

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซฟไตรอะโซน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมี ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RELATIONSHIP BETWEEN THE STRUCTURE AND IMMUNOGENICITY OF CEFTRIAXONE

Miss Weena Arjharn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutical
Chemistry

Department of Food and Pharmaceutical Chemistry

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	RELATIONSHIP BETWEEN THE STRUCTURE AND IMMUNOGENICITY OF CEFTRIAZONE
By	Miss Weena Arjharn
Field of Study	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Bodin Tuesuwan, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Jettanong Klaewsongkram, M.D. Assistant Professor Vorasit Vongsutilers, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Pornchai Rojsitthisak, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Bodin Tuesuwan, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Jettanong Klaewsongkram, M.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Vorasit Vongsutilers, Ph.D.)

.....External Examiner
(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

.....External Examiner
(Poonsakdi Ploypradith, Ph.D.)

วิชา อัจฉาญ : ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
ของ เซฟไตรอะโซน (RELATIONSHIP BETWEEN THE STRUCTURE AND
IMMUNOGENICITY OF CEFTRIAXONE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ภก. ดร.
บดีนทร์ ติวสุวรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ. เจตชนง แก้วสงคราม, ผศ.
ภก. ดร. วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ, 131 หน้า.

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับความสามารถในการ
กระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซฟไตรอะโซน โดยทำการศึกษาสารทดสอบจำนวน 12 สาร ประกอบด้วยเซฟ
ไตรอะโซน, เซฟาโลสปอรินที่มีหรือไม่มีหมู่โซ่ข้าง R_1 ที่เหมือนกับเซฟไตรอะโซน, วงแหวนนิวเคลียส
ของเซฟาโลสปอริน, หมู่โซ่ข้างอิสระ R_1 และ R_2 , ผลลัพธ์จากการเสื่อมสลาย, และคอนจูเกท
ระหว่างออกตะไลซินกับเซฟไตรอะโซน ในการศึกษานี้ได้ทำการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการเสื่อม
สลายสองสาร และคอนจูเกทระหว่างออกตะไลซินกับเซฟไตรอะโซน การสังเคราะห์ให้ปริมาณ
ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 53.8%, 60.5% และ 4.4% ตามลำดับ สารทดสอบทั้งหมดได้รับการยืนยัน
โครงสร้างและตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ก่อนนำไปทดสอบ โดยสารทดสอบทั้งหมดมีความบริสุทธิ์
ไม่น้อยกว่า 95% ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารทดสอบถูกประเมินโดยการตรวจวัด
อินเตอร์เฟอรอนแกมมาด้วยวิธีอีไลสปอต เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากอาสาสมัครผู้มี
ประวัติแพ้เซฟไตรอะโซนจำนวน 3 คนถูกนำมาทดสอบกับสารทดสอบ โดยประเมินผลจากจำนวนส
ปอตจากการตอบสนองด้วยการหลั่งอินเตอร์เฟอรอนแกมมาต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนหนึ่งล้าน
เซลล์ จำนวนที่มากกว่า 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากอาสาสมัครกลุ่มควบคุม
จำนวน 10 คนถูกประเมินผลเป็นการตอบสนองเชิงบวก ผลการศึกษาบ่งบอกว่าโครงสร้างของวง
แหวนนิวเคลียสของเซฟาโลสปอรินร่วมกับหมู่โซ่ข้าง R_1 มีบทบาทในปฏิกิริยาการแพ้เซฟไตรอะโซน
มากกว่านิวเคลียสหรือหมู่โซ่ข้างเดี่ยว นอกจากนี้ผลการศึกษายังโน้มน้าวให้เชื่อว่าคอนจูเกทของออก
ตะไลซินสามารถเพิ่มการตอบสนองของอีไลสปอตได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับ
ตัวอย่างทดสอบ จำนวนตัวอย่างทดสอบที่มากขึ้นจากอาสาสมัครผู้มีประวัติแพ้เซฟไตรอะโซนและไม่มี
ปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการแพ้เป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษาต่อไป

ภาควิชา	อาหารและเภสัชเคมี	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	เภสัชเคมี	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5576224733 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

KEYWORDS: CEFTRIAZONE / CEPHALOSPORINS ALLERGY / IMMUNOGENICITY /
DESACETYLCEFOTAXIME / DESACETYLCEFOTAXIME LACTONE / OCTALYSINE
CONJUGATE / ELISPOT IFN-GAMMA

WEENA ARJHARN: RELATIONSHIP BETWEEN THE STRUCTURE AND
IMMUNOGENICITY OF CEFTRIAZONE. ADVISOR: ASST. PROF. BODIN TUESUWAN,
Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. JETTANONG KLAEWSONGKRAM, M.D., ASST.
PROF. VORASIT VONGSUTILERS, Ph.D., 131 pp.

