоксичність є дозозалежною та характеризується тубулярним некрозом. Нефротоксичність імпенему послаблюється при одночасному застосуванні циластатину, інгібітора цитозольного ферменту та ферменту дегідропептидази I (DHP).

Основний захисний ефект циластатину зумовлений інгібуванням накопичення імпенему в нирках, а не інгібуванням ДГП.

Препаратом вибору для лікування серйозних системних грибкових інфекцій є протигрибковий засіб амфотерицин В. Нефротоксичність є поширеним побічним ефектом введення амфотерицину В. До 50–80% пацієнтів, які отримували амфотерицин В, відчували побічні ефекти з боку нирок. Нефротоксичність амфотерицину В характеризується дистальним



Усунення домішок із субстанцій лікарських засобів та ретельний моніторинг рівня ванкоміцину в крові привели до зменшення кількості випадків нефротоксичності. Застосування ванкоміцину може посилити нефротоксичність аміноглікозидів.

Неретровірусні противірусні препарати корисні для лікування герпесу, інших вірусних інфекцій. Частота нефротоксичності, викликані цими препаратами, не встановлена. Вони здатні викликати ниркову недостатність через різні механізми. Ацикловір, адефовір дипівоксил, цидофовір, тенофовір і валацикловір мають здатність індукувати нефротоксичність. Нефротоксичність є основним обмежуючим дозу побічним ефектом цидофовіру. Вона характеризується протеїнурією, азотемією, глюкозурією, метаболічним ацидозом, синдромом Фанконі. Ацикловір погано розчиняється в рідині просвіту нирок, викликає нефротоксичність через відкладення кристалів.

## 1.2. Біологічна активність карбапенемів

Терапевтичний успіх пеніцилінів і цефалоспоринів стимулював експериментальні дослідження  $\beta$ -лактамного ядру. Запропоновано синтез природних сполук, розроблені нові похідні – більш активні або стабільніші сполуки.

Методи синтезу — промисловий синтез лоракарбефу, карбацефему виявилися дуже корисними після відкриття першого карбапенему, (тієнаміцину), який було виділено з екстракту *Streptomyces* (рис.1.2.1).



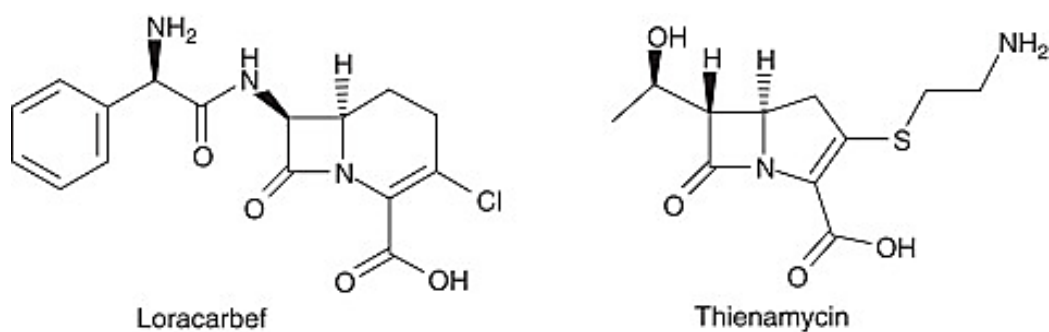


Рисунок 1.2.1. Структура доракарбефу та тієнаміцину.

Карбапенеми відрізняються структурою від пеніцилінів, за рахунок заміни атому Сульфуру тiazолідинового кільця на атом Карбону, інверсією конфігурації в 6-позиції. Сполуки мають широкий спектр антибактеріальної дії проти грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Тієноміцин не розробляли через низьку хімічну стабільність, а близький аналог іміпенем був розроблений та впроваджений.

Під час розробки цього лікарського засобу виявили проблеми: деградація молекули *in vivo* нирковими дегідропептидазами, створення активної молекули у великому масштабі після ферментації.

Ці проблеми були вирішені. Створено інгібітор дегідропептидаз ссавців, циластатин с асиметричною циклопропанкарбоною кислотою та L-цистеїн. Антибактеріальне лікування складається з одночасного введення іміпенему та циластатину (рис. 1.2.2)

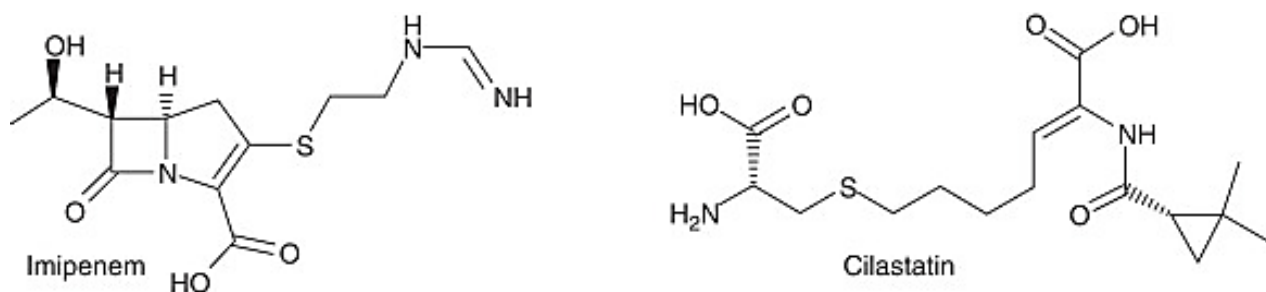


Рисунок 1.2.2. Структура іміпенему та циластатину.

Постачання активного матеріалу було вирішено шляхом проектування повного синтезу тіенаміцину. Ключовим проміжним продуктом став  $\beta$ -лактам (рис. 1.2.3).

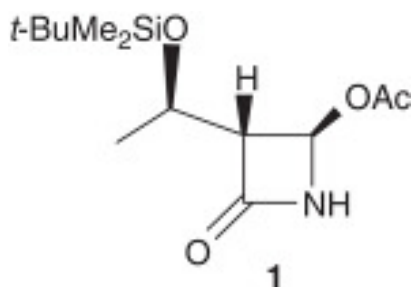


Рисунок 1.2.3. Структура ключового проміжного продукту.

Легкий доступ до цього проміжного продукту є наслідком досліджень, які дали  $\beta$ -лактами. Найефективнішою для контролю стереохімії замісників є використання [2+2]-циклоприсєднання кетена до іміну або складного ефіру, заміна енолят на іміні.

Ця реакція є універсальною, оскільки хіральність може бути введена через хіральні допоміжні речовини або каталіз (рис. 1.2.4).

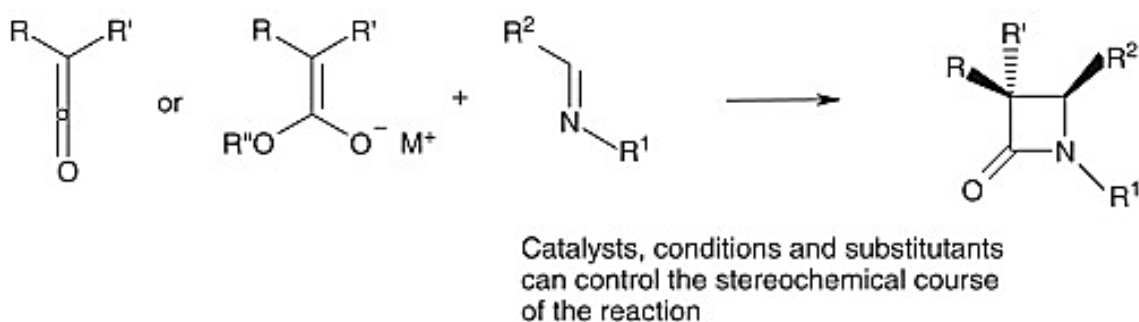


Рисунок 1.2.4. Синтез ядра бета-лактаму циклоприсєднанням.

Цю реакцію використовували для отримання асиметричних блоків для  $\beta$ -лактамінів та карбапенемів. Промисловий шлях починається з (R)-бутан-1,3-діолу для отримання суміші E/Z вінілсульфідів, які реагують з хлорсульфонізоціанатом. Утворюється суміш двох ізомерів  $\beta$ -лактаму.

Після очищення шляхом кристалізації основний ізомер підлягає перетворенню за допомогою мідного каталізу (рис.1.2.5).

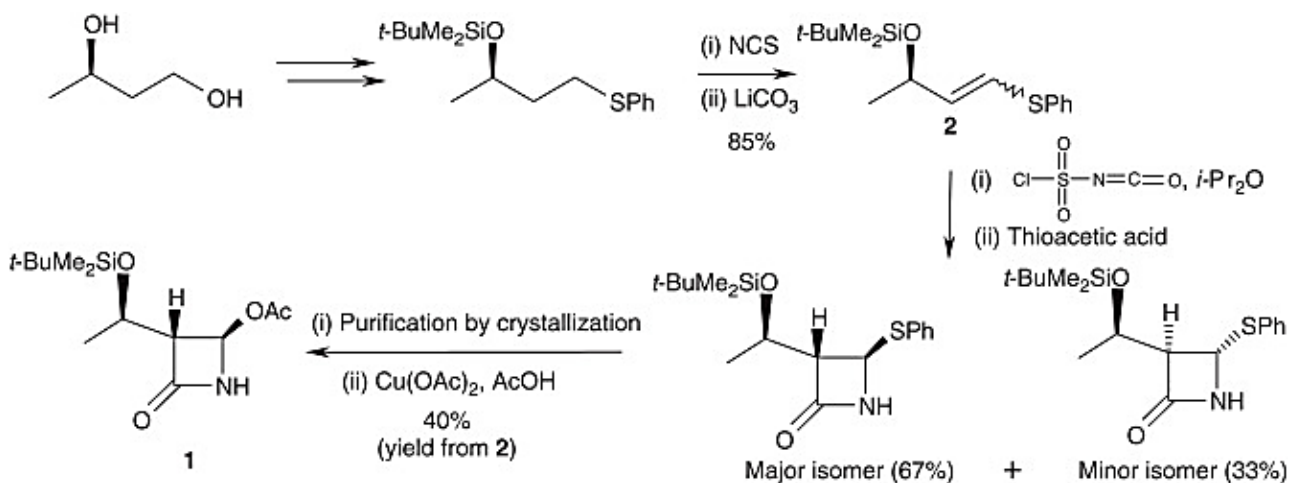


Рисунок 1.2.5. Промисловий синтез проміжних продуктів.

Наступним етапом синтезу є заміщення ацетоксигрупи через ацилімінієвий напівпродукт.

Складність його полягає у пошуку реагентів та умови, які дозволять отримати ізомер. Одною із реакцій є реакція еноляту (оптично активного або рацемічного) з ацилімінію з утворенням продукту. Ключовим етапом цього синтезу є каталізоване родієм введення карбену у зв'язок N–H β-лактамного кільця.

Друге покоління карбапенемів розроблено після виявлення того, що ці типи молекул стає нечутливим до дегідропептидаз, при присутності в молекулі метильної групи. Ця функція спрощує введення антибіотика. Хімія була складнішою, оскільки в структурі присутній новий асиметричний центр.

Похідне 1β-метилу є високостійким до ниркових дегідропептидаз, демонструє високу антибактеріальну активність.

Похідне 1α-метилу є помірно стійким до ниркових дегідропептидаз, менш активним проти бактерій.

Таким чином, це друге покоління карбапенемів є більш успішним у лікуванні тяжких лікарняних інфекцій.

У цьому сегменті ринку домінує меропенем, для якого існує виробництво в масштабі 30 тонн (рис. 1.2.6).

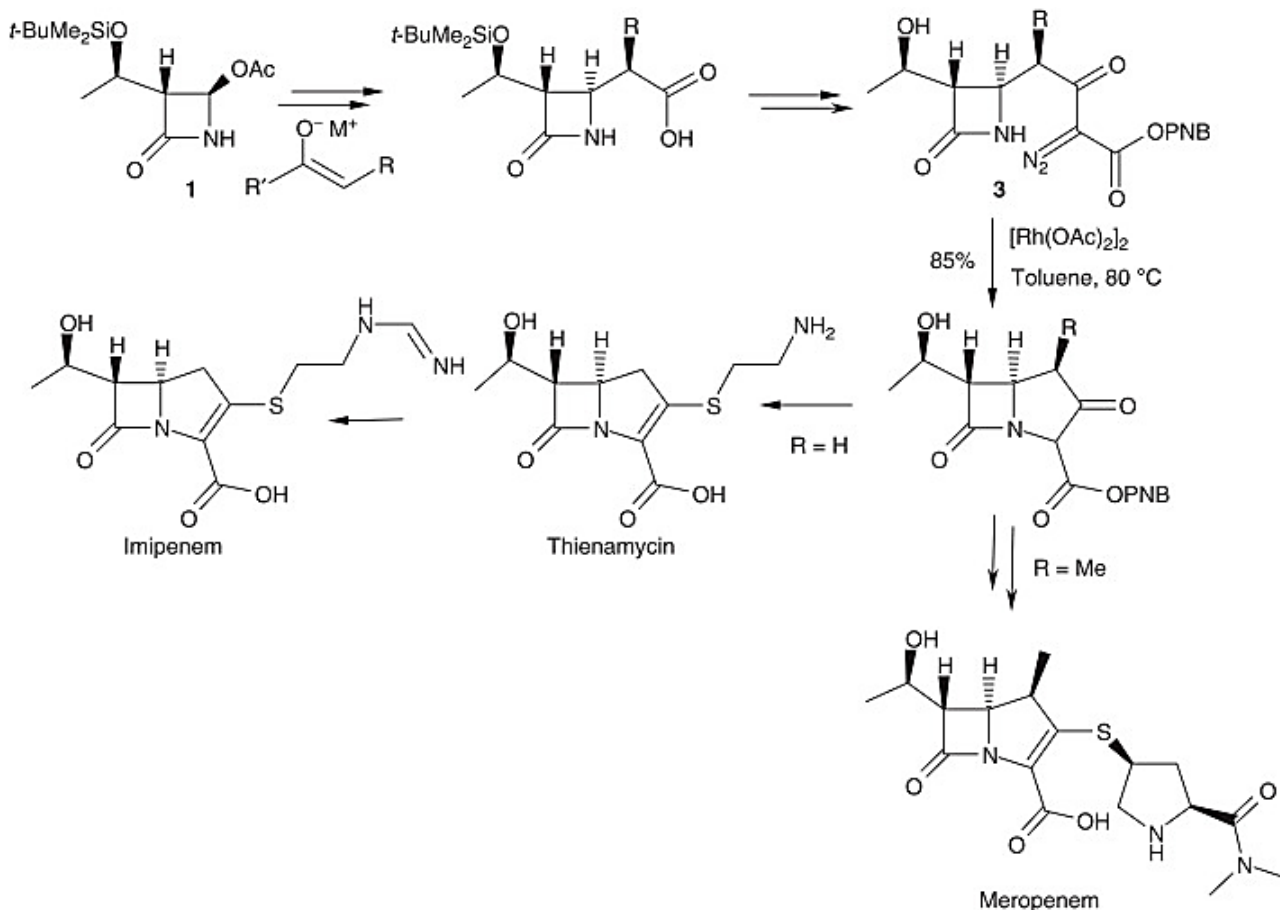


Рисунок 1.2.6. Принципи синтезу карбапенему із напівпродуктів.

Величезна кількість досліджень хімії  $\beta$ -лактамів у сфері антибактеріальних агентів призвела до застосування в інших сферах, таких як антиартеріосклероз, завдяки використанню доступу до хіральної  $\beta$ -лактамів та їх реактивності.

## РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ІМПЕНЕМУ ТА ЦИЛАСТАТИНУ

### 2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості імipенему та циластатину

Описано класичні та сучасні методи синтезу субстанцій імipенему та циластатину.

Імipенем або [5R-[5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ (R)]]-6-(1-гідроксіетил)-3-[[2-[(імінометил)аміно]етил]тіо]-7-оксо-1-азабіцикло[3.2.0]гепт-2-ен-2-карбонова кислота є єдиним карбапенемом, який використовується в клініках.

Він синтезується з тієнаміцину, виділеного з *Streptomyces cattleya* шляхом його взаємодії з метилформімідатом (рис. 2.1.1).

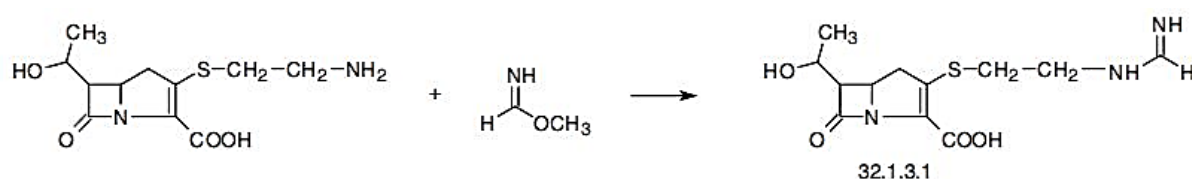


Рисунок 2.1.1. Синтез імipенему.

На відміну від пеніцилінів і цефалоспоринів з бічними аміноацильною групи, яка приєднана до беталактамного кільця, імipенем має  $\alpha$ -гідроксіетильний бічний ланцюг.

У цієї сполуки спостерігається значна стійкість до гідролізу беталактамазами завдяки транс-конфігурації бічного ланцюга. Бічний ланцюг пеніцилінів і цефалоспоринів має цис-конфігурацію.

Циластатин має наступні фізичні параметри:

Точка плавлення: 156-158°C

Точка кипіння: 655,5±55,0 °C

Щільність 1,275±0,06 г/см<sup>3</sup>

Температура зберігання:

Зберігати в темному місці, герметично закритому в сухому місці, зберігати в морозильній камері при температурі -20°C

Розчинність - ДМСО (слабо), метанол (слабо, оброблений ультразвуком)

Рка 2,09±0,10

Фізичний стан: Твердий

Колір: від білого до світло-коричневого

Першими сполуками були С-1 незаміщені карбапенеми іміпенем і паніпенем (рис.2.1.2).

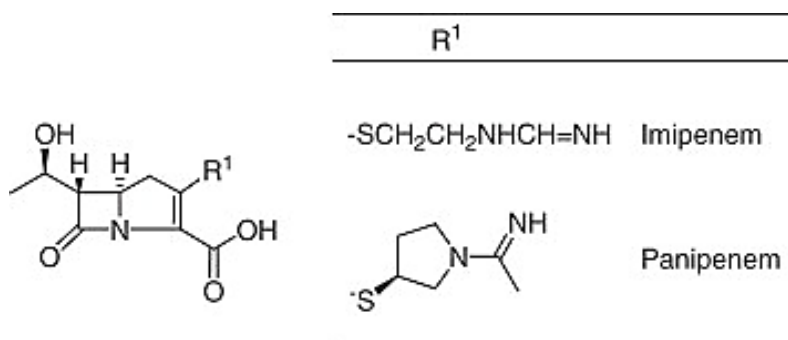


Рисунок 2.1.2. Структура іміпенему та паніпенему.

Через їх нестабільність щодо ниркової дегідропептидази-I (ДНР-I) і ниркову токсичність іміпенем застосовують одночасно з циластатином, інгібітором ДНР-I, а паніпенем з бетаміпроном, який є нирковозахисним засобом.

Недоліком цих антибіотиків є їх короткий період напіввиведення. Основна увага була спрямована на ідентифікацію сполук, стабільних щодо DHP-I, на більш сприятливих фармакокінетичних профілів і профілів безпеки.

З появою резистентності акцент зроблено на покращенні активності проти *P. aeruginosa* та MRSA.

Основне відкриття було зроблено з ідентифікацією L-646,591, який містить C-1 β-метильну групу. Це призводить до підвищеної стабільності щодо метаболізму за допомогою DHP-I.

Відкриття ефективних і високодіастереоселективних процесів для отримання проміжного продукту відкрило шлях для широких синтетичних проєктів (рис. 2.1.3, 2.1.4).

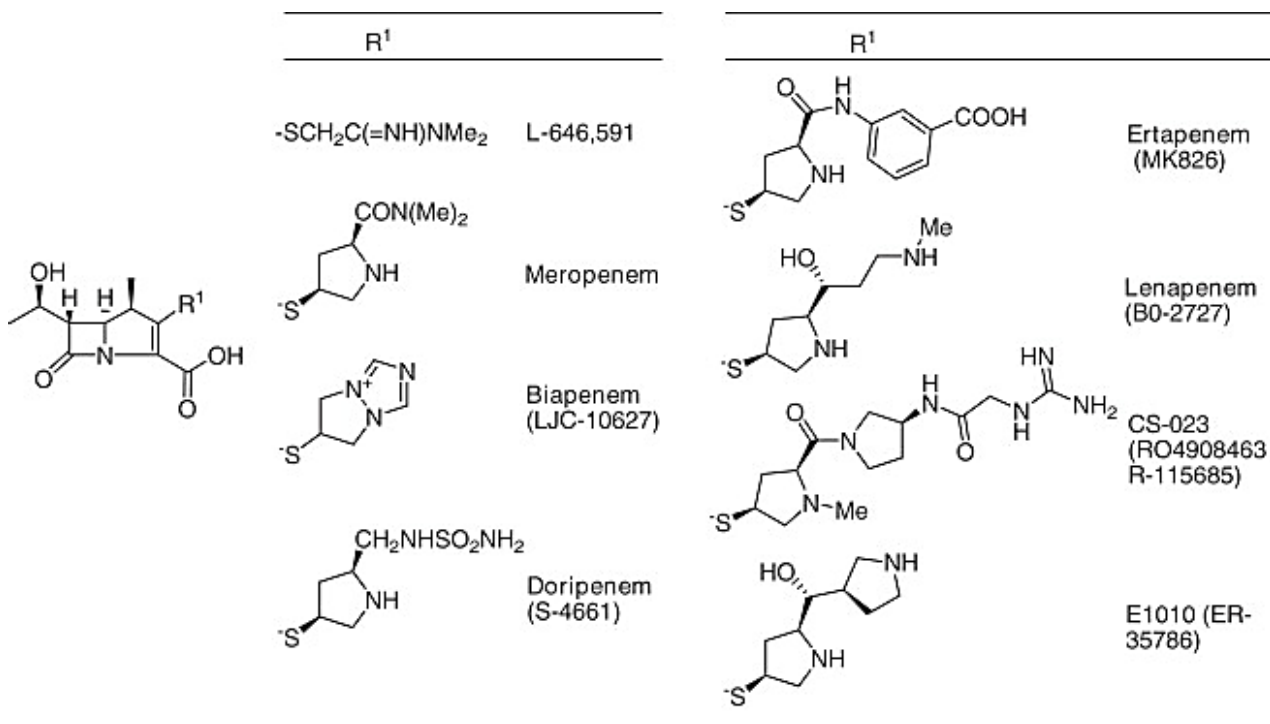


Рисунок 2.1.3. Структура релевантних 1β-метил карбапенетів.

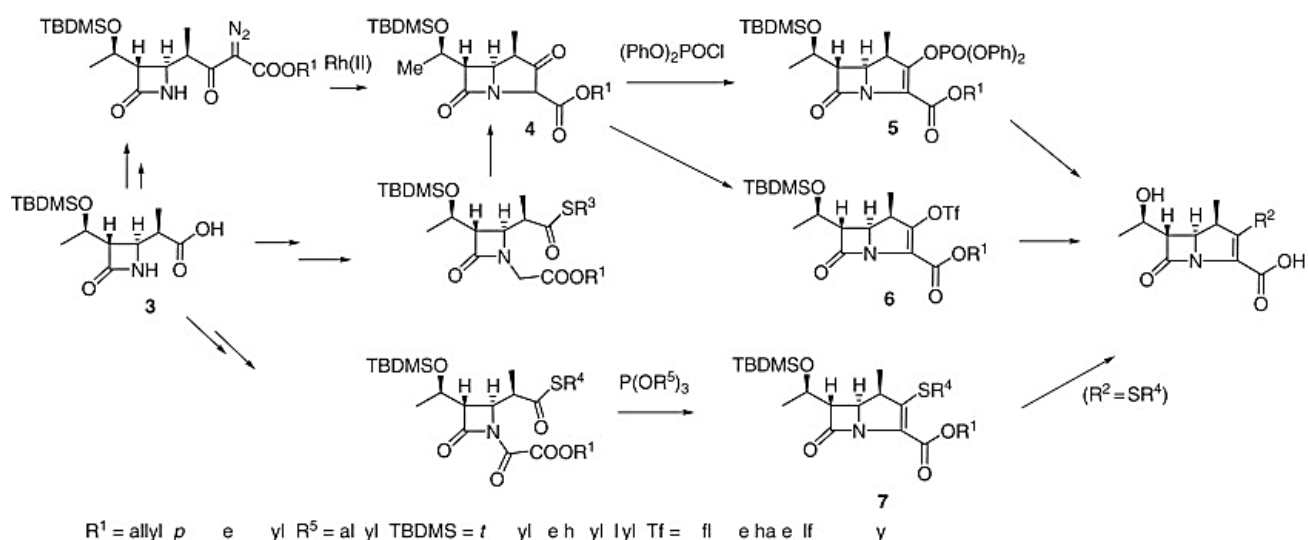


Рисунок 2.1.4. Загальна стратегія створення карбапенемів.

Скелет карбапенему будується трьома різними шляхами.

Замикання кільця досягається введенням карбену при каталізі родієм, конденсацією Дікмана, що призводить до 2-кето-проміжної сполуки.

Ця проміжна сполука перетворюється на свій енол-фосфат, або на відповідний енол-трифлат. Енол-фосфат далі реагує з нуклеофілом (похідним тіолу), а енол-трифлат – з галогенідом у реакціях перехресного сполучення. Реакції каталізуються перехідними металами.

2-тіозаміщені карбапенеми можна отримати термічною внутрішньомолекулярною реакцією Віттіга-Горнера.

Введення залишків (3S)-піролідинілію в положення C-2 забезпечує високу антибактеріальну активність.

Ці дослідження призвели до ідентифікації меропенему з таким же антибактеріальним спектром, як у іміпенему. Слабша активність проти грамположитивних аеробів, але підвищена активність проти грамнегативних аеробів були досягнуті.

Найважливіші характеристики меропенему: підвищена стабільність до DHP-I, хороша розчинність, хороша переносимість.



За меропенемом створено біапенем і дорипенем, які демонструють незначні покращення порівняно з меропенемом проти *P. Aeruginosa*.

Ертапенем характеризується вузьким спектром дії *P. aeruginosa*, але тривалим періодом напіввиведення.

Подовжено період напіввиведення ертапенему за рахунок наявності групи карбонової кислоти в заміснику в положенні С-2. Це посилює зв'язування з білками плазми. Завдяки високій активності проти *Enterobacteriaceae* ертапенем може бути наступником парентеральних цефалоспоринів 3-го покоління.

Виявлення сполуки з покращеною активністю проти *P. Aeruginosa* із загальним широким антибактеріальним спектром було успішним.

Найбільш цікавими сполуками є E1010, ленапенем, CS-023 та J-114,870. Ці сполуки виявляють підвищену активність порівняно з резистентною до карбапенему *P. aeruginosa* та стабільні до ДНР.

Вони мають період напіввиведення з сироватки крові, вищий, ніж у меропенему.

Основними проблемами є відсутність справжніх факторів диференціації в порівнянні з проданими на ринку карбапенемами.

Карбапенеми проникають у периплазматичний простір *P. aeruginosa* через загальні порини.

Іміпенем використовує специфічний порин OprD2, відповідальний за поглинання малих гідрофільних пептидів. Карбапенеми із відповідною активністю проти *P. aeruginosa*, є гідрофільними, цвіттеріонними досить малими за розміром. Основними причинами резистентності *P. aeruginosa* є втрата поринів OprD2 (іміпенем), знижена проникність водних каналів (карбапенеми), наявність активних систем відтоку.

Загальне зниження периплазматичної концентрації карбапенемів у поєднанні з надлишковим продукуванням різних типів β-лактамаз ускладнює

пригнічення росту *P. aeruginosa*. Жоден із нових карбапенемів не є стійким до гідролізу MBL (рис. 2.1.5).

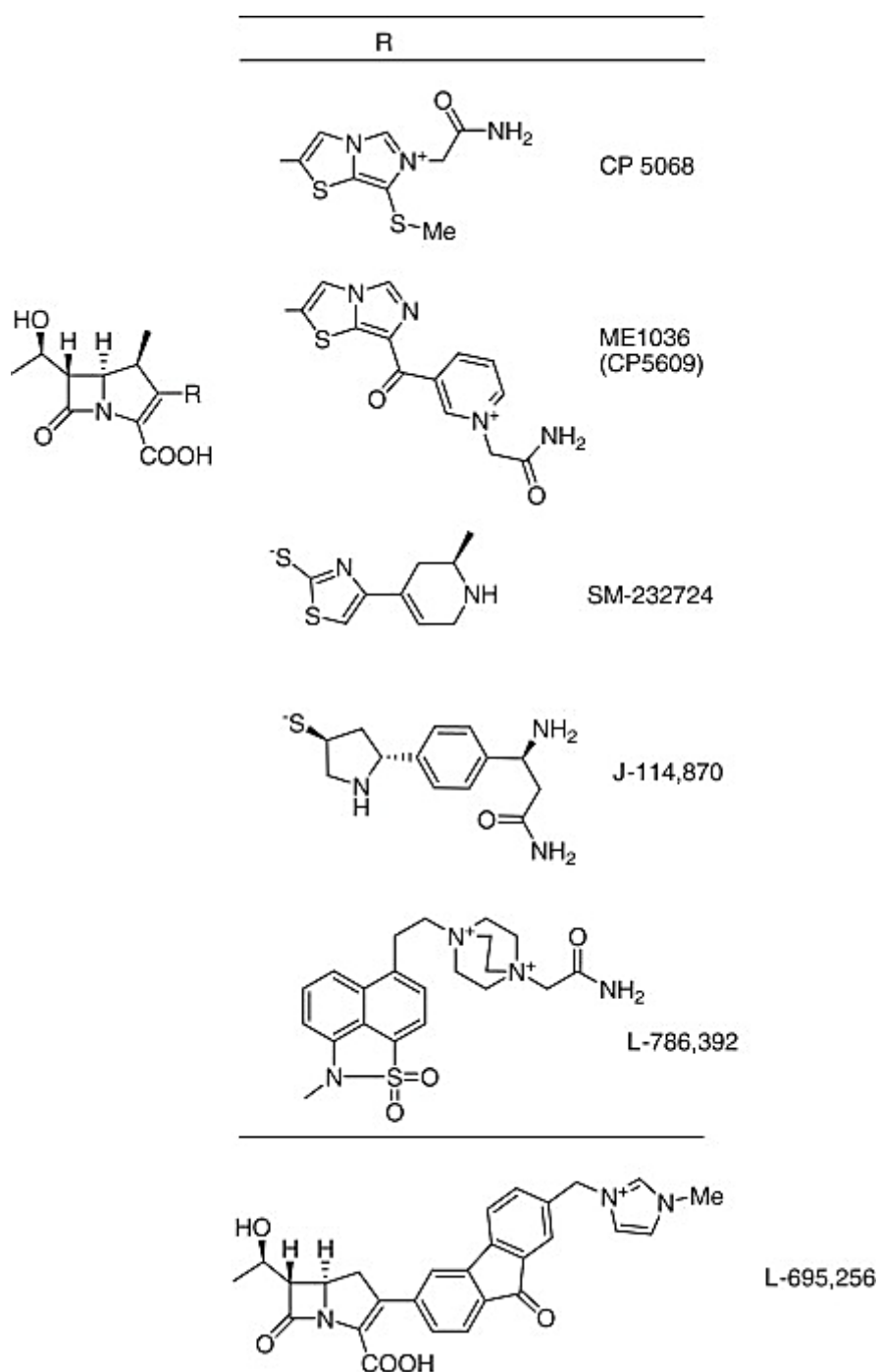


Рисунок 2.1.5. Представники анти-MRSA карбапенемів.

ДФУ не регламентує аналіз іміпенему [23]. Європейська Фармакопея регламентує аналіз цієї речовини [24] у виді іміпенему моногідрату та іміпенему гідрохлориду.

Іміпенем моногідрат. М.м. 317,4. Температуру плавлення 193-198°C.

Це білий або майже білий порошок або палево-жовтий, легко гігроскопічний.

Розчинність: легко розчинний у воді та у метанолі.

Чистота 98,0-102,0% (суха речовина).

Ідентифікація методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24) – відповідність спектру іміпенему ФСЗ.

Супровідні речовини визначають методом РХ (2.2.29).

Специфіковані домішки: А, В.

Для приготування рухомої фази А перемішують: ацетонітрил *P1* та буферний розчин А *P* (0,7 : 99,3, V/V).

Для приготування рухомої фази В перемішують: ацетонітрил *P1* та буферний розчин А *P* (25 : 75, V/V).

Для приготування буферного розчину А виконують процедуру - 0.32 г б/в натрію дигідрофосфату *P* та 1.04 г б/в динатрію гідрофосфату дигідрату *P* розчиняють у 900 мл води для хроматографії *P*, доводять рН до 7.3 фосфорною кислотою *P*, доводять об'єм до 1000 мл водою для хроматографії *P*.

Для приготування буферного розчину В виконують процедуру - 0.11 г б/в динатрію гідрофосфату *P* розчиняють у 900 мл води для хроматографії *P*, доводять рН до 6.8 фосфорною кислотою *P*, доводять об'єм до 1000 мл водою для хроматографії *P*.

УФ-детектування при 210 нм.

### РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Eur.Ph [24] регламентує аналіз субстанції у виді імпіпенему моногідрату та імпіпенему гідрохлориду.

В даній роботі дослідження імпіпенему субстанції у присутності субстанції циластатину, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Субстанція імпіпенему має різну розчинність у полярних та неполярних розчинниках: розчинна у воді *P* та розчинна у метанолі *P*.

Чистота субстанції. 98,0-102,0 %.

Ідентифікація проводиться за методом ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії (2.2.24), хроматографічним методом РХ (2.2.29). Порівняння проводиться із стандартом імпіпенему CRS.

Споріднені речовини досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ).

*Рухома фаза А:* ацетонітрил *P1* та буферний розчин *A P* (0,7 : 99,3, V/V).

*Рухома фаза В:* ацетонітрил *P1* та буферний розчин *A P* (25: 75, V/V).

*Буферний розчин А:* 0.32 г б/в натрію дигідрофосфату *P* та 1.04 г б/в динатрію гідрофосфату дигідрату *P* розчиняють у 900 мл води для хроматографії *P*, доводять рН до 7.3 фосфорною кислотою *P*, доводять об'єм до 1000 мл водою для хроматографії *P*.

*Буферний розчин В:* 0.11 г б/в динатрію гідрофосфату *P* розчиняють у 900 мл води для хроматографії *P*, доводять рН до 6.8 фосфорною кислотою *P*, доводять об'єм до 1000 мл водою для хроматографії *P*.

*Суміш розчинників:* ацетонітрил *P* та буферний розчин *B P* (0,7 : 99,3, V/V).

*Досліджуваний розчин:* 25,0 мг субстанції розчиняли у суміші розчинників, довели сумішню до об'єму 25,0 мл.

*Стандартний розчин (a):* 25,0 мг субстанції імпенему CRS розчиняли у суміші розчинників, доводили сумішню до об'єму 25,0 мл.

*Стандартний розчин (b):* 1.0 мл розчину досліджуваного доводили сумішню до об'єму 100,0 мл.

*Стандартний розчин (c):* 5.0 мг субстанції розчиняли у 8.0 мл суміші: 1 V розведеної кислоти сульфатної P та 200 V води P, додавали 10.0 мг натрію карбонату P, доводили до об'єму 10,0 мл водою P.

*Встановлено ліміти для домішок:*

Ліміт для домішки А – 1.0%;

Ліміт для домішки В – 0.3%;

Ліміт для неспецифікованих домішок – 0.10%;

Сума домішок – 1.5%.

Не враховують домішки (піки) – 0.05%.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції імпенему у присутності субстанції циластатину з метою розробки умов хроматографування, методик проведення процедур та визначення чистоти субстанцій.

### **Матеріали та методи.**

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором; колонка – INERTSIL ODS-3V, 0,25x4,6x5 з температурою – 30°C.

*Умови хроматографування:*

- час хроматографування – 56 хв;
- потік – 1,0 мл/хв;
- детектування – УФ при 210 нм;
- об'єм інжекції – 10 мкл;

*Рухома фаза А:* ацетонітрил P1 та буферний розчин А P (0,7 : 99,3, V/V).

*Рухома фаза В:* ацетонітрил P1 та буферний розчин А P (25: 75, V/V).

*Для композиції імпенем-циластатин:*

- детектування – УФ (іміпенем) при 300 нм;
- детектування – УФ (циластатин) при 220 нм;

Обробка субстанцій розчином кислоти мінеральної, лужним розчином, розчином калію перманганату, УФ-опромінення, нагрівання до 100 °С.

*Рухома фаза:* метанол: ацетонітрил (80:20, V/V).

*Методика приготування досліджуваного розчину:*

25,0 мг субстанції розчиняли у суміші розчинників, доводили сумішню до об'єму 25,0 мл.

*Методика приготування розчину порівняння (a):*

25,0 мг субстанції іміпенему CRS розчиняли у суміші розчинників, доводили сумішню до об'єму 25,0 мл.

*Методика приготування розчину порівняння (b):*

1.0 мл розчину досліджуваного доводили сумішню до об'єму 100,0 мл.

*Методика приготування розчину порівняння (c):*

5.0 мг субстанції розчиняли у 8.0 мл суміші: 1 V розведеної кислоти сульфатної P та 200 V води P, додавали 10.0 мг натрію карбонату P, доводили до об'єму 10,0 мл водою P.

Комп'ютерний аналіз за допомогою програми OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- розведена кислота сульфатна P (чистоти для ВЕРХ),
- натрію карбонату P (чистоти для ВЕРХ),
- б/в натрію дигідрофосфат P (чистоти для ВЕРХ),
- б/в динатрію гідрофосфату дигідрат P (чистоти для ВЕРХ),
- вода для хроматографії (чистоти для ВЕРХ).

### **Отримані результати.**

При дослідженні стандартних зразків Eur.Ph – розчинів порівняння, розчинів досліджуваного зразку отримано наступні результати (табл. 3.1, рис.3.1).

Таблиця 3.1. Розчини стандартних речовин.

	Стандарт (а)		Стандарт (б)	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	2,918	59,837	4,210	62,047
	2,930	61,500	4,215	63,333
	2,923	59,467		
<b>Середнє</b>	<b>2,926</b>	<b>59,268</b>	<b>4,211</b>	<b>62,690</b>
<b>SD</b>	<b>0,093</b>	<b>1,083</b>	<b>0,070</b>	<b>0,909</b>
<b>RSD(≤2.0%)</b>	<b>0,38%</b>	<b>1,80%</b>	<b>0,30%</b>	<b>1,45%</b>

*Розчини стандартні:*

*Іміпенем, стандарт (а):*

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 2,918-2,930 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 2,926 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 59.268;
- SD *Rt* 0.093;
- SD *Ar* 1.083;
- RSD *Rt* (<2.0%) 0.38%;
- RSD *Ar* (<2.0%) 1.80%.

*Циластатин, стандарт:*

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 4,210-4,215 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 4,211 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62,690;
- SD *Rt* 0.070;

- SD Ar 0.909;
- RSD Rt (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

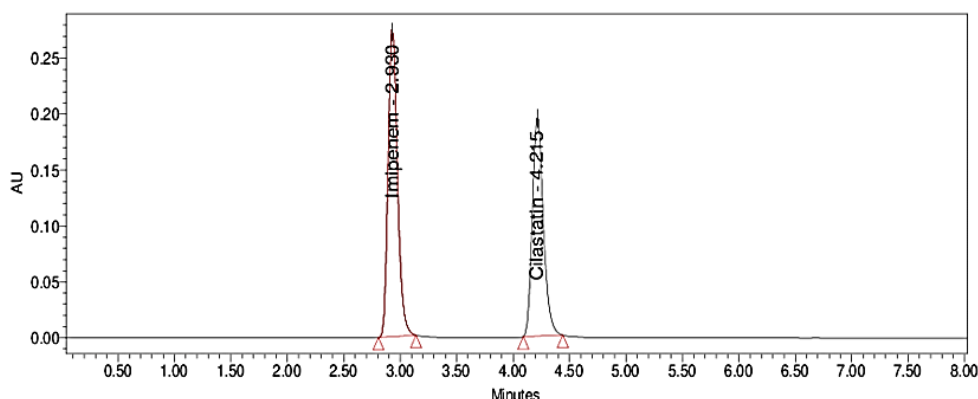


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартних речовин: імipенем ( $R_t=2,930$  хв), циластатин ( $R_t=4,215$  хв).

Таким чином, методом ВЕРХ з оберненою фазою було розроблена та підтверджена методика одночасного виявлення імipенему (ІРМ) і циластатину (СРН). Обидві субстанції стандартні та можливі продукти їх деградації (не виявлено) розділяли за допомогою рухомої фази: метанол : ацетонітрил (80:20, V/V). Час утримування для субстанцій становив 2,930 хв для ІРМ і 4,215 для СРН. Метод лінійним у діапазоні концентрацій 20-80 мкг/мл ( $R^2=0,9990$  (ІРМ) та  $R^2=0,9991$  (СРН)).

Запропоновані умови хроматографування забезпечили стабільність речовинам, продуктів розпаду в результаті деградації не виявлено.

Досліджуваний зразок (табл. 3.2, рис. 3.2):

Таблиця 3.2. Досліджуваний розчин.

Імipенем (40 мг/мл)		Циластатин(40 мг/мл)	
<i>R<sub>t</sub></i>	Area	<i>R<sub>t</sub></i>	Area
2.927	58.554	4.201	19.764
2.213	59.775	4.217	20.974
2.918	57.897	4.204	21.756



<b>Середнє:</b> 2.921	<b>Середнє:</b> 58.864	<b>Середнє:</b> 4.208	<b>Середнє:</b> 20.996
<b>% Деградації:</b> 1.51-4.74		<b>% Деградації:</b> 1.54-5.47	

*Іміпенем, зразок:*

- значення Rt знаходиться в інтервалі 2,213-2,927хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 2,921 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 57,897-58,897;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 58.864;
- SD Rt 0.093;
- SD Ar 1.083;
- RSD Rt (<2.0%) 0.38%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.80%.

*Циластатин, зразок:*

- значення Rt знаходиться в інтервалі 4,201-4,217 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 4,208 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 19,764-21,756;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 20,996;
- SD Rt 0.070;
- SD Ar 0.909;
- RSD Rt (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

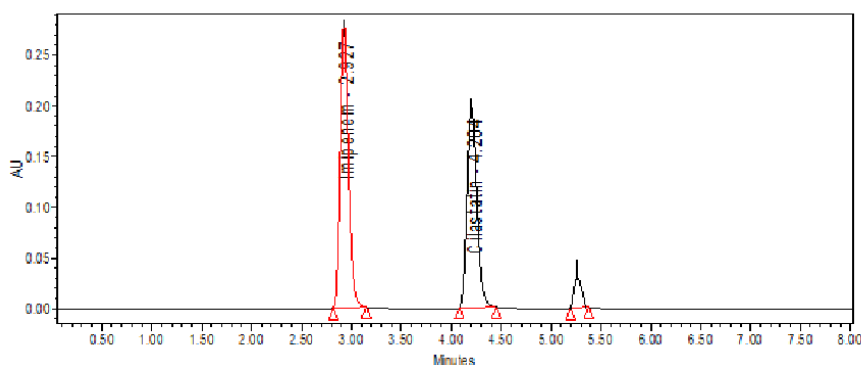


Рисунок 3.2. Хроматограма досліджуваних речовин: імпенем ( $R_t=2,927$  хв), циластатин ( $R_t=4,204$  хв), супровідна домішка (продукт деградації) ( $R_t=5,228$  хв).

Таким чином, під час хімічного, УФ-, термо- впливу на досліджувані субстанції знайдено, що можливе утворення домішок – які є неспецифіковані та відносяться до продуктів деградації субстанцій (табл. 3.3).

Таблиця 3.3. Утворення продуктів деградації субстанцій імпенему та циластатину.

Вплив на субстанцію	Імпенем, %	Циластатин, %
Кислота	4.74	5.47
Луг	3.59	2.42
Окислювач	1.76	3.48
УФ-опромінення	1.51	1.54
Термічний	1.75	1.25

Дослідження методу вказує, що субстанції нестабільні і підлягають деградації під впливом різних чинників. Найбільший % деградації субстанцій спостерігався при дії кислоти (4.74-5.47%), луку (2.42-3.59%) та окислювача (1.76-3.48%). Однак, продукти розпаду не заважали виявленню імпенему та циластатину. Досліджувані субстанції виявлялися хроматографічно стабільні.

Імпенем (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

Іміпенем, <i>стандарт</i> :	Іміпенем, <i>зразок</i> :
значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>2,918-2,930 хв</b> ;	значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>2,213-2,927 хв</b> ;
середнє значення $R_t$ стандартів знаходиться в інтервалі <b>2,926 хв</b> ;	середнє значення $R_t$ стандартів знаходиться в інтервалі <b>2,921 хв</b> ;
площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>59,467-61,500</b> ;	площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>57,897-58,897</b> ;
середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>59.268</b> ;	середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>58.864</b> ;

Циластатин (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

Циластатин, <i>стандарт</i> :	Циластатин, <i>зразок</i> :
значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>4,210-4,215 хв</b> ;	значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>4,201-4,217 хв</b> ;
середнє значення $R_t$ стандартів знаходиться в інтервалі <b>4,211 хв</b> ;	середнє значення $R_t$ стандартів знаходиться в інтервалі <b>4,208 хв</b> ;
площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>62,047-63,333</b> ;	площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>19,764-21,756</b> ;
середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>62,690</b> ;	середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>20,996</b> ;

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ та методики приготування зразків субстанції композиція Іміпенем-Циластатин (1:1) з метою визначення її чистоти, стабільності речовин у запропонованих умовах та виявлення продуктів деградації: детектування – УФ (іміпенем) при 300 нм; детектування – УФ (циластатин) при 220 нм; обробка субстанцій розчином кислоти мінеральної, лужним розчином, розчином калію перманганату, УФ-опромінення, нагрівання до 100 °C; *Рухома фаза*: метанол: ацетонітрил (80:20, V/V).
2. Знайдено, що субстанції нестабільні і підлягають деградації під впливом різних чинників: найбільший % деградації субстанцій спостерігався при дії кислоти (4.74-5.47%), луку (2.42-3.59%) та окислювача (1.76-3.48%), продукти розпаду не заважали виявленню іміпенему та циластатину.
3. Показники значення  $R_t$  іміпенему зразку знаходилися в інтервалі 2,213-2,927 хв (порівняно із  $R_t$  стандарту при 2,918-2,930 хв); значення  $R_t$  циластатину – у інтервалі 4,201-4,217 хв (порівняно із  $R_t$  стандарту при 4,210-4,215 хв), також була виявлена неспецифікована домішка (продукт деградації) з  $R_t=5,228$  хв.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. "Imipenem spectrum of bacterial susceptibility and Resistance" (PDF). Archived from the original (PDF) on 3 March 2016. Retrieved 4 May 2012.
2. "Imipenem-Cilastatin". LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. 17 January 2017. PMID 31644018. NBK548708. Retrieved 19 March 2020. {{cite book}}: |website
3. Satishkumar Bhawsar et al. Structure activity relationship (SAR) driven design and discovery of WCK 5107 (Zidebactam): novel  $\beta$ -lactam enhancer, potent against multidrug-resistant gram-negative pathogens. August 2023 *Medicinal Chemistry Research* 32(10):1-11. DOI:10.1007/s00044-023-03135-6
4. Bartolome Moya, Sachin Bhagwa, Antonio Oliver, Gabriel Cabot. Effective inhibition of PBPs by cefepime and zidebactam in the presence of VIM-1 drives potent bactericidal activity against MBL-expressing *Pseudomonas aeruginosa*. February 2020. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75(6). DOI:[10.1093/jac/dkaa036](https://doi.org/10.1093/jac/dkaa036)
5. Malligarjunan Rajavel et al. Structural Characterization of Diazabicyclooctane  $\beta$ -Lactam "Enhancers" in Complex with Penicillin-Binding Proteins PBP2 and PBP3 of *Pseudomonas aeruginosa*. February 2021. *mBio*® 12(1). DOI:10.1128/mBio.03058-20
6. Ayoub Moubareck, C. & Hammoudi Halat, D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics* **9**, 119. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119> (2020).
7. Hammoudi Halat, D. & Ayoub Moubareck, C. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics* **9**, 186. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186> (2020).

8. Doi, Y. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **69**, S565–S575. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830> (2019).
9. Derington, C. G., Benavides, N., Delate, T. & Fish, D. N. Multiple-dose oral fosfomycin for treatment of complicated urinary tract infections in the outpatient setting. *Open Forum Infect. Dis.* **7**, ofaa034. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa034> (2020).
10. Albiero, J. *et al.* Pharmacodynamic attainment of the synergism of meropenem and fosfomycin combination against *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **63**, e00126-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-19> (2019).
11. Gil-Marques, M. L. *et al.* Peptidoglycan recycling contributes to intrinsic resistance to fosfomycin in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 2960–2968. <https://doi.org/10.1093/jac/dky289> (2018).
12. Singkham-In, U. & Chatsuwana, T. In vitro activities of carbapenems in combination with amikacin, colistin, or fosfomycin against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **91**, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.008> (2018).
13. Chen, F. J. *et al.* Molecular epidemiology of emerging carbapenem resistance in *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* in Taiwan, 2010 to 2014. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e02007-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02007-18> (2019).
14. Jolley, K. A., Bray, J. E. & Maiden, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* **3**, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1> (2018).
15. Uppalapati, S. R., Sett, A. & Pathania, R. The outer membrane proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* confer a two-pronged

- defense in facilitating its success as a potent human pathogen. *Front. Microbiol.* **11**, 589234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589234> (2020).
16. Lee, Y. T. *et al.* AdeABC efflux pump controlled by AdeRS two component system conferring resistance to tigecycline, omadacycline and eravacycline in clinical carbapenem resistant *Acinetobacter nosocomialis*. *Front. Microbiol.* **11**, 584789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584789> (2020).
17. Ku, N. S. *et al.* In vivo efficacy of combination of colistin with fosfomycin or minocycline in a mouse model of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Sci. Rep.* **9**, 17127. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53714-0> (2019).
18. Dik, D. A., Fisher, J. F. & Mobashery, S. Cell-wall recycling of the gram-negative bacteria and the nexus to antibiotic resistance. *Chem. Rev.* **118**, 5952–5984. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00277> (2018).
19. Geisinger, E. *et al.* Antibiotic susceptibility signatures identify potential antimicrobial targets in the *Acinetobacter baumannii* cell envelope. *Nat. Commun.* **11**, 4522. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18301-2> (2020).
20. Andersson, D. I., Nicoloff, H. & Hjort, K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 479–496. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1> (2019).
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 30th informational supplement. Approved standard M100-S30 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020).
22. Beneficial herb-drug interaction of rhein in Jinhongtang and Imipenem/Cilastatin mediated by organic anion transporters. *Journal of Ethnopharmacology*. 2023-08-10. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116449
23. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості

лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів.  
2014. Т. 2.

24. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019.  
V.1: 2930-2932.

---



## SUMMARY

**Chala Alina**  
**INSTRUMENTAL CONFIRMATION OF THE DEGREE OF PURITY AND QUANTITATIVE RATIO OF SUBSTANCES OF ACTIVE SUBSTANCES OF SYNTHETIC ANTIBIOTICS – IMIPENEM AND CILASTATIN SODIUM**

**The department of medicinal chemistry and toxicology**

**Scientific supervisor: PhD (Biol), assistant Meleshko R.A.**

**Keywords:** imipenem, cilastatin, HPLC, impurities.

**Introduction.** Imipenem is a synthetic  $\beta$ -lactam antibiotic belonging to the chemical class of carbapenems. Imipenem is highly resistant to  $\beta$ -lactamase enzymes, which are produced by drug-resistant gram-negative bacteria. Imipenem plays an important role in the treatment of infections that cannot be treated with other antibiotics. Imipenem was developed through a long search for a more stable version of the natural product thienamycin. Thienamycin is produced by the bacterium *Streptomyces cattleya*. Cilastatin inhibits the enzyme dehydropeptidase, which is found in the kidneys and is responsible for breaking down the antibiotic imipenem. Cilastatin is administered intravenously with imipenem to protect it from degradation. Imipenem is an effective antibiotic by itself and can be prescribed without cilastatin. Cilastatin has no antibacterial activity, but it is active against zinc-dependent beta-lactamase, which commonly confers antibiotic resistance in some patients.

**Materials and methods.** Research object are imipenem, cilastatin, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of imipenem and cilastatin. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; computer analysis using the OpenLab CDS program.

**Results.** The conditions of chromatographic research using the HPLC method and the methods of preparing samples of the substance composition Imipenem-Cilastatin (1:1) were developed in order to determine its purity, stability of substances under the proposed conditions and detection of degradation products: detection - UV (imipenem) at 300 nm; detection – UV (cilastatin) at 220 nm; treatment of substances with mineral acid solution, alkaline solution, potassium permanganate solution, UV irradiation, heating to 100 oC; Mobile phase: methanol: acetonitrile (80:20, V/V).

**Conclusions.** It was found that the substances are unstable and subject to degradation under the influence of various factors: the highest % degradation of substances was observed under the action of acid (4.74-5.47%), alkali (2.42-3.59%) and oxidizing agent (1.76-3.48%), decomposition products did not interfere detection of imipenem and cilastatin. Indicators of the  $R_t$  value of imipenem of the sample were in the interval of 2.213-2.927 min (compared with the  $R_t$  of the standard at 2.918-2.930 min); the  $R_t$  value of cilastatin is in the range of 4.201-4.217 min (compared to the  $R_t$  of the standard at 4.210-4.215 min), an unspecified impurity (degradation product) with  $R_t=5.228$  min was also detected.

## ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

Вельчинська Олена,  
Малюта Наталія,  
Зелена Яна, **Чала Аліна.**  
Характеристика лікарських форм ліків із модифікованим вивільненням: фізико-хімічні параметри. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-2023», 23-24 листопада 2023 року, стор. 23.



FIP Symposium, Digital Event  
«Designing pharmacies towards an accessible, patient-centred and service-oriented model of practice»,  
12.09.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.

