

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Ідентифікація та кількісне визначення цефепіму і сульбактаму
у складі двокомпонентної субстанції методом ВЕРХ»

Виконав: здобувач вищої освіти 6 курсу, групи 1082А
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)

Рейпашій Оксана Федорівна
(прізвище та ініціали)

Керівник: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: к.б.н. Мелешко Р.А.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2025-2026 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	9
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови	9
1.2. Біологічна активність	15
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ.....	19
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	19
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	27
 ВИСНОВКИ.....	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38
SUMMARY.....	43
ДОДАТОК 1.....	44

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

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

MOR – μ -opioid receptor

ВСТУП

Актуальність теми. Цефепім відноситься до протимікробних засобів для системного застосування. Препарат є β -лактамним антибіотиком. Лікарський засіб пригнічує синтез ферментів стінки бактеріальної клітини, має широкий спектр дії щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій. Цефепім високостійкий до гідролізу більшістю β -лактамаз. Має малу спорідненість щодо β -лактамаз, що кодуються хромосомними генами. Цефепім швидко проникає у грамнегативні бактеріальні клітини.

Цефепім і сульбактам як АФІ входять до складу деяких лікарських засобів – бета-лактамних антибіотиків цефалоспоринової групи, наприклад Норфепім. Лікарський засіб використовується у монотерапії та у комбінованій терапії.

Норфепім використовують для лікування:

- інфекцій дихальних шляхів (пневмонію, спричинену полірезистентними збудниками, бронхіт, гнійний бронхіт, абсцес легень);
- інфекції черевної порожнини (перитоніт, холецистит, холангіт, інфікований панкреонекроз, панкреатогенний абсцес);
- інфекції позачеревної клітковини (паранефрит);
- гнійно-запальні захворювання — парапроктит;
- інфекції сечовивідних шляхів (пієлонефрит, абсцес нирки, цистит);
- інфекції шкіри і м'яких тканин (абсцеси, флегмони, виразки, інфіковані нориці, гангрена кінцівок;
- лікування гнійно-септичних ускладнень при діабетичній стопи;
- інфекції кісток і суглобів (бактеріальний артрит, остеомієліт);
- інфекції сечостатевої системи у чоловіків — простатит, орхіт, епідидиміт тощо [1-9].

Хімічна структура цефепіму – це складна біциклічна кільцева система цефем з бічними ланцюгами в положеннях 3 та 7. Повна хімічна назва — (6R,7R)-7-{[(2Z)-2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-(метоксиіміно)ацетил]аміно}-3-[(1-метилпіролідиній-1-іл)метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіциклоокт-2-ен-2-карбоксилат. Ключові функціональні групи: (2-аміно-1,3-тіазол-4-іл) пов'язана через метоксиіміноацетильний ланцюг у положенні 7, (1-метилпіролідиній-1-іл)метильна група в положенні 3.

Основна структура-скаффолд молекули - це 5-тіа-1-азабіциклоокт-2-енове ядро, характерне для цефалоспоринів. Бічний ланцюг знаходиться у положенні 7: (2Z)-2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-(метоксиіміно)ацетильна група. Бічний ланцюг знаходиться у положенні 3: (1-метилпіролідиній-1-іл)метильна група.

Хімічна структура сульбактаму натрію – це натрієва сіль (2S,5R)-3,3-диметил-4,4,7-тріоксо-4-тіа-1-азабіциклогептан-2-карбоксилату. Структура молекули містить β-лактамне кільце, яке конденсоване з тіазолідиновим кільцем, з двома кетонними групами, приєднаними до атома сульфуру. Ця особливість робить його сульфоном. Систематична назва цієї речовини: Натрій (2S,5R)-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіциклогептан-2-карбоксилат 4,4-діоксид. До структурних особливостей відносять: біциклічну структуру з β-лактамним кільцем та тіазолідинове кільце, які утворюють фармакофорні угруповання [10-15].

Під час синтезу субстанцій завжди можливе утворення побічних продуктів синтезу. Під час очистки кожної субстанції часто залишаються специфічні і неспецифічні домішки. Домішки негативно впливає на якість лікарських засобів.

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанцій Цефепім і сульбактам. Цефепім і сульбактам можна проаналізувати за монографіями Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані

і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29) [27, 28].

Таким чином, використовуючи валідовані методики дослідження окремих субстанцій Цефепіму та Сульбактаму, які виконуються методом РХ, в Європейській Фармакопеї, постає завдання осучаснити їх методи аналізу, адаптувати хроматографічні умови та методики дослідження більш ефективним методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в умовах аналізу двохкомпонентної суміші цих субстанцій. Це дозволить розширити коло інструментальних методів дослідження субстанції та запропонувати нові методики дослідження.

Під час розробки та адаптування умов хроматографування субстанцій важливі відтворювані умови дослідження, оскільки під час проведення хроматографічних досліджень можлива хімічна деградація молекул, яка може привести до збільшення кількості домішок та продуктів розпаду.

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу ВЕРХ для ідентифікації та кількісного визначення АФІ Цефепім та Сульбактам у складі двохкомпонентної суміші субстанцій, визначення їх чистоти та кількісного визначення.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація, визначення чистоти та кількісного вмісту методом ВЕРХ двохкомпонентної суміші субстанцій АФІ Цефепім та Сульбактам, адаптація умов хроматографування випробовуваної суміші.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати та визначити кількісний вміст методом ВЕРХ АФІ Цефепім та Сульбактам у складі двохкомпонентної суміші субстанцій;
- визначити чистоту досліджуваної двохкомпонентної суміші субстанцій Цефепім та Сульбактам хроматографічним методом (ВЕРХ)

(присутність супровідних речовин);

- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекул речовин від хімічної деградації.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1200 з DAD детектором, колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x5 (або аналогічна); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у осучасненні фармацевтичного аналізу шляхом впровадження високоселективного хроматографічного методу ВЕРХ для ідентифікації, визначення чистоти та кількісного вмісту двохкомпонентної суміші субстанцій АФІ Цефепім та Сульбактам, адаптація умов хроматографування випробовуваної суміші.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції

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

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 44, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 28.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ

1.1. Особливості хімічної будови

Інфекції, спричинені *Pseudomonas Aeruginosa* (ПсА), ускладнюються множинною лікарською стійкістю. Карбапенем-резистентному ПсА надано статус високого пріоритету у списку пріоритетів ВООЗ серед бактеріальних патогенів. Ці патогени терміново потребують нових антибіотиків. Потреба в ефективних антибіотиках найбільш виражена для ізолятів ПсА з лікарською стійкістю, які чутливі до двох або менше класів антибіотиків.

Вони часто мають одночасно ферментативні і неферментативні механізми резистентності. Співіснування β -лактамаз широкого спектру дії (цефалоспориноаз та метало-бета-лактамаз-MBL) із надмірною експресією виведення, втратою та змінами цільових ділянок у пермутаціях обмежує корисність комбінацій β -лактамів/ β -лактамних інгібіторів (BL-BLI): азтреонам/авібактам (AZT/AVI), цефтолозан/тазобактам (TOL/TAZO), імipенем/релебактам (IMI/REL). Це призводить до використання агентів з низькою ефективністю та безпекою.

FER/ZID – це нова комбінація BL-BLE, яка залишається активною проти ферментативних (MBL) та неферментативних механізмів резистентності.

Це пов'язано з його одночасним та взаємним пригніченням кількох пеніцилін-зв'язуючих білків (ПЗБ) – ПЗБ-2 зидебактамом та ПЗБ-1а, ПЗБ-3 цефепімом. Його антибактеріальний спектр зі сприятливими фармакокінетичними властивостями призвів до повідомлень про його

застосування з міркувань гуманності. Його ефективність та безпека при інфекціях значною мірою невідомі [16-19].

Повідомлялося про лікування пацієнтів з інфекціями, пов'язаними з ПсА, що викликають поширену лікарську стійкість, за допомогою FEP/ZID. Мікробіологічне тестування чутливості для кожного було проведено з використанням стандартизованих методів. Чутливість до антибіотиків інтерпретували відповідно до критеріїв CLSI. CLSI призначив досліджуване граничне значення ≤ 64 мг/л для ПсА. Фенотипове тестування чутливості співвіднесено з повногеномним секвенуванням (WGS), проведеним з використанням стандартних методів.

Завдяки мікробіологічній та супутній клініко-рентгенологічній інформації підтверджено, що всі пацієнти мали серйозні інфекції, які неможливо лікувати доступними методами лікування. Рішення про використання препарату FEP/ZID було прийнято після отримання письмової інформованої згоди від пацієнтів. Інституційна етична рада схвалила дослідження (номер IRB). Флакони для ін'єкцій FEP/ZID були надані компанією Wockhardt Ltd.