This study focused on the relationship between the chemical structure and immunogenicity of ceftriazone. Twelve tested compounds were selected and prepared, including ceftriazone, another member of cephalosporins with or without an identical R₁ side chain as ceftriazone, a ring nucleus of cephalosporins, R₁ and R₂ side chain moieties, degradation products, and octalysine conjugate. Two degradation products and an octalysine-ceftriazone conjugate were synthesized with yield values of 53.8%, 60.5% and 4.4%, respectively. The structure and purity (greater than 95%) for all tested compounds were characterized and determined, respectively, prior to their immunogenicity evaluation. The immunogenicity was evaluated by using interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT IFN- γ). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from three subjects allergic to ceftriazone were tested with the tested compounds. A number of IFN- γ SFC/10⁶ PBMC greater than 2SD of the mean values in ten control subjects was defined as a positive response. The results suggested that the ring nucleus together with R₁ side chain could play a role in ceftriazone allergic response more than the ring nucleus or R₁ side chain alone. We found that octalysine conjugate can enhance the ELISPOT response. However, due to limitations on our allergic sample, a greater population of PBMC, obtained from subjects allergic to ceftriazone without other factors related to allergic reaction, is needed in further study.

Department: Food and Pharmaceutical Student's Signature

Chemistry Advisor's Signature

Field of Study: Pharmaceutical Chemistry Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2015 Co-Advisor's Signature

ACKNOWLEDGEMENTS

I owe my deepest gratitude to my thesis advisor, Assistant Professor Bodin Tuesuwan, Ph.D., R.Ph. He has been very supportive, helpful, encouraging, and patient throughout my graduate study. I am deeply grateful to my co-advisors, Associate Professor Jettanong Klaewsongkram, M.D., and Assistant Professor Vorasit Vongsutilers, Ph.D., R.Ph., for their guidance, insight, and support throughout this study. I am sincerely grateful to my thesis committee, Associate Professor Pornchai Rojsitthisak, Ph.D., R.Ph., Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D., R.Ph., and Poonsakdi Ploypradith, Ph.D., for their valuable advice and precious time.

I would like to show my gratitude to all subjects who kindly provided their biological samples for this thesis. I sincerely thank Associate Professor Vitaya Sridama, M.D., and Mr. Verachai Kaewpaluek for their generous permission to access the mass spectrometer. I am sincerely grateful to Assistant Professor Mitr Pathipvanich, Ph.D., R.Ph., and Professor Tirayut Vilaivan, Ph.D., for discussion. My special thanks also go to Mr. Pattarawat Thantiworasit and Miss Nithikan Suthumchai for their helpfulness and support on the ELISPOT test and interpretation. Many thanks to all the staff of the Department of Food and Pharmaceutical Chemistry for their kindness and helpfulness.

My special thanks to my supervisors at my company, Chiravi Pavitrapok, Ph.D., R.Ph., Promporn Jamnongtanachot, R.Ph. and Ariya Khunvichai, Ph.D., R.Ph., for their valuable suggestions and kindness during my graduate study. I am indebted to my colleague, Kulwadee Sawatpaiboontawee, R.Ph., for her helpfulness and encouragement. Finally, a special tribute to my lovely family for their love, understanding, and support throughout my life.

This thesis would not have been possible without accounting support by the Research Grant 2012 from Chulalongkorn University together with the Special Task Force for Activating Research (STAR), Chulalongkorn University under the grant number GRB_APS_07-55_30_04.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	3
β-Lactam antibiotics.....	3
Cephalosporins.....	4
Ceftriaxone	5
Drug allergy and immunogenicity of cephalosporins.....	6
Structural studies on immunogenicity of cephalosporins.....	8
Protein or peptide conjugate of β-lactam antibiotics synthesis	12
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	14
OBJECTIVE.....	14
MATERIALS.....	14
Apparatus and instruments	14
Chemicals and reagents	15
METHODS.....	17
Tested compounds	17

	Page
Synthesis of desacetylcefotaxime.....	19
Synthesis of desacetylcefotaxime lactone.....	19
Synthesis of octalysine-ceftriaxone conjugate	20
Structure confirmation of tested compounds.....	20
Purity determination of tested compounds	20
Biological samples	21
ELISPOT assay.....	22
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	24
PREPARATION OF TESTED COMPOUNDS	24
Design of tested compounds.....	24
Synthesis of desacetylcefotaxime.....	25
Synthesis of desacetylcefotaxime lactone.....	31
Synthesis of octalysine-ceftriaxone conjugate	34
STRUCTURE CONFIRMATION OF TESTED COMPOUNDS	43
PURITY DETERMINATION OF TESTED COMPOUNDS	47
Purity of tested compounds	47
HPLC/MS method for determination of free octalysine.....	49
Determination of free octalysine in a conjugated compound.....	55
IMMUNOGENICITY SCREENING OF TESTED COMPOUNDS.....	57
Biological samples	57
Selection of the optimal concentration of tested compounds	58
Evaluation of the non-specific response in the ELISPOT IFN- γ assay	59
ELISPOT IFN- γ assay.....	59

	Page
CHAPTER V CONCLUSION	65
REFERENCES	66
APPENDICES.....	74
APPENDIX A: NMR SPECTRA	75
APPENDIX B: MS SPECTRA	94
APPENDIX C: HPLC/PDA CHROMATOGRAMS	102
APPENDIX D: CERTIFICATE OF APPROVAL.....	115
APPENDIX E: INFORMATION SHEET FOR RESEARCH PARTICIPANT	122
APPENDIX F: CONSENT FORM.....	128
VITA.....	131



LIST OF TABLES

	Page
Table 1: Cephalosporins classification	5
Table 2: Theoretical m/z of the predicted broken piece of octalysine	37
Table 3: Chromatographic purity of tested compounds.....	48
Table 4: Linearity and range of HPLC/MS method for determination of free octalysine	53
Table 5: Accuracy and precision of HPLC/MS method for determination of free octalysine	54
Table 6: Determination of free octalysine in octalysine-ceftriaxone conjugate.....	56
Table 7: Result of ELISPOT IFN- γ assay	64

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1: The structures of the β -lactam ring and β -lactam family	3
Figure 2: The structure of cephalosporins ring nucleus	4
Figure 3: A chemical structure of ceftriaxone.....	6
Figure 4: Penicilloyl and cephalosporoyl derivatives.....	8
Figure 5: Structures of β -lactam antibiotics which were studied by Brandriss <i>et al.</i> ..	9
Figure 6: Structures of β -lactam antibiotics which were studied by Batchelor <i>et al.</i>	10
Figure 7: Structures of compounds which were studied by Uno and Yamasaku	10
Figure 8: Structures of β -lactam antibiotics which were studied by Miranda <i>et al.</i> ..	11
Figure 9: Structures of tested compounds.....	18
Figure 10: The hydrolysis reaction of cefotaxime and ceftriaxone	25
Figure 11: TLC results from synthesis reaction of desacetylcefotaxime.....	26
Figure 12: HPLC/PDA chromatograms of the reaction solutions at initial and the end of reaction time from desacetylcefotaxme synthesis	28
Figure 13: HPLC/UV/MS chromatogram of the reaction solution at the end of reaction time from desacetylcefotaxme synthesis	29
Figure 14: Mass spectra at retention time of 3.6 and 5.0 min from chromatogram in Figure 13.....	30
Figure 15: TLC result from synthesis reaction of desacetylcefotaxime lactone	31
Figure 16: HPLC/UV/MS chromatogram of precipitated product from desacetylcefotaxime lactone synthesis.....	32

	Page
Figure 17: Mass spectra at retention time of 5.3 and 6.3 min from chromatogram in Figure 16.....	33
Figure 18: Conjugation reaction of monolysine and ceftriaxone.....	34
Figure 19: Mass spectrum from the reaction between monolysine and ceftriaxone that performed in alkaline condition at room temperature	35
Figure 20: A chemical structure of octalysine	36
Figure 21: Mass spectra from the stability study of octalysine.....	38
Figure 22: TLC result from octalysine-ceftriaxone conjugate reaction.....	40
Figure 23: Mass spectra from the reaction between octalysine and ceftriaxone (1:2) that performed in alkaline condition at room temperature	41
Figure 24: Mass spectrum from octalysine-ceftriaxone conjugate after cleaned up	42
Figure 25: HPLC/MS chromatograms of blank sample and octalysine standard solution at lowest concentration of calibration curve	50
Figure 26: Linear regression of HPLC/MS method for determination of free octalysine.....	52
Figure 27: Chemical structures of ceftriaxone and ceftazidime.....	61
Figure 28: Chemical structures of ceftriaxone and cefoperazone.....	62
Figure 29: ^1H NMR spectrum of ceftriaxone	76
Figure 30: ^{13}C NMR spectrum of ceftriaxone.....	77
Figure 31: ^1H NMR spectrum of cefotaxime	78
Figure 32: ^{13}C NMR spectrum of cefotaxime.....	79
Figure 33: ^1H NMR spectrum of cefepime	80
Figure 35: ^1H NMR spectrum of cefpirome.....	81

	Page
Figure 37: ^1H NMR spectrum of ceftazidime	82
Figure 39: ^1H NMR spectrum of cefoperazone	83
Figure 41: ^1H NMR spectrum of 7-ADCA.....	84
Figure 42: ^{13}C NMR spectrum of 7-ADCA.....	85
Figure 43: ^1H NMR spectrum of MTTA.....	86
Figure 44: ^{13}C NMR spectrum of MTTA.....	87
Figure 45: ^1H NMR spectrum of TMTD.....	88
Figure 46: ^{13}C NMR spectrum of TMTD.....	89
Figure 47: ^1H NMR spectrum of desacetylcefotaxime.....	90
Figure 48: ^{13}C NMR spectrum of desacetylcefotaxime	91
Figure 49: ^1H NMR spectrum of desacetylcefotaxime lactone.....	92
Figure 50: ^{13}C NMR spectrum of desacetylcefotaxime lactone	93
Figure 51: MS spectrum of ceftriaxone	95
Figure 52: MS spectrum of cefotaxime	95
Figure 53: MS spectrum of cefepime.....	96
Figure 54: MS spectrum of cefpirome	96
Figure 55: MS spectrum of ceftazidime	97
Figure 56: MS spectrum of cefoperazone.....	97
Figure 57: MS spectrum of 7-ADCA.....	98
Figure 58: MS spectrum of MTTA	98
Figure 59: MS spectrum of TMTD.....	99
Figure 60: MS spectrum of desacetylcefotaxime.....	99
Figure 61: MS spectrum of desacetylcefotaxime lactone.....	100

	Page
Figure 62: MS spectrum of octalysine-ceftriaxone conjugate.....	100
Figure 63: MS spectrum of octalysine	101
Figure 64: HPLC/PDA chromatogram of ceftriaxone.....	103
Figure 65: HPLC/PDA chromatogram of cefotaxime.....	104
Figure 66: HPLC/PDA chromatogram of cefepime	105
Figure 67: HPLC/PDA chromatogram of ceftiofime.....	106
Figure 68: HPLC/PDA chromatogram of ceftazidime	107
Figure 69: HPLC/PDA chromatogram of cefoperazone.....	108
Figure 70: HPLC/PDA chromatogram of 7-ADCA.....	109
Figure 71: HPLC/PDA chromatogram of MTTA.....	110
Figure 72: HPLC/PDA chromatogram of TMTD.....	111
Figure 73: HPLC/PDA chromatogram of desacetylcefotaxime	112
Figure 74: HPLC/PDA chromatogram of desacetylcefotaxime lactone	113
Figure 75: HPLC/PDA chromatogram of octalysine-ceftriaxone conjugate	114

LIST OF ABBREVIATIONS

ACA	=	Aminocephalosporanic acid
APA	=	Aminopenicillanic acid
BGG	=	Bovine gamma globulin
CV	=	Coefficient of variation
Da	=	Dalton
D ₂ O	=	Deuterium oxide
DMSO- <i>d</i> ₆	=	Deuterated dimethyl sulfoxide
ELISPOT	=	Enzyme-linked immunosorbent spot
ESI	=	Electrospray ionization
HGG	=	Human gamma globulin
HPLC	=	High performance liquid chromatography
HRMS	=	High resolution mass spectrometry
HSA	=	Human serum albumin
IFN- γ	=	Interferon-gamma
Ig	=	Immunoglobulin
mg	=	Milligram
MHG	=	Major histocompatibility complex
mL	=	Milliliter
MS	=	Mass spectrometry
MW	=	Molecular weight
<i>m/z</i>	=	Mass-to-charge ratio
N	=	Normality

NMR	=	Nuclear magnetic resonance
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cells
PDA	=	Photo diode array detector
PHA	=	Phytohemