

Cyclodextrins allow the combination of incompatible vancomycin and ceftazidime into an ophthalmic formulation for the treatment of bacterial keratitis

Yassine Bouattour¹, Florent Neflot-Bissuel², Mounir Traïkia³, Anne-Sophie Biesse-Martin³, Robin Frederic⁴, Mouloud Yessaad², Mireille Jouannet², Mathieu Wasiak², Philip Chennell^{1*} and Valerie Sautou¹

¹ Université Clermont Auvergne, CHU Clermont Ferrand, Clermont Auvergne INP, CNRS, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ybouattour@chu-clermontferrand.fr; pchennell@chu-clermontferrand.fr; vsautou@chu-clermontferrand.fr

² CHU Clermont-Ferrand, Pôle Pharmacie, F-63000 Clermont-Ferrand, France; bissuelflorent@orange.fr; myessaad@chu-clermontferrand.fr; mjouannet@chu-clermontferrand.fr; mwasiak@chu-clermontferrand.fr

³ Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA-Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France. mounir.traikia@uca.fr; a-sophie.biesse-martin@uca.fr

⁴ Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, INRA USC2018, Clermont-Ferrand, France; frobin@chu-clermontferrand.fr

* Correspondence: pchennell@chu-clermontferrand.fr

1. Illustration of the pH dependant nature of the precipitation between ceftazidime and vancomycin

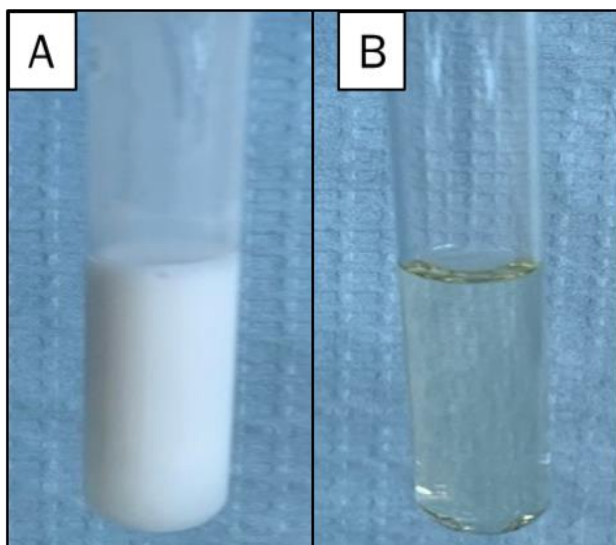


Figure 1. Mixture of 25 mg mL⁻¹ solution of ceftazidime and vancomycin at A) pH below 8.4 and B) pH higher than 8.4

2. Validation of ceftazidime and vancomycin quantification method

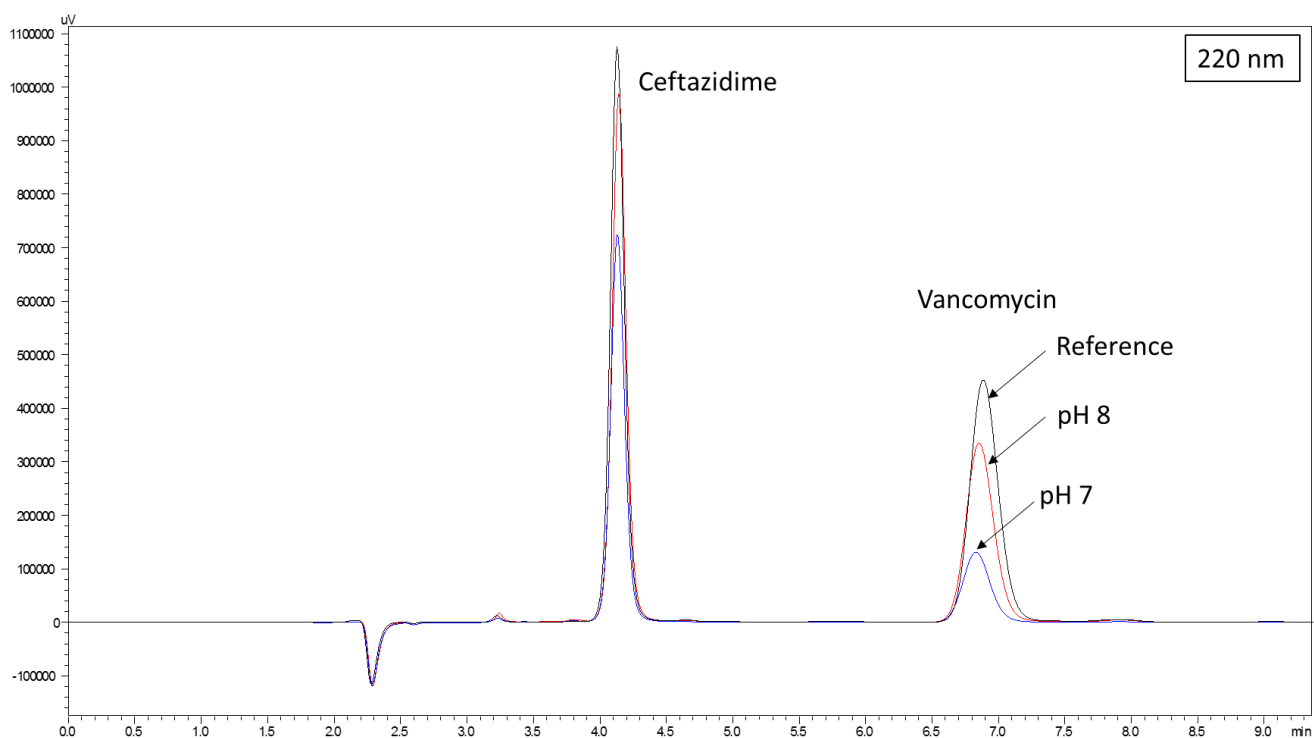


Figure 2: Chromatograms at 220 nm wavelength detection of mixture of ceftazidime and vancomycin at pH 7 and pH 8

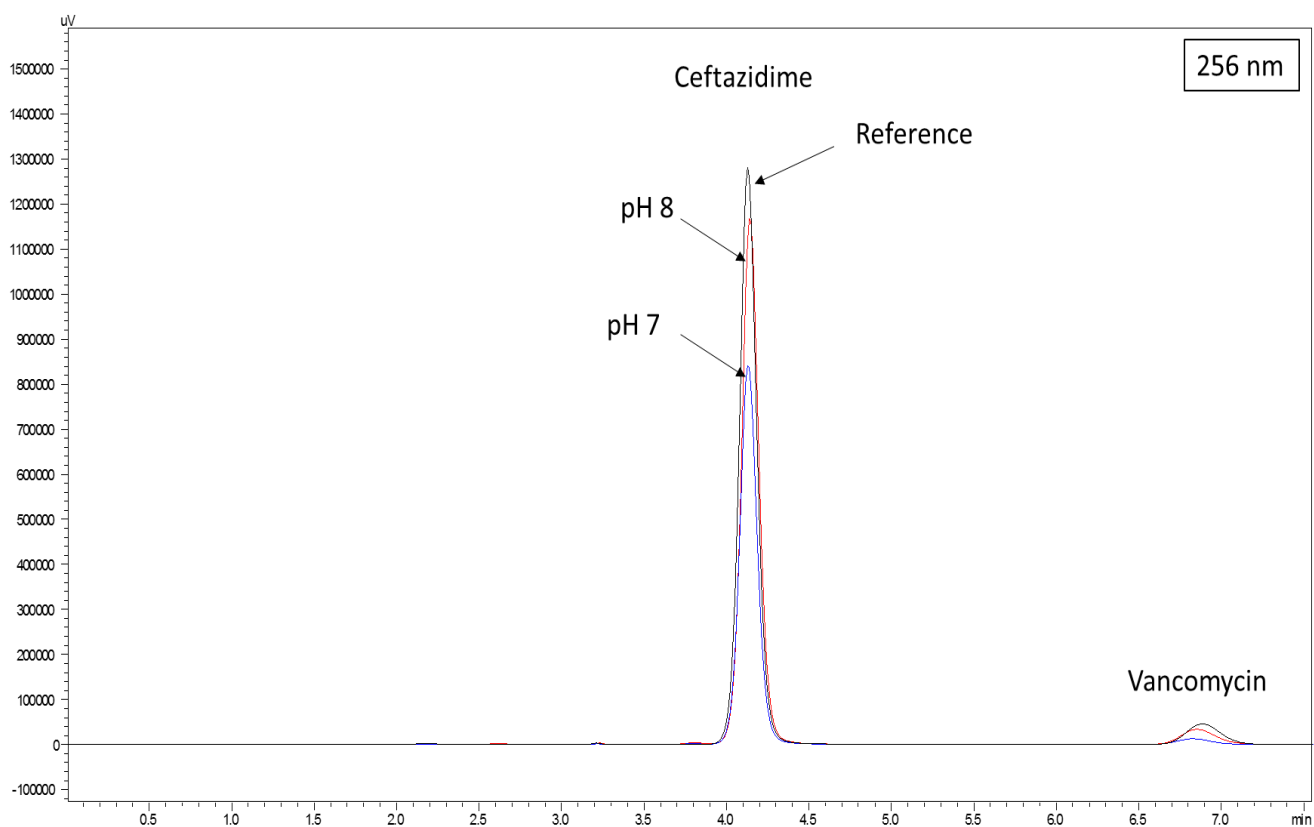


Figure 3 Chromatograms at 256 nm wavelength detection of mixture of ceftazidime and vancomycin at pH 7 and pH 8

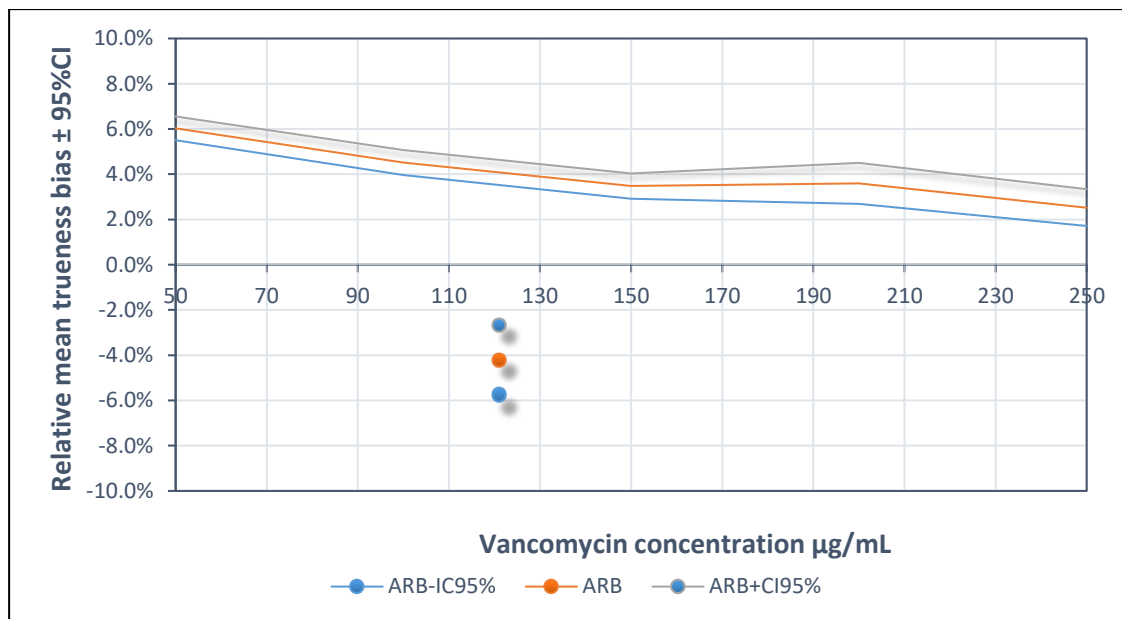


Figure 4 : Accuracy profile of Vancomycin validation. ARB: Average relative trueness bias. CI: confidence interval

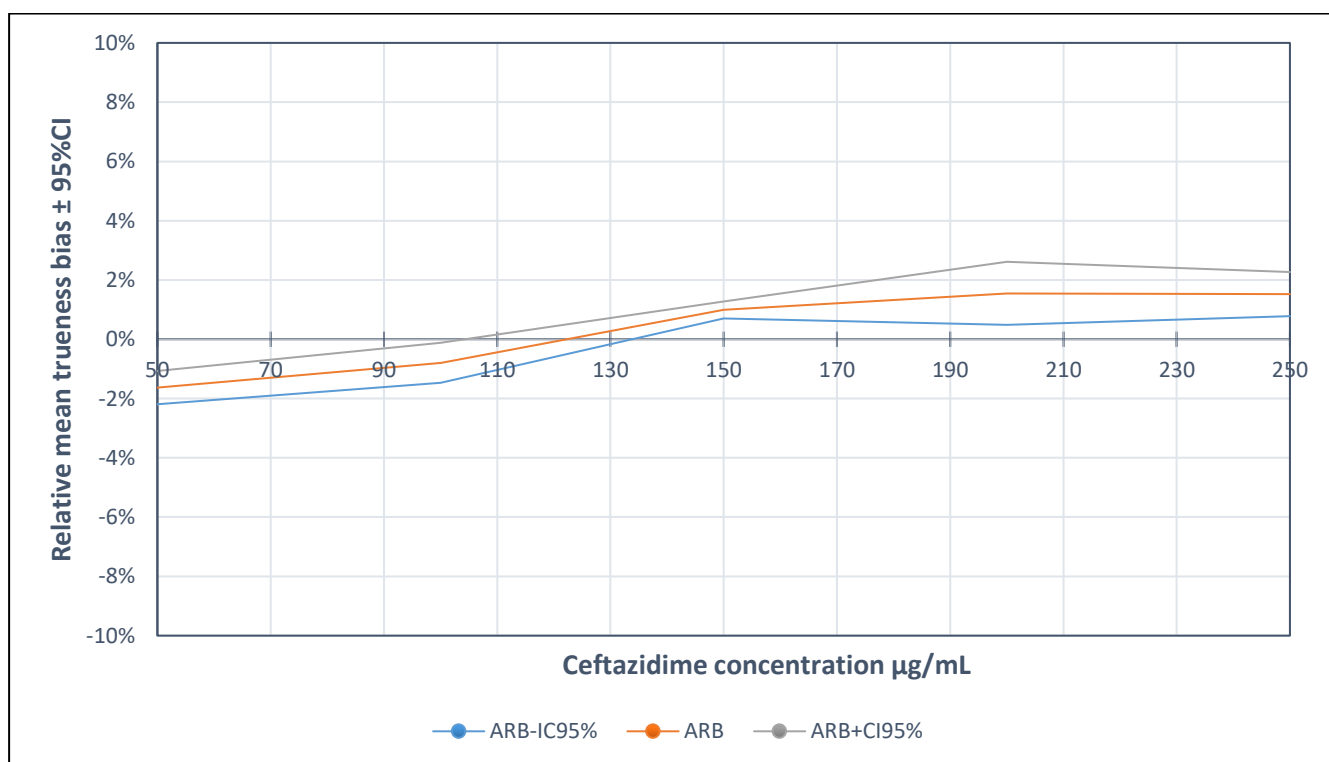


Figure 5 Accuracy profile of Ceftazidime validation. ARB: Average relative trueness bias. CI: confidence interval

3. Design of experiment

Table 1: Experimental design realized to calculate the impact of studied parameters on turbidity, particles count and osmolality. NA: Not applicable ; *: measurement error

Exp No	Parameters							Results					
	HP β CD ratio (compared to VA)	HP γ CD ratio (compared to CZ)	VA/ HP β CD pH mixture	CZ/ HP γ CD pH mixture	VA/ HP β CD mixture time	CZ/ HP γ CD mixture time	pH of the final solution	Visual examination	Turbidity (FNU)	Particules < 10 μ m	particle > 10 μ m	Osmolality (mOsmol/kg)	Final pH
1	0	0	6	4	0,5	0,5	7	9	1000	NA	NA	211	7
2	5	0	3	4	0,5	0,5	7	9	1000	NA	NA	366	7
3	0	3	4	8	0,5	0,5	7	9	1000	NA	NA	315	7
4	5	3	6	4	0,5	0,5	7	9	1000	NA	NA	633	7
5	5	0	6	8	2	0,5	7	9	1000	NA	NA	265	7
6	0	3	3	4	2	0,5	7	9	1000	NA	NA	399	7
7	5	3	3	8	2	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	518	7,5
8	5	0	6	8	0,5	2	7	9	1000	NA	NA	265	7
9	0	3	6	6	0,5	2	7	9	1000	NA	NA	327	7
10	5	3	3	4	0,5	2	7	8	1000	NA	NA	684	7
11	0	0	6	8	2	2	7	9	1000	NA	NA	154	7
12	5	0	6	4	2	2	7	9	1000	NA	NA	329	7
13	5	0	3	8	2	2	7	9	1000	NA	NA	269	7
14	5	3	6	8	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	558	7,5
15	0	0	3	8	1	2	7	9	1000	NA	NA	150	7
16	5	3	4	6	2	0,5	7,5	3	7,58	4521	953,16	563	7,5
17	2	3	3	8	0,5	2	7,5	9	1000	NA	NA	414	7,5
18	0	1	4	4	1	2	7,5	9	1000	NA	NA	277	7,5
19	0	1	3	8	0,5	1	7,5	9	1000	NA	NA	201	7,5
20	5	0	6	8	0,5	0,5	8,5	3	7,16	6421,33	790,01	300	8,5
21	0	3	3	4	0,5	0,5	8,5	3	6,92	2708,16	673,34	494	8,5
22	5	3	3	8	0,5	0,5	8,5	2	4,57	2509,16	614,67	575	8,5

23	0	0	6	4	2	0,5	8,5	3	7,21	7425,83	1729,17	281	8,5
24	0	0	3	8	2	0,5	8,5	3	4,22	5731,33	865,01	185	8,5
25	5	0	3	4	2	0,5	8,5	3	6,88	3740,5	494,66	403	8,5
26	5	3	4	4	2	0,5	7,5	4	17	6097	863,32	598	7,5
27	0	0	6	8	0,5	2	8,5	3	6,96	3160,33	655,33	182	8,5
28	5	0	6	4	0,5	2	8,5	3	3,09	2804,67	662,84	368	8,5
29	5	0	3	8	0,5	2	8,5	3	3,04	2592,84	358,33	288	8,5
30	5	3	6	8	0,5	2	7,5	9	1000	NA	NA	525	7,5
31	0	0	3	4	2	2	8,5	3	7	3662,16	933,49	260	8,5
32	5	0	6	8	2	2	8,5	3	4,6	2194,33	607,34	291	8,5
33	0	3	6	4	2	2	8,5	3	5,8	2765	604,16	476	8,5
34	0	3	3	8	2	2	8,5	3	6,4	5497,16	1065,66	344	8,5
35	5	3	3	4	2	2	8,5	2	5,88	3022	875,16	693	8,5
36	2	3	6	6	2	2	7,5	3	8,74	9006,17	1630,66	656	7,5
37	0	3	6	8	0,5	0,5	8	3	4,42	3220	665,66	349	8
38	5	3	6	4	0,5	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	506	7,5
39	5	3	6	4	2	0,5	7,5	3	7,82	5108,67	5247,83	639	7,5
40	5	3	6	4	0,5	2	7,5	3	9,2	7418,67	513,84	610	7,5
41	5	1	6	4	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	439	7,5
42	5	1	6	4	2	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	440	7,5
43	2	3	6	4	2	0,5	7,5	7	1000	NA	NA	490	7,5
44	2	3	3	4	2	2	7,5	5	512	NA	NA	550	7,5
45	2	1	3	4	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	365	7,5
46	2	1	3	4	0,5	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	347	7,5
47	2	1	3	4	0,5	0,5	8	3	3,79	5388,5	833,32	382	8
48	2	1	6	6	2	2	8	3	3,93	4179,84	1256	311	8
49	2	1	3	8	2	2	8	3	6,23	5773	1338,33	289	8
50	5	3	3	6	0,5	2	8	3	2,05	1275,5	260,35	533	8
51	2	1	3	6	2	0,5	8	3	5,55	3332	561,84	390	8

52	2	1	4	8	2	2	8	3	4,05	4340,17	1179,17	284	8
53	2	1	6	8	2	2	8	3	3,33	2872,83	7650,01	285	8
54	2	1	4	4	0,5	0,5	8	3	3,8	3912	856,33	375	8
55	2	1	4	4	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	330	7,5
56	2	3	6	4	2	2	7,5	3	4,2	3214,17	1043	473	7,5
57	0	0	6	4	2	2	8	9	1000	NA	NA	225	8
58	0	3	6	4	2	2	7,5	7	1000	NA	NA	*	7,5
59	0	3	6	4	2	2	8	9	1000	NA	NA	409	8
60	2	3	6	6	2	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	429	7,5
61	5	1	6	8	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	367	7,5
62	0	3	6	8	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	300	7,5
63	5	3	3	4	2	0,5	7,5	3	3,5	2135,67	498,01	687	7,5
64	5	3	3	4	2	0,5	7,5	3	3,3	2056,66	740,84	673	7,5
65	5	3	3	4	2	0,5	7,5	3	3,5	2135,67	498,01	687	7,5
66	5	3	3	4	2	0,5	8	3	2,35	1572,5	146,32	760	8
67	3	3	4	6	2	2	7,5	9	1000	NA	NA	443	7,5
68	10	0	3	4	2	0,5	7	9	1000	NA	NA	*	7
69	10	0	6	4	2	0,5	7	9	1000	NA	NA	*	7
70	10	0	3	8	2	0,5	7	9	1000	NA	NA	*	7
71	10	0	6	8	2	0,5	7	9	1000	NA	NA	*	7
72	10	0	3	4	2	0,5	7,5	3	2,76	3704	478,75	458	7,5
73	10	0	6	4	2	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	*	7,5
74	10	0	3	8	2	0,5	7,5	7	692	NA	NA	*	7,5
75	10	0	6	8	2	0,5	7,5	9	1000	NA	NA	*	7,5
76	10	0	3	4	2	0,5	8	3	2,62	1502	520,5	508	8
77	10	0	6	4	2	0,5	8	3	3,26	1607,75	444,5	751	8
78	10	0	3	8	2	0,5	8	3	3,83	2335,5	467,5	899	8
79	10	0	6	8	2	0,5	8	3	5,38	3607,75	558	962	8
80	5	1	4,5	6	1	1	8	3	2,25	3585,67	490,66	425	8

81	5	1	4,5	6	1	1	8	3	2,5	2578	419	441	8
82	5	1	4,5	6	1	1	8	3	2,7	4978,17	541,84	447	8
83	5	1	4,5	6	1	1	8	3	2	2430,83	512,5	426	8
84	5	1	4,5	6	1	1	8	3	2,54	4265,34	727,44	409	8

4. Nuclear magnetic resonance shift and chemical shifts analysis: peak assignments for ceftazidime and the inclusion complex of ceftazidime / Hydroxypropyl- γ -cyclodextrins

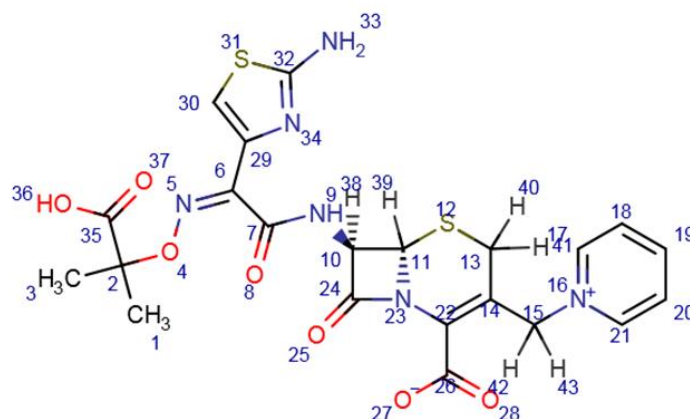


Figure 6 : Peak assignments for ceftazidime (^1H RMN)

Peak	CZ		CZ + HP γ CD		Chemical shifts ($\Delta\delta$, ppm)	Attribution (^1H)
	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	Intensity [rel]	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	Intensity [rel]		
1	8.988	3.380	8.886	1.280	-0.102	17, 21
2	8.600	2.070	8.497	0.710	-0.103	19
3	8.119	3.110	8.016	1.230	-0.103	18, 20
4	7.027	11.800	6.890	1.580	-0.137	30
5	5.890	2.790	5.774	0.580	-0.117	38
6	5.600	2.040	5.489	0.450	-0.111	43
7	5.401	1.850	NA	NA	NA	39
8	5.320	4.200	NA	NA	NA	42
9	3.661	1.890	NA	NA	NA	41
10	3.268	2.100	3.146	0.420	-0.123	40
11	1.526	15.000	1.431	5.480	-0.095	1,1,1 3,3,3

Figure 2 : Chemical shifts and attribution for the protons of ceftazidime and ceftazidime / Hydroxypropyl- γ -cyclodextrins.

Table 2: Summary table of spectral shifts between Vancomycin spectrum without and with HP β CD. NA: Not applicable

Vancomycin			Vancomycin + HP β CD			Shifts
Peak	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	Intensity [rel]	Peak	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	Intensity	
1	7.7674	6.28	1	7.7105	0.04	-0.057
2	7.6643	4.06	2	7.6018	0.03	-0.063
3	7.6145	4.07	3	7.519	0.04	-0.095
4	7.5999	4.07	4	NA	NA	NA
5	7.3437	3.98	5	7.235	0.01	-0.109
6	7.1943	0.75	6	7.1045	0.02	-0.090

7	6.9456	0.98	7	6.866	0.01	-0.080
8	6.5957	0.98	8	6.4902	0.12	-0.106
9	6.5373	1.13	9	6.4316	0.11	-0.106
10	6.2562	2.18	10	6.1547	0.01	-0.102
11	5.6345	15	11	NA	NA	NA
12	5.5804	3.75	12	NA	NA	NA
13	5.479	1.54	13	NA	NA	NA
14	5.3933	1.42	14	NA	NA	NA
15	4.9455	0.86	15	NA	NA	NA
16	4,6325	2,24	16	NA	NA	NA
17	4,3166	1,02	17	NA	NA	NA
18	4,147	0,66	18	NA	NA	NA
19	3,9111	0,6	19	NA	NA	NA
20	3,8417	2,27	20	NA	NA	NA
21	3,725	3,09	21	NA	NA	NA
22	3,5119	1,75	22	NA	NA	NA
23	2,8213	0,74	23	2,7334	0,36	-0,088
24	2,1199	0,57	24	2,0165	0,06	-0,103
25	1,8349	2,94	25	1,7631	0,04	-0,072
26	1,7635	4,02	26	1,6485	0,03	-0,115
27	1,7537	0,67	27	NA	NA	NA
28	1,6298	0,91	28	NA	NA	NA
29	1,6225	0,75	29	NA	NA	NA
30	1,4932	1,41	30	1,4199	0,05	-0,073
31	1,2193	1,29	31	NA	NA	NA
32	1,2114	1,12	32	NA	NA	NA
34	0,9045	1,85	34	0,8192	0,32	-0,085