Глобальні колекції ПсА мають різноманітні механізми резистентності. Виробництво цефалоспориноз та карбапенамаз (MBL) значно сприяє резистентності до бета-лактамів, що спостерігається при ПсА. AVI/AZT стабільний проти MBL. Співіснування гіперрефлюксу перешкоджає широкому використанню цієї комбінації. TOL/TAZO та IMI/REL не мають активності проти MBL. Цефепім-таніборбактам неефективний проти їх підтипу IMP. Надмірна експресія/мутовані форми цефалоспориноз та бета-лактамаз OXA розширеного спектру разом з мутаціями в поринах та PBP є іншими механізмами резистентності до новіших BL-BLI.

Цефідерокол має потужну активність проти важколікувального (DTR) ПсА. Вищі мінімальні інгібуючі концентрації (MIK) відзначаються для ізолятів, що містять бета-лактамази (PER, PDC-30, GES-6): специфічні типи

MBL (VIM-2, NDM-1, 5, 7 та 9). Він неефективний для ізолятів з мутаціями, що впливають на сидерофори (p*iuD*), надмірною експресією ефлюкських насосів (MexAB–OprM), зниженням кількості поринових каналів (OprD).

Зидебактам – це новий біциклоацилгідразид DBO (діазабіциклооктан). Він рівномірно стабільний проти всіх β -лактамаз, включаючи MBL. Він проявляє власну антибактеріальну активність завдяки високій спорідненості зі зв'язуванням з PBP-2. При використанні разом з цефепімом (впливає на PBP-1a, PBP-3) ця комбінація має потужний бактерицидний ефект завдяки багатоцентровому та комплементарному інгібуванню PBP.

На відміну від багатьох BL-BLI, його антибактеріальна активність залежить від одночасного насичення кількох PBP. Він долає резистентність, опосередковану карбапенамазами, неферментативними механізмами резистентності. Це актуально для ізолятів XDR PsA, які мають одночасно кілька механізмів резистентності. Такий резистотип відзначений у більшості ізолятів у нашому дослідженні.

FEP/ZID пройшов кілька досліджень фази 1 (NCT02674347, NCT02707107, NCT03554304), які підтвердили його безпеку. Його оцінювали у осіб зі зміненою функцією нирок для визначення дози при нирковій недостатності. Проводиться глобальне, рандомізоване, подвійне сліпе, багатоцентрове дослідження не меншої ефективності фази 3 для оцінки ефективності та безпеки при ускладнених інфекціях сечовивідних шляхів (сІСШ). Препарат проходить обсерваційне дослідження фази 2 для оцінки безпеки та ефективності у пацієнтів з внутрішньолікарняною/асоційованою з апаратом штучної вентиляції легень, ускладненими внутрішньочеревними інфекціями (УВЧІ) та УВЧІ.

Повідомлено про успішне використання ФЕП/ЗІД для лікування інфекцій, спричинених PsA. До них належать дисемінована інфекція (бактеріємія, пневмонія, гангренозна ектіма) на тлі гематологічного

злоякісного новоутворення, синопульмональна інфекція. Усі пацієнти мали успішні результати.

Досліджували FEP/ZID для пацієнтів з глибокими інфекціями, спричиненими XDR PsA: кістково-суглобові захворювання (септичний артрит), ендovasкулярна інфекція місця трансплантації. Всі випадки були ускладнені значним утворенням біоплівки. Спостерігали задовільне та стійке клініко-радіологічне покращення у всіх пацієнтів. Це пов'язано з його чудовою активністю щодо ерадикації біоплівки та ефектом комбінації BL-BLE.

Зидебактам знижує мінімальний час, необхідний для досягнення концентрації вище мінімальної інгібуючої концентрації (% fT>MIC) для цефепіму і забезпечує клінічну ефективність у цільових ділянках з обмеженим впливом препарату. Він має чудовий профіль безпеки при тривалому застосуванні.

Масштабні клінічні випробування у пацієнтів з різними клінічними синдромами та порівняння з чинним стандартом лікування ще більше посилили його роль як життєво важливого варіанту лікування грамнегативних інфекцій, спричинених XDR.

Повідомлено про використання FEP/ZID для успішного лікування п'яти глибоких інфекцій, пов'язаних з PsA з поширеною лікарською здатністю (XDR), ускладнених біоплівками. Досвід підтверджує його профіль безпеки та ефективності. Результати актуальні в умовах, коли резистентність до антимікробних препаратів при PsA опосередковується низкою ферментативних та неферментативних механізмів.

Для подальшої характеристики клінічної корисності необхідні майбутні клінічні випробування, досвід використання препарату [17-22].

Цефепім – це складна біциклічна кільцева система цефем з бічними ланцюгами в положеннях 3 та 7. Його хімічна назва — (6R,7R)-7-{{[(2Z)-2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-(метоксиіміно)ацетил]аміно}-3-[(1-метилпіролідиній-1-іл)метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіциклоокт-2-ен-2-карбоксилат (рис. 1.1.1).

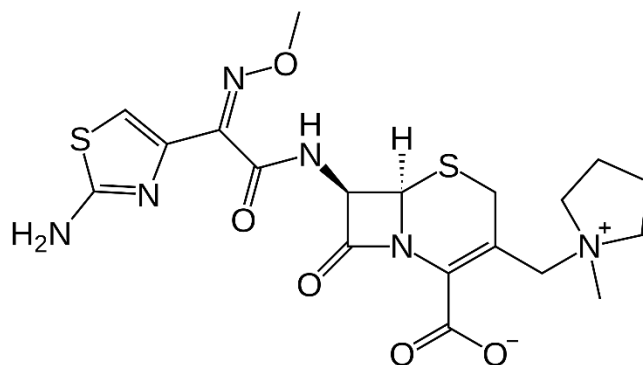


Рисунок 1.1.1. Цефепім, хімічна формула.

Сульбактам натрію має хімічну назву натрієва сіль (2S,5R)-3,3-диметил-4,4,7-тріоксо-4-тіа-1-азабіциклогептан-2-карбоксилату (рис. 1.1.2).

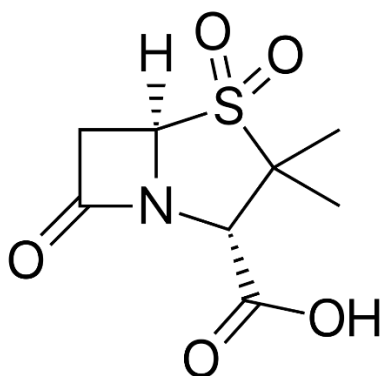


Рисунок 1.1.2. Сульбактам, хімічна формула.

Сульбактам застосовується сумісно з антибіотиками групи пеніцилінів та цефалоспоринів. Його використовують при інфекціях верхніх та нижніх дихальних шляхів (абсцес легень, емпієма плеври), ЛОР-органів, ускладнених інфекціях сечовидільних шляхів, інфекціях шкіри та м'яких тканин тощо [22-24].

Розроблено нові комбінації β -лактамів та інгібіторів β -лактамі- β -лактамаз (BL-BLI), стійкі до гідролізу ESBL та певними карбапенемазами. До них належать цефідерокол, меропенем/ваборбактам, іміпенем/релебактам,

цефтазидим/авібактам. Ці сполуки мають спектр дії, що виходить за рамки монотерапії карбапенемами. Вони призначені для лікування інфекцій, спричинених організмами, стійкими до карбапенемів.

Цефтолозан/тазобактам – новий BL-BLI, який зберігає активність проти ESBL. Він має додаткову особливу активність проти видів *Pseudomonas* з множинною лікарською стійкістю (MDR).

Існують інші β -лактамні агенти (темоцилін, фломоксеф), які зберігають стабільність проти ESBL. Для збереження використання цих агентів широкого спектру дії потрібні сполуки, які є широкодоступними, стабільними проти ESBL, можуть бути використані як агенти, що не містять карбапенемів. Цефепім/енметазобактам позиціонує себе для виконання цієї ролі.

Цефепім – це цефалоспорин четвертого покоління зі структурною схожістю з цефалоспоринами третього покоління. N-метилпіролідонівий фрагмент у положенні 3' шестичленного сірковмісного дигідротіазинового кільця надає цвітеріонних властивостей, посилює внутрішньоклітинне проникнення препарату в бактерії.

Цефепім має широку активність проти грампозитивних та грамнегативних бактерій (*Pseudomonas*), за винятком ентерококів та анаеробів (як інших цефалоспоринів).

Цефепім відносно стійкий до гідролізу ESBL класу C за Амблером. Він гідролізується іншими ферментами ESBL і пов'язаний з клінічною невдачею при використанні при інфекціях, спричинених бактеріями, що продукують ESBL (рис. 1.1.3) [23-26].

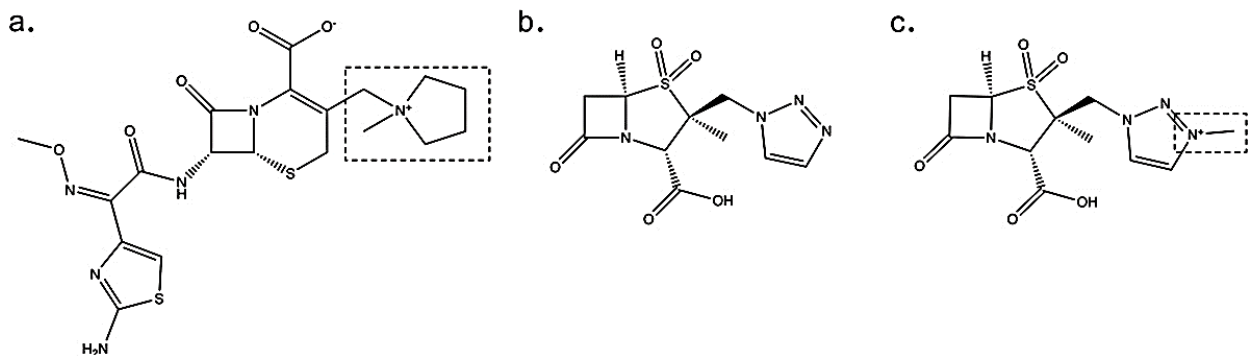


Рисунок 1.1.3. Молекулярна структура цефепіму (а), тазобактаму (б) та енметазобактаму (с).

1.2. Біологічна активність

Цефепім має широку грампозитивну та грамнегативну активність, проти *Pseudomonas aeruginosa* та ентеробактерій, що продукують AmpC. Додавання енметазобактаму розширює спектр активності цефепіму – це ентеробактерії, що продукують ESBL. Невідомо про спектр активності на види *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, MDR *Pseudomonas*, метицилін-резистентний золотистий стафілокок (MRSA), види *Enterococcus* та анаероби.

Енметазобактам пригнічує внутрішні механізми резистентності видів *Burkholderia* in vitro.

Тестування на чутливість до антимікробних препаратів. Чутливість до цефепіму/енметазобактаму визначається визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) цефепіму на фіксованій концентрації енметазобактаму (8 мкг/мл) за допомогою методу мікророзведення бульйону. За допомогою методу диско-дифузії з диском, що містить цефепім/енметазобактам (30/20 мкг) (рис. 1.2.1).

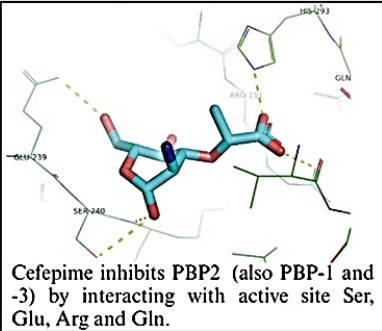
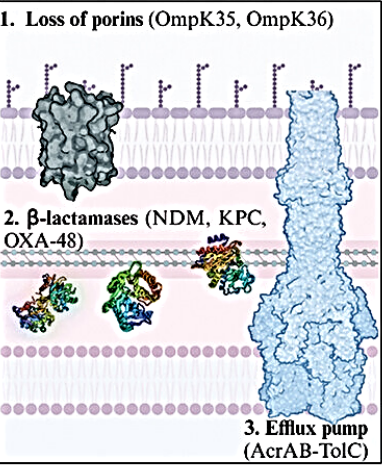
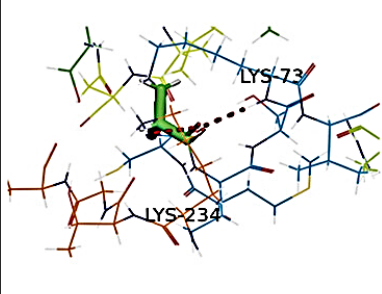
	Mode of Action	Mechanism of resistance	Spectrum of activity
Cefepime	 Cefepime inhibits PBP2 (also PBP-1 and -3) by interacting with active site Ser, Glu, Arg and Gln.	 1. Loss of porins (OmpK35, OmpK36) 2. β-lactamases (NDM, KPC, OXA-48) 3. Efflux pump (AcrAB-TolC)	Active against: Streptococci MSSA Enterobacterales (including Class A and C ESBL producers) <i>Pseudomonas</i> species Notable gaps: Enterococci Anaerobes <i>Acinetobacter</i> species <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Carbapenemase-producing Enterobacterales
Enmetazobactam	 Enmetazobactam facilitates formation of a lysinoalanine cross link between Ser70 and Lys73, rendering CTX-M-15 ineffective	Significant toxicities • β-lactam hypersensitivity • <i>C. difficile</i>-associated diarrhoea • Heterogenous dose-dependent neurotoxicity	Licenced indications For adults only: 1. eUTI caused by <i>E. coli</i>, <i>K pneumoniae</i>, <i>P. mirabilis</i> and <i>E. cloacae</i>; (confirmed or suspected) [US only] or no species qualification [EU and UK only] 2. HAP/VAP [EU and UK only] 3. Bacteraemia associated or suspected to be associated with 1 or 2 [EU and UK only]
Pharmacokinetics			
Absorption	 Both cefepime and enmetazobactam are only administered as intravenous formulation The standard regimen is 2g/0.5g IV q8h with dose adjustment for renal impairment C_{max}: Cefepime= 87-100mg/L ; Enmetazobactam=17-20 mg/L AUC: Cefepime=379.5 mg.h/L ; Enmetazobactam=75.3 mg.h/L		
Distribution	 Average steady-state volume of distribution of both cefepime and enmetazobactam is 16.9-21 L. Cefepime display serum protein binding of ~16.2-19% (independent of its concentration in serum); Enmetazobactam demonstrate negligible serum protein binding properties.		
Metabolism	 Approximately 7% of administered cefepime of administered is metabolised to N-methylpyrrolidine, which upon further oxidation step yield a more stable N-methylpyrrolidine oxide. A further 3% is metabolised to an epimer of cefepime, with 10-12% metabolism rate overall. Enmetazobactam is negligibly metabolised in humans.		
Excretion	 About 90% of cefepime and enmetazobactam is excreted unchanged to the urine 24h after a single dose. Half-life: Cefepime= 2.7 h; Enmetazobactam= 2.6 h.		

Рисунок 1.2.1. Опис фармакологічних властивостей цефепіму/енметазабактаму.

Світ стикається з пандемією COVID-19 (SARS CoV-2). Вірус є високоінфекційним. Наразі специфічних методів лікування COVID-19 не існує. Терапевтичні стратегії базуються на перепрофілюванні доступних препаратів як противірусних засобів (івермектину та ніклозаміду) або контролі імунної відповіді за допомогою імуномодуючих засобів та кортикостероїдів. Повідомлялося про застосування антикоагулянтів у пацієнтів з тяжким перебігом захворювання на COVID-19.

Антибіотики використовуються як захисний засіб проти вторинної бактеріальної коінфекції, суперінфекції. Використання антибіотиків у пацієнтів з COVID-19 є суперечливим. Вони продемонстрували терапевтичні переваги, особливо у пацієнтів з тяжкою пневмонією.

Однією серйозною проблемою неконтрольованого використання антибіотиків є швидкий розвиток резистентності. Використання обмеженої кількості доступних антибіотиків, які можуть мати противірусну активність проти SARS CoV-2, матиме великий потенціал для покращення темпів одужання пацієнтів з COVID-19 (рис. 1.2.2).

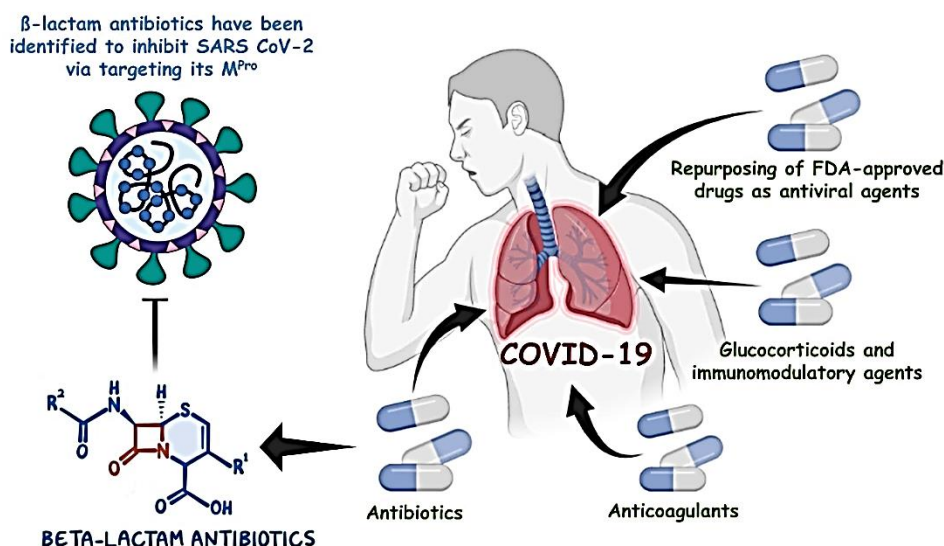


Рисунок 1.2.2. Схематичне зображення сучасних терапевтичних засобів проти COVID-19.

Тестування *in vitro* цефтазидиму та цефепіму проти SARS CoV-2' MPro показало, що вони здатні пригнічувати каталітичну активність ферменту при мікромольній концентрації ($IC_{50} = 1,81$ та $8,53$ мкМ) з конкурентним типом інгібування ($K_i = 1,1$ та $5,26$ мкМ) (рис. 1.2.3).

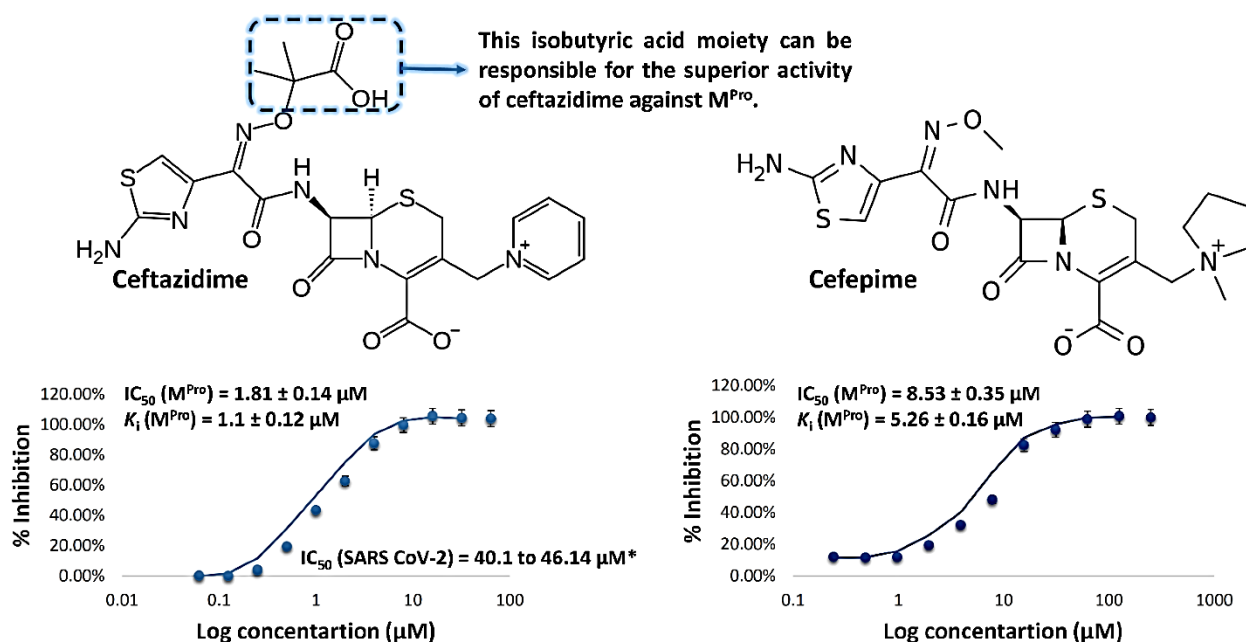


Рисунок 1.2.3. Інhibуюча активність цефтазидиму та цефепіму щодо MPro.

З антибіотиками проведено молекулярні докінгові експерименти *in silico*. Використовували каталітичний сайт ферменту. Експерименти *in vitro* показали, що обидва антибіотики інгібували фермент шляхом конкуренції нормального субстрату за активний сайт. Продемонструвано, що активний каталітичний сайт є гнучким.

Використання різних конформацій активного сайту, отриманих за допомогою молекулярно-динамічного моделювання (MDS), для докінгових експериментів дасть точніші результати.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Цефепіму гідрохлорид – це цефалоспориновий антибіотик четвертого покоління для ін'єкцій. Порівняно зі звичайним цефалоспорином третього покоління, цефалоспорин має ширший антибактеріальний спектр, сильнішу дію на грампозитивні бактерії.

При дослідженнях шляхів синтезу цефепіму гідрохлориду зіткнулися з проблемою ізомерії в 2,3 положеннях при з'єднанні трьох бічних ланцюгів. Вивчено механізм ізомерії: *n*-метилпіролідін (NMP) має нуклеофільність та лужність. Завдяки цьому *N*-метилпіролідін здатен приймати участь у реакції з отриманням продукту. *N*-метилпіролідін може каталізувати ядро цефалоспоринової частини для утворення ізомерії в 2,3 положеннях.

Основні підходи до синтезу:

Мета – це забезпечення методу синтезу цефепіму гідрохлориду з використанням властивості низької розчинності сполук у формі внутрішньої солі в різних розчинниках. Метод контролює утворення ізомеру $\Delta 2$.

Використання GCLE як сировини, синтез цефепіму гідрохлориду за наступними етапами реакції:

- за умови низької температури в органічному розчиннику А, відщеплення захисної групи в 4-позиції в GCLE кислотою; концентрування реакційного розчину; додавання органічного розчинника В до отриманого реакційного розчину для осадження продукту DGCLE;

- розчинення продукту в органічному розчиннику С, реакція з *N*-метилпіролідіном при низькій температурі; додавання нерозчинного в продукті органічного розчинника D до реакційного розчину для осадження продукту 3-NMP-DGCLE;

- розчинення продукту у воді, відщеплення 7-сайтової захисної групи проміжного продукту за допомогою іммобілізованої пеніцилін ацилази; додавання активованого вугілля, іммобілізована пеніцилін ацилаза для знебарвлення; додавання кислоти та органічного розчинника Е до фільтрату після фільтрування активованого вугілля, для осадження продукту 7-АСР;

- розчинення 7-АСР в органічному розчиннику F, проведення реакції ацилювання в положенні 7 з АЕ-активним естером під дією основи; виливання реакційного розчину у воду, екстракція реакційного розчину розчинником G для отримання реакційного розчину; додавання кислоти до отриманої водної фази для осадження кристалів; додавання органічного розчинника H для полегшення відділення кристалів, отримання продукту цефепіму гідрохлориду (рис. 2.1.1).

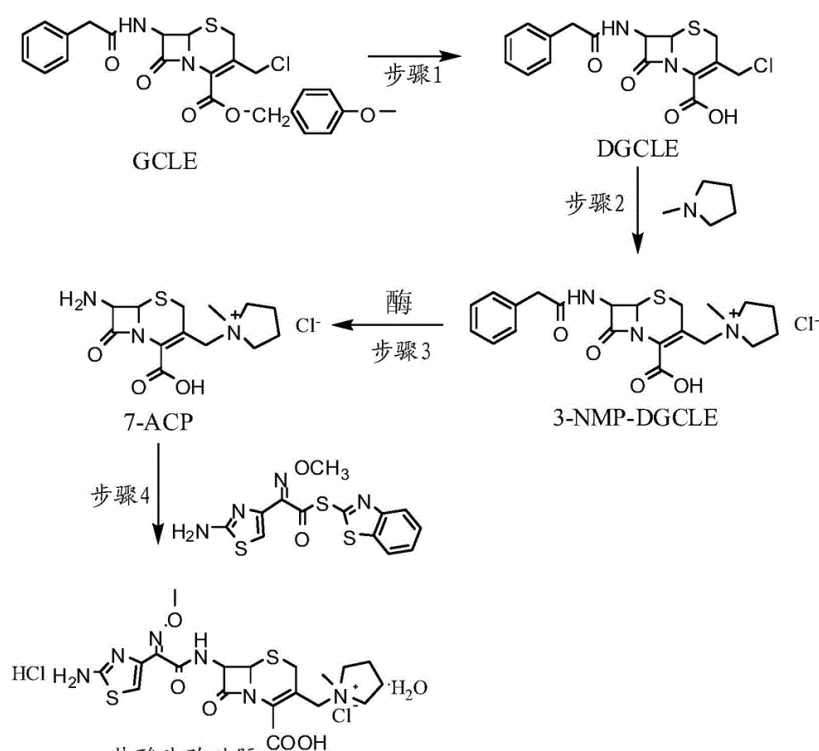


Рисунок 2.1.1.Етапи синтезу.

Винахід використовує GCLE як сировину та синтезує цефепіму гідрохлорид:

- за умов низької температури, в органічному розчиннику (галогенований вуглеводень, дихлорметан, хлороформ, чотирихлористий вуглець; ефір, етилацетат, бутилацетат;
- полярний розчинник DMF, DMSO, відщеплення захисної групи в положенні 4 в GCLE за допомогою кислоти (органічна кислота, мурашина кислота, оцтова кислота, трифтороцтова кислота); молярне співвідношення кислоти до GCLE 6,5-7,5:1; температура реакції від -30 до -20 °C, а час реакції від 18 до 20 годин; після завершення реакції концентрування розчину; додавання нерозчинного в продукті органічного розчинника (ефіру, діетиловий ефір, ізопропіловий ефір, петролейний ефір; н-гексан, циклогексан) до отриманого розчину для осадження продукту DGCLE;
- розчинення продукту в органічному розчиннику,
- масова концентрація ферменту 4-6%), температура реакції в процесі реакції 27-29 °C; значення рН 7,9-8,1; час реакції 2-3 години; додавання активованого вугілля до фільтрату іммобілізованої пеніцилін ацилази, для знебарвлення;
- додавання кислоти та органічного розчинника (метанол, етанол, ізопропанол, ацетон, бутанон) до фільтрату після фільтрування активованого вугілля, для осадження продукту 7-АСР;
- температура реакції 27-29 °C, час реакції - 2-3 години; виливання реакційного розчину у воду, екстракція органічним розчинником (ефір, діетиловий ефір, ізопропіловий ефір, петролейний ефір), алканом, н-гексан, циклогексан, галогенованим вуглеводнем, дихлорметан, хлороформ, чотирихлористий вуглець, естером - етилацетат, бутилацетат);

- додавання кислоти до отриманої водної фази для осадження кристалів;
додавання органічного розчинника (метанолу, етанолу, ізопропанолу;
ацетону, бутанону та кетонів) для відділення кристалів,
- отримання продукту цефепіму гідрохлориду (рис.2.1.2).

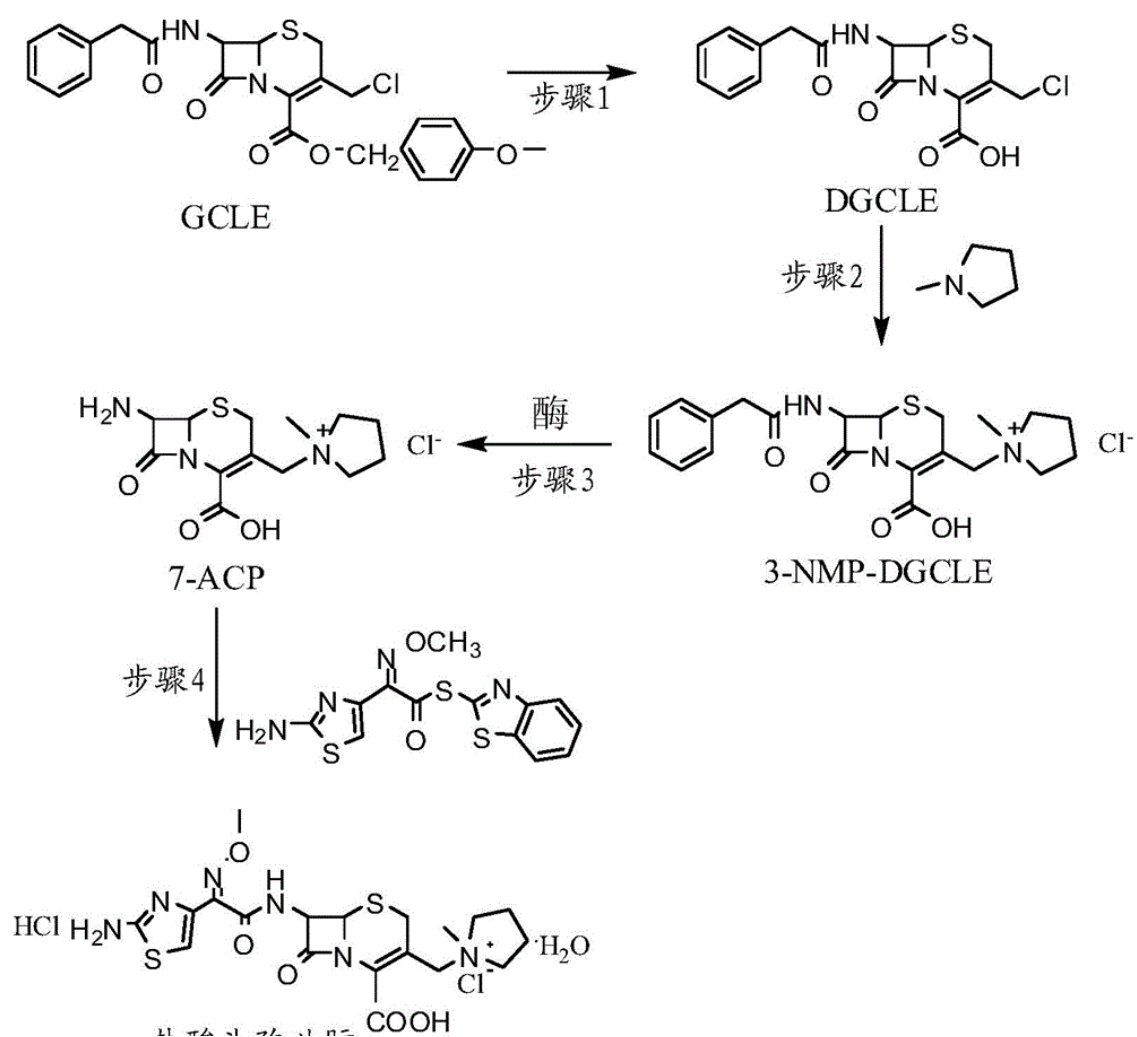


Рисунок 2.1.2.Етапи синтезу.

Цефепім синтезований з GCLE шляхом нуклеофільного заміщення в положенні С-3, однофазного розщеплення захисних груп С-7 та С-2, конденсації в положенні С-7.

Отримано продукт хорошої якості із виходом 36%. Метод був простим, швидким, легким для промислового масштабування.

Прості метало-цефепімові комплекси отримані шляхом змішування молярної кількості солей металів, розчинених у воді, з розрахованою кількістю цефепіму. Гетероцефепімові металокомплекси Fe(III)M(II) , де $[\text{M(II)}]$ подвійний зв'язок Ni(II) та Cu(II) отримані шляхом розчинення 1 ммоль Fe(III) та 1 ммоль хлориду Ni(II) або Cu(II) у 10 мл. Отриманий розчин додавали до цефепіму. Суміш кип'ятили зі зворотним холодильником.



Комплекс H_2O мав три смуги при 277, 361 та 504 нм, зумовлені переходами $4\text{A}_{2g} \rightarrow 4\text{T}_{2g}(\text{F})$, $4\text{A}_{2g} \rightarrow 4\text{T}_{1g}(\text{F})$ та $4\text{A}_{2g} \rightarrow 4\text{T}_{1g}(\text{p})$ відповідно з октаедричною геометрією у високоспіновому стані з гібридизацією d^2sp^3 ($\mu_{\text{eff}} = 3,87 \text{ В.М}$) [14].

УФ-видимий спектр комплексу $[\text{Mn}_2(\text{Цефепім})_3(\text{ОН})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ОН})_3$ має три максимуми поглинання при 327, 419 та 504 нм, де перша смуга відповідає переходу $6\text{A}_{1g} \rightarrow 4\text{A}_{1g}$, а друга - переходу $6\text{A}_{1g} \rightarrow 4\text{T}_{2g}$.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанцій Цефепім і Сульбактам. Цефепім і Сульбактам можна проаналізувати за монографіями 07/2011:2126 та 01/2017:2209 Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29) [27, 28].

07/2011:2126 виправлено 10.0. Моногідрат цефепіму дигідрохлориду.

Споріднені речовини. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробуваний розчин. 70,0 мг речовини в рухомій фазі А, доводять об'єм рухомою фазою А до 50,0 мл. Обробляють ультразвуком.

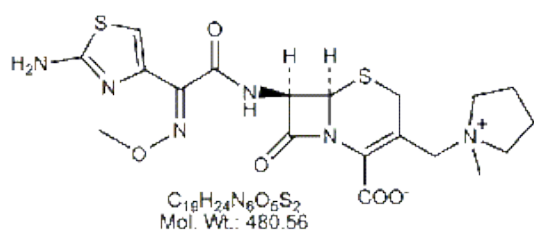
Розчин порівняння (а). 70,0 мг моногідрату цефепіму дигідрохлориду CRS у рухомій фазі А, доводять об'єм рухомою фазою А до 50,0 мл. Обробляють ультразвуком.

Розчин порівняння (b). Розводять 1,0 мл досліджуваного розчину рухомою фазою А. Розводять 2,0 мл розчину до 100,0 мл рухомою фазою А.

Розчин порівняння (с). 7 мг моногідрату цефепіму дигідрохлориду для перевірки придатності системи CRS (містить домішки А, В та F) у рухомій фазі А, доведіть об'єм 5 мл рухомою фазою А.

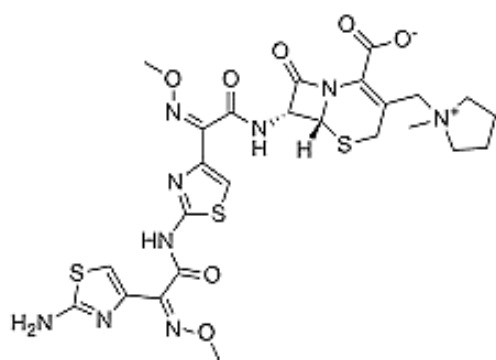
Розчин порівняння (d). 2 мг CRS домішки цефепіму Е у рухомій фазі А. Швидкість потоку: 1 мл/хв. Виявлення: спектрофотометр при 254 нм.

Специфіковані домішки: А, В, Е, F, G. Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): С, D.



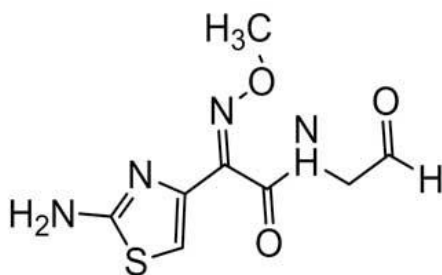
Домішка А

(6R,7R)-7-[[[(2E)-(2-амінотіазол-4-іл)(метоксиіміно)ацетил]аміно]-3-[(1-метилпіролідінію)метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-єн-2-карбоксилат (антицефепім)



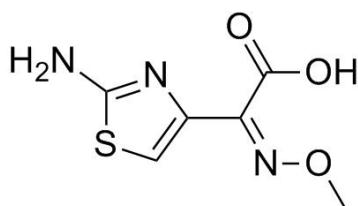
Домішка В

(6R,7R)-7-[[[(2Z)-[2-[[[(2Z)-(2-амінотіазол-4-іл)(метоксиіміно)ацетил]аміно]тіазол-4-іл](метоксиіміно)ацетил]аміно]-3-[(1-метилпіролідінію)метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-єн-2-карбоксилат



Домішка С

(2Z)-2-(2-амінотіазол-4-іл)-N-(формілметил)-2-(метоксиіміно)ацетамід



Домішка D

(2Z)-2-(2-амінотіазол-4-іл)(метоксиіміно)оцтова кислота, Е.
(6R,7R)-7-аміно-3-[(1-метилпіролідінію)метил]-8-оксо-5-

**тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-
карбоксилат**

Домішка F

(6R,7R)-7-[[[(6R,7R)-7-[(2Z)-(2-амінотіазол-4-іл)-
(метоксиіміно)ацетил]аміно]-3-[(1-метилпіролідиніо)метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-іл]карбоніл]аміно]-3-[(1-метилпіролідиніо)метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат, G. 1-метилпіролідин (N-метилпіролідин)

01/2017:2209 виправлено 10.0 Сульбактам натрію.

Споріднені речовини. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробуваний розчин. 0,200 г досліджуваної речовини у рухомій фазі, доводять рухомою фазою до 10,0 мл.

Розчин порівняння (а). 5 мг CRS сульфацетаміду натрію та 5 мг сульфаніламід R (домішка А) у 1,0 мл рухомої фази.

Розчин порівняння (b). Розводять 1,0 мл розчину до 100,0 мл рухомою фазою. Розводять 1,0 мл розчину до 10,0 мл рухомою фазою.

Визначені домішки: А.

Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): В, С, D.

А. 4-амінобензолсульфонамід (сульфаніламід),

В. N-(4-сульфамойлфеніл)ацетамід,

С. N-[[4-(ацетиламіно)феніл]сульфоніл]ацетамід,

D. 4,4'-сульфонілдіанілін (дапсон).

Нами виконано хроматографічне дослідження методом ВЕРХ для ідентифікації у досліджуваній двохкомпонентної суміші субстанцій Цефепіму і Сульбактаму, визначення їх чистоти та кількісного вмісту з використанням базових умов хроматографування і методик дослідження, які описано в Європейській Фармакопеї для дослідження методом РХ.

Матеріали та методи.

Хроматограф Agilent 1200 з DAD детектором.

Умови хроматографування:

- колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x5 (або аналогічна);
- час хроматографування 12 хв
- потік – 1,0 мл/хв
- детектування – УФ при 230 нм
- об'єм інжекції – 10 мкл
- температура колонки – 25°C

Буферний розчин А – розчиняють 1,39 г тетрабутиламонію хлориду в 1000 мл води, доводять рН до $7,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти

Буферний розчин В – ацетонітрил

Рухома фаза: буфер А/буфер В у співвідношенні 82,5/17,5.

Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією цефепіму та сульбактаму 5 мкг/мл в рухомій фазі.

У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ цефепіму та сульбактаму з концентрацією 5 мкг/мл в рухомій фазі.

Придатність хроматографічної системи. Хроматографічна система вважається придатною тоді, якщо виконуються наступні умови:

- розділення між піком цефепіму та сульбактаму має бути не менше 2,0;

- ефективність хроматографічної колонки для цефепіму та сульбактаму повинна бути не менше 2000 теоретичних тарілок
- коефіцієнт симетрії цефепіму та сульбактаму (тейлінг) не має бути більшим 2,0;
- відносне стандартне відхилення площі піків цефепіму та сульбактаму після 5 послідовних введень стандартного розчину має становити не більше 2,0%;

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для проведення досліджень методом ВЕРХ використовували реактиви: тетрабутиламонію хлориду (чистоти для ВЕРХ), ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ), ортофосфорна кислота (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати.

На рисунках 3.1, 3.2 представлено отримані хроматограми.

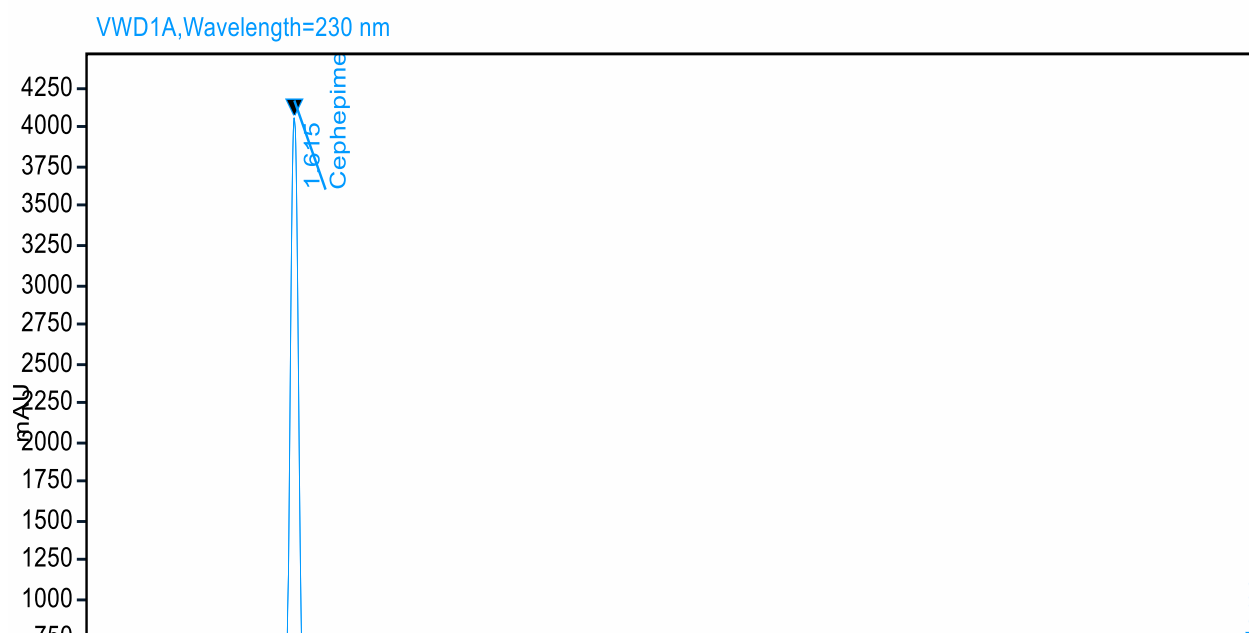


Рисунок 3.1. Хроматограма розчину стандартного зразку ДФУ.

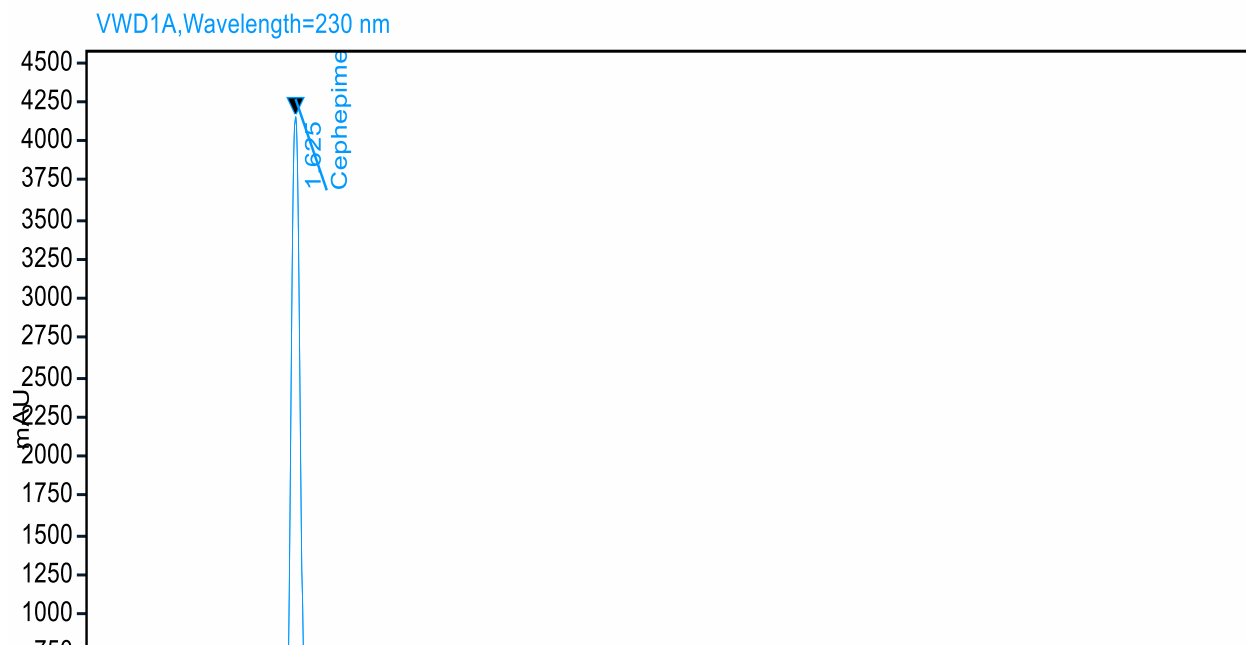


Рисунок 3.2. Хроматограма розчину випробовуваного зразку суміші субстанцій *цефепіму* $R_t=1.625$ хв та *сульбактаму* $R_t=9.102$ хв.

Отримані результати представлено в таблицях 3.1, 3.2:

Стандарт									
	<i>Цефепім</i>				<i>Сульбактам</i>				R
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> (≤ 2.0)	<i>N</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> (≤ 2.0)	<i>N</i>	
	1,615	18975,751	1,1	2661	8,965	1287,507	1,5	7488	27,3
	1,615	18944,282	1,1	2674	8,974	1286,340	1,4	7546	27,4
	1,618	18983,414	1,1	2633	9,033	1288,275	1,5	7481	27,4
	1,620	19074,882	1,1	2655	9,063	1288,319	1,5	7509	27,4
	1,620	18979,638	1,1	2635	9,068	1288,756	1,5	7445	27,3
Середнє	1,618	18991,593	1,1	2652	9,021	1287,839	1,5	7494	27,4
SD	0,003	49,082			0,049	0,951			
RSD($\leq 2\%$)	0,16%	0,26%			0,54%	0,07%			
	Зразок								

	<i>Цефепім</i>		<i>Сульбактам</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	1,625	20486,142	9,102	1329,157
	1,623	20512,189	9,054	1332,276
	1,623	20458,231	9,076	1332,617
Середнє	1,624	20485,521	9,077	1331,350

В таблицях:

T- тейлінг (форма піку, часто буває менше 2),

N – кількість теоретичних тарілок (чим більше теоретичних тарілок, тим вища ефективність розділення компонентів у колонці),

RSD - відносне стандартне відхилення, згідно Фармакопеї, має бути менше 2),

SD –стандартне відхилення, використовується для визначення RSD)

Розрахунок вмісту цефепіму:

$$C_c(\%) = \frac{A_{test} \times m_{st}}{A_{st} \times m_{test}} \times R(\%)$$

де:

- A_{test} – площа піку цефепіму на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку цефепіму у на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- m_{st} – наважка стандарту, мг
- m_{test} – наважка тесту, мг
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку цефепіму, (99,2)%

$$C_c(\%) = 100,56\%$$

За Євр. Фарм. 97-102%

Розрахунок вмісту **сульбактаму**:

$$C_s (\%) = \frac{A_{test} \times m_{st}}{A_{st} \times m_{test}} \times R(\%)$$

де:

- A_{test} – площа піку сульбактаму на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку сульбактаму на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- m_{st} – наважка стандарту, мг
- m_{test} – наважка тесту, мг
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку сульбактаму, (99,46)%

$$C_s (\%) = 101,32\%$$

За Євр. Фарм. 99-101%

В результаті проведених досліджень встановлено, що в наданій на дослідження субстанції ідентифіковано *цефепім та сульбактам*, суміш не містить домішок, а вміст цефепіму відповідає регламентованому кількісному вмісту, а вміст сульбактаму перевищує регламентований вміст. Не виявлено продуктів хімічної деградації, а умови хроматографування суміші субстанцій методом ВЕРХ адаптовано для практичного використання у фармацевтичний аналіз.

Цефепім гідрохлорид моногідрат (Eur.Ph.) Метод РХ	Цефепім, субстанція + сульбактам, субстанція Метод ВЕРХ
Рідинна хроматографія (2.2.29). <i>Рухома фаза:</i> 1 V ацетонітрилу – 100 V 0.01 М нітратної кислоти <i>Випробуваний розчин.</i> 70,0 мг речовини в рухомій фазі А <i>Розчин порівняння (a), Розчин порівняння (b), Розчин порівняння (c), Розчин порівняння (d) – розчинення досліджуваних речовин у рухомій фазі</i>	<i>Рухома фаза:</i> буфер А/буфер В у співвідношенні 82,5/17,5. <i>Буферний розчин А – розчиняють 1,39 г тетрабутиламонію хлориду в 1000 мл води, доводять рН до 7,0±0,05 за допомогою фосфорної кислоти</i> <i>Буферний розчин В – ацетонітрил</i> Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією цефепіму та сульбактаму 5 мкг/мл в рухомій фазі. У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ цефепіму та сульбактаму з концентрацією 5 мкг/мл в рухомій фазі.
Специфіковані домішки: А, В, Е, F, G. Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): C, D.	Не виявлено
Кількісний вміст За Євр. Фарм. 97-102%	Кількісний вміст - 100,56%

Детектування – 254 нм	Детектування – 230 нм
Сульбактам натрію	Сульбактам у суміші двохкомпонентної
<i>Рухома фаза:</i> – фаза А: 5.44 g/L розчин калію дигідрофосфату, рН 4.0 – фосфорна кислота; – фаза В: фаза А, ацетонітрил R1 (40:60 V/V)	<i>Рухома фаза:</i> буфер А/буфер В у співвідношенні 82,5/17,5. <i>Буферний розчин А</i> – розчиняють 1,39 г тетрабутиламонію хлориду в 1000 мл води, доводять рН до 7,0±0,05 за допомогою фосфорної кислоти <i>Буферний розчин В</i> – ацетонітрил
Детектування – 215 нм	Детектування – 230 нм
Кількісний вміст <i>За Євр. Фарм. 99-101%</i>	Кількісний вміст - 101,32%

ВИСНОВКИ

1. Впроваджено метод ВЕРХ у аналіз АФІ Цефепім та Сульбактам у складі двохкомпонентної суміші субстанцій, ідентифіковано АФІ та визначено їх кількісний вміст: вміст цефепіму відповідає регламентованому кількісному вмісту 100,56%, а вміст сульбактаму перевищує регламентований вміст 101,32%.
2. Визначено чистоту досліджуваної двохкомпонентної суміші субстанцій Цефепім та Сульбактам хроматографічним методом (ВЕРХ): суміш не містить супровідних речовин та продуктів розпаду.
3. Адаптовано методики дослідження та розроблено хроматографічні умови дослідження, які дозволяють захистити структуру молекул речовин від хімічної деградації, а саме, запропоновано наступний склад:
Рухома фаза: буфер А/буфер В у співвідношенні 82,5/17,5, *Буферний розчин А* – розчиняють 1,39 г тетрабутиламонію хлориду в 1000 мл води, доводять рН до $7,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти, *Буферний розчин В* – ацетонітрил. Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією цефепіму та сульбактаму 5 мкг/мл в рухомій фазі. У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ цефепіму та сульбактаму з концентрацією 5 мкг/мл в рухомій фазі; детектування – 230 нм.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*, 404 (10459) (2024), pp. 1199-1226, 10.1016/S0140-6736(24)01867-1.
2. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240093461>.
3. F. Cosentino, P. Viale, M. Giannella. MDR/XDR/PDR or DTR? Which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? *Curr Opin Infect Dis*, 36 (6) (2023), pp. 564-571.
4. D. Yahav, C.G. Giske, A. Grāmatniece, H. Abodakpi, V.H. Tam, L. Leibovici. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Rev*, 34 (1) (2020), pp. e00115-e00120.
5. A.J. Lepak, M. Zhao, D.R. Andes. WCK 5222 (Cefepime-Zidebactam) pharmacodynamic target analysis against metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the neutropenic mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother*, 63 (12) (2019).
6. P.K. Tirlangi, B.S. Wanve, R.R. Dubbudu, B.S. Yadav, L.S. Kumar, A. Gupta, *et al.* Successful use of Cefepime-Zidebactam (WCK 5222) as a salvage therapy for the treatment of disseminated extensively drug-resistant New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in an adult patient with acute T-cell leukemia. *Antimicrob Agents Chemother*, 67 (8) (2023), Article e0050023

7. R. Soman, R. Sirsat, A. Sunavala, N. Punatar, J. Mehta, C. Rodrigues, B. Veraraghavan. Successful treatment of sino-pulmonary infection & skull base osteomyelitis caused by New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a renal transplant recipient by using an investigational antibiotic cefepime/zidebactam (WCK 5222). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2024), 10.1007/s10096-024-04791-1
8. D. Dubey, M. Roy, T.H. Shah, N. Bano, V. Kulshrestha, S. Mitra, *et al.* Compassionate use of a novel β -lactam enhancer-based investigational antibiotic cefepime/zidebactam (WCK 5222) for the treatment of extensively-drug-resistant NDM-expressing *Pseudomonas aeruginosa* infection in an intra-abdominal infection-induced sepsis patient: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 22 (1) (2023), p. 55.
9. A. Sebastian, S. Naik, M. Varma, N.C. Sreekumar, J. Thomas, T. Rao, *et al.* Difficult to treat *Pseudomonas*: successful salvage therapy with cefepime-zidebactam. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 118 (9) (2024), pp. 632-634, 10.1093/trstmh/trae049
10. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (34th ed), Clinical and Laboratory Standards Institute, USA (2024)
11. P.D. Tamma, S.L. Aitken, R.A. Bonomo, A.J. Mathers, D. van Duin, C.J. Clancy. Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacterales (ESBL-E), carbapenem-resistant enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin Infect Dis*, 72 (7) (2021), pp. e169-e183, 10.1093/cid/ciaa1478
12. Y.L. Lee, W.C. Ko, P.R. Hsueh. Geographic patterns of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia-Pacific Region: results from the

- Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) Program, 2015–2019. *Antimicrob Agents Chemother*, 66 (2) (2022), pp. e02000-e02021 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02000-21>
- 13.S. Karakostas, M. Rousaki, E.I. Kritsotakis. Cefiderocol: systematic review of mechanisms of resistance, heteroresistance and In vivo emergence of resistance. *Antibiotics*, 11 (6) (2022), p. 723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9220290/>
 - 14.Wockhardt Ltd; A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability and pharmacokinetics of multiple escalating doses of intravenous zidebactam in healthy adult Human subjects; ClinicalTrials.gov identifier: NCT02674347; Updated : 2016; Accessed 02.10.24: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02674347?term=NCT02674347&rank=1>.
 - 15.Wockhardt Ltd; A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability and pharmacokinetics of multiple escalating doses of intravenous WCK 5222 (Zidebactam and Cefepime) in Healthy adult human subjects; clinicaltrials.gov identifier: NCT02707107; 2016; Accessed 02.10.24 <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02707107?term=NCT02707107&rank=1>.
 - 16.Wockhardt Ltd; A randomized, double-blind, double-dummy, placebo- and positive-controlled, crossover study to evaluate the effect of WCK 5222 on the QT/QTc interval in healthy volunteers; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03554304; 2018; Accessed 02.10.24: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03554304?term=NCT03554304&rank=1>.
 - 17.Wockhardt Ltd; A phase 1, open-label, single-dose study to investigate the pharmacokinetics of intravenous WCK 5222 (FEP-ZID) in patients with renal

- impairment; ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02942810; 2018; Accessed 02.10.24; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02942810?intr=FEP-ZID&rank=3>.
18. Wockhardt Ltd; A phase 3, randomized, double-blind, multicenter, comparative study to determine the efficacy and safety of Cefepime-zidebactam vs. Meropenem in the treatment of complicated urinary tract infection or acute pyelonephritis in adults; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04979806; 2024; Accessed 02.10.24 <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04979806?term=NCT04979806&rank=1>.
19. S Palwe, P Joshi, H Periasamy and S Bhagwat; Biofilm eradication activity of Zidebactam/Cefepime (WCK 5222, ZAYNICH), Assessed against Multi-Drug Resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) Biofilms; CIDSCON (Conference of Clinical Infectious Diseases Society), August 15th to 18th 2024, Hyderabad, India.
20. Vahabi-Amlashi, S.; Layegh, P.; Kiafar, B.; Hoseininezhad, M.; Abbaspour, M.; Khaniki, S.H.; Forouzanfar, M.; Sabeti, V. A randomized clinical trial on therapeutic effects of 0.25 mg oral minoxidil tablets on treatment of female pattern hair loss. *Dermatol. Ther.* 2021, 34, e15131.
21. Penha, M.A.; Miot, H.A.; Kasprzak, M.; Muller Ramos, P. Oral Minoxidil vs Topical Minoxidil for Male Androgenetic Alopecia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 2024, 160, 600–605.
22. An, S.; Zheng, M.; Park, I.G.; Noh, M.; Sung, J.H. Differential expression of androgen receptor and 5-alpha reductase isoforms in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 2024, 317, 138.

- 23.Diviccaro, S.; Melcangi, R.C.; Giatti, S. Post-finasteride syndrome: An emerging clinical problem. *Neurobiol. Stress.* 2020, 12, 100209.
- 24.Harel, S.; Higgins, C.A.; Cerise, J.E.; Dai, Z.; Chen, J.C.; Clynes, R.; Christiano, A.M. Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth. *Sci. Adv.* 2015, 1, e1500973.
- 25.Piliang, M.; Soung, J.; King, B.; Shapiro, J.; Rudnicka, L.; Farrant, P.; Magnolo, N.; Piraccini, B.M.; Luo, X.; Wolk, R.; et al. Efficacy and safety of the oral Janus kinase 3/tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma family kinase inhibitor ritlecitinib over 24 months: Integrated analysis of the ALLEGRO phase IIb/III and long-term phase III clinical studies in alopecia areata. *Br. J. Dermatol.* 2025, 192, 215–227.
- 26.Zhu, H.; Jian, Z.; Zhong, Y.; Ye, Y.; Zhang, Y.; Hu, X.; Pu, B.; Gu, L.; Xiong, X. Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *Front. Immunol.* 2021, 12, 714943.
- 27.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.
- 28.European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022. V.1I: 2237-2239. V. III: 4090-4092.

SUMMARY

Reipashii Oksana

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF CEFEPIME AND SULBACTAM IN TWO-COMPONENT SUBSTANCE BY HPLC METHOD

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: professor, doctor of pharm. sciences Welchinska O.V.

Keywords: Cefepime, Sulbactam, Two-Component Substance, medicinal product, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Cefepime is an antimicrobial agent for systemic use. The drug is a β -lactam antibiotic. The drug inhibits the synthesis of bacterial cell wall enzymes, has a broad spectrum of activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Cefepime is highly resistant to hydrolysis by most β -lactamases. Cefepime and sulbactam as APIs are part of some drugs - beta-lactam antibiotics of the cephalosporin group, for example Norfepime. The drug is used in monotherapy and in combination therapy.

Materials and methods. Objects of research are substance of Cefepime, Sulbactam and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of the substance of Cefepime and Sulbactam. Methods: HPLC & UV-spectrum (Agilent 1200 with a diode-matrix detector, column – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x5 (or similar), - - chromatography time 12 min, - flow – 1.0 ml/min, - detection – UV at 230 nm, - injection volume – 10 μ l/ - column temperature – 25°C; OpenLab CDS program.

Results. The HPLC method was introduced into the analysis of APIs Cefepime and Sulbactam in a two-component mixture of substances, the APIs were identified and their quantitative content was determined: the cefepime content corresponds to the regulated quantitative content of 100.56%, and the sulbactam content exceeds the regulated content of 101.32%.

Conclusions. The purity of the investigated two-component mixture of substances Cefepime and Sulbactam was determined by chromatographic method (HPLC): the mixture does not contain accompanying substances and decomposition products. The research methods were adapted and chromatographic research conditions were developed, which allow protecting the structure of the molecules of the substances from chemical degradation

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор

В. о. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор



Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК