

Streszczenie

Wiele substancji czynnych (*ang.* active pharmaceutical ingredient – API) wprowadzanych do lecznictwa charakteryzuje się nie w pełni korzystnymi własnościami fizykochemicznymi. Dla niektórych nowo syntetyzowanych API problem jest na tyle poważny, że wiele z nich nie zostało zarejestrowanych. Dodatkowo, wysokie koszty i długi czas opracowywania nowych API, a także ryzyko niepowodzenia w badaniach klinicznych powodują, że wiele uwagi poświęca się ulepszaniu już zatwierdzonych API poprzez tworzenie nowych form leku o poprawionych właściwościach fizykochemicznych. Jednym z wielu możliwych podejść do rozwiązania tego problemu jest otrzymywanie kompleksów API z cyklodekstrynami (CD).

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest opracowanie nowego systemu dostarczania leku dla modelowej substancji, która jest słabo rozpuszczalna w wodzie, amfoteryczna i stabilna w środowisku o odczynie kwasowym. Podstawę rozprawy stanowi cykl czterech spójnych tematycznie publikacji.

Pierwszy etap badań obejmował przegląd literatury naukowej (Publikacja 1) omawiający otrzymywanie kompleksów CD z antybiotykami i chemioterapeutykami przeciwbakteryjnymi, należącymi do różnych grup terapeutycznych. Dokonano przeglądu ponad 200 artykułów naukowych i patentów opublikowanych do końca 2021 r. Skoncentrowano się na omówieniu korzyści, które uzyskano w wyniku utworzenia kompleksów inkluzyjnych badanych związków z CD, takich jak: poprawa rozpuszczalności, modyfikacja profilu uwalniania leku, spowolnienie degradacji API, poprawa przenikalności przez błony biologiczne czy zwiększenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Na tym etapie dokonano również wyboru związku modelowego, dla którego nie znaleziono w literaturze naukowej żadnej próby poprawy jego właściwości fizykochemicznych. Jako przedmiot dalszych badań wskazano ceftobiprol, który jest antybiotykiem półsyntetycznym należącym do grupy cefalosporyn V generacji, charakteryzującym się zadowalającą aktywnością przeciwdrobnoustrojową, ale niekorzystnymi parametrami fizykochemicznymi. Z uwagi na słabą rozpuszczalność w wodzie ceftobiprołu (ok. 0,05 mg/ml), komercyjnie dostępny produkt leczniczy Zevtera został zatwierdzony w postaci proleku z przyłączoną grupą medokarylową. W niniejszej rozprawie zaproponowano alternatywne podejście do poprawy rozpuszczalności ceftobiprołu, polegające na opracowaniu nowego systemu dostarczania leku w postaci kompleksu aktywnej formy ceftobiprołu z CD.

Badania eksperymentalne rozpoczęto od opracowania selektywnej metody analitycznej przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, pozwalającej na rozdzielenie ceftobiprołu od jego substancji pokrewnych oraz szacowanie zawartości jego produktów degradacji i produktów ubocznych syntezy (Publikacja 2). Warunki chromatograficznego rozdzielania optymalizowano, korzystając z roztworów poddanych warunkom stresowym w celu utworzenia prawdopodobnych produktów degradacji, które powstają w trakcie deklarowanego okresu przechowywania leku. Produkty degradacji zostały wygenerowane w reakcjach hydrolizy kwasowej i zasadowej, jak również utleniania, fotolizy i termolizy. Wykonane badania kinetyczne wykazały niską stabilność ceftobiprołu w roztworach alkalicznych, w obecności utleniacza i podczas napromieniowania próbek z użyciem bliskiego UV, a względnie wysoką stabilność w środowisku o odczynie kwasowym. Dzięki zastosowaniu tandemowej spektrometrii mas zaproponowano 13 nowych wzorów strukturalnych produktów ubocznych syntezy i produktów degradacji.

W Publikacji 3 przedstawiono wyniki obliczeń teoretycznych wykonanych przy użyciu techniki dokowania oraz dynamiki molekularnej dla kompleksów ceftobiprołu w trzech różnych stanach sprotonowania z trzema różnymi CD w dwóch przeciwnych orientacjach cząsteczki ceftobiprołu względem CD. Na podstawie 18 przeprowadzonych symulacji stwierdzono, że z termodynamicznego punktu widzenia najbardziej stabilny kompleks tworzy się między anionowym sulfobutyłowym eterem β -CD (SBE- β -CD) a kationowym, sprotonowanym ceftobiprolem w kwasowym środowisku o pH poniżej 3.

W ramach Publikacji 4 opisano wyniki rozwojowe dla nowych systemów dostarczania ceftobiprołu w postaci stałej, wytworzonych w wyniku liofilizacji z dodatkiem SBE- β -CD w obecności wybranych kwasów, różniących się mocą i stanem skupienia. Opracowaną i opisaną w Publikacji 2 metodę chromatograficzną wykorzystano do badania rozpuszczalności ceftobiprołu w otrzymywanych układach, ustalania profilu zanieczyszczeń oraz do weryfikacji stabilności chemicznej przygotowanych próbek podczas ich długoterminowego przechowywania. Do badania stabilności fizycznej oraz potwierdzenia otrzymania kompleksu z CD zastosowano również techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego, spektroskopii w podczerwieni oraz rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej. Optymalnym rozwiązaniem okazało się użycie kwasu maleinowego, który łączył wysoką poprawę rozpuszczalności ceftobiprołu (do 14 mg/ml dla układu ceftobiproł/kwas maleinowy/SBE- β -CD w stosunku molowym 1:25:4) z odpowiednią stabilnością fizykochemiczną. Po podniesieniu pH do ponad 4,5 przy użyciu wodorowęglanu sodu otrzymany system dostarczania ceftobiprołu w jego aktywnej postaci oferuje podobną rozpuszczalność i pH co komercyjnie dostępny preparat Zevtera, zawierający prolek ceftobiprołu w formie soli sodowej medokarylu.

Abstract

Many active pharmaceutical ingredients (APIs) introduced into medicine are characterized by less than optimal physicochemical properties. For some newly synthesized APIs, this problem is so serious that many of them remain unapproved. Furthermore, because of the high costs and long development time of new APIs, and the risk of failure in clinical trials, significant efforts are directed toward improving the properties of already approved APIs by designing new dosage forms with improved physicochemical properties. A possible approach to address this problem is the formation of API complexes with cyclodextrins (CDs).

The aim of this doctoral thesis is to develop a novel drug delivery system for a model substance that is poorly water-soluble, amphoteric, and stable in acidic environment. The thesis consists of four scientific articles that form a coherent thematic series.

The first step of the research was to make a review of the scientific literature (Article 1), discussing the preparation of CD complexes with antibiotics and antibacterial agents belonging to various therapeutic groups. Over 200 scientific articles and patents published by the end of 2021 were discussed. The review focused on benefits that were obtained as a result of inclusion complex formation between the tested compounds and CDs: improved solubility, modified drug release profile, slowed API degradation, improved permeability through biological membranes, and increased antimicrobial activity.

A model compound was then selected, for which no attempts to improve its physicochemical properties were found in the scientific literature. Namely, ceftobiprole was chosen as the subject of further study. It is a semi-synthetic antibiotic belonging to the fifth generation of cephalosporins, characterized with satisfactory antimicrobial activity but unfavorable physicochemical parameters. Due to the poor aqueous solubility of ceftobiprole (approximately 0.05 mg/mL), the commercially available drug product Zevtera was approved as a prodrug with an attached medocaril group. This thesis proposes an alternative approach to improving ceftobiprole solubility which relies on developing a new drug delivery system by complexing the active form of ceftobiprole with a CD.

Experimental research started with the development of a selective analytical method utilizing high performance liquid chromatography to separate ceftobiprole from its related substances and estimate the content of its degradation products and synthesis by-products (Article 2). To optimize the conditions of chromatographic separation, solutions of ceftobiprole were subjected to stress testing in order to generate the degradation products representative of those expected over the declared shelf life of the drug. Degradation products were formed by acidic and alkaline hydrolysis, as well as oxidation, photolysis, and

thermolysis. Kinetic studies demonstrated low stability of ceftobiprole in alkaline solutions, in the presence of an oxidizing agent, and as a result of near-UV sample irradiation, but relatively high stability in an acidic environment. Thanks to the use of tandem mass spectrometry, 13 new structural formulas for synthesis by-products and degradation products were proposed.

Article 3 presents the results of theoretical calculations performed using the docking technique and molecular dynamics for complexes of ceftobiprole in three different protonation states with three different CDs in two opposite orientations of the ceftobiprole molecule relative to the CD. Based on 18 simulations, it was found that from a thermodynamic point of view, the most stable complex is formed between anionic sulfobutyl ether β -CD (SBE- β -CD) and cationic, protonated ceftobiprole in an acidic environment at pH below 3.

Article 4 describes the development results for new solid-state ceftobiprole delivery systems, prepared by lyophilization with the addition of SBE- β -CD in the presence of selected acids varying in strength and state of matter. The chromatographic method developed and described in Article 2 was used to study the solubility of ceftobiprole in the resulting systems, determine the impurity profile, and verify the chemical stability of the prepared samples during long-term storage. Moreover, nuclear magnetic resonance spectroscopy, infrared spectroscopy, and X-ray powder diffraction were used to study the physical stability and to confirm the formation of the complex with CD. The optimal approach involved the use of maleic acid, which combined a significant improvement in ceftobiprole solubility (up to 14 mg/mL for a ceftobiprole/maleic acid/SBE- β -CD system at a molar ratio of 1:25:4) with adequate physicochemical stability. After raising the pH to above 4.5 with sodium hydrogencarbonate, the resulting delivery system for ceftobiprole in its active form offered similar solubility and pH to the commercially available Zevtera drug product, which contains the ceftobiprole in the form of medocaril sodium salt prodrug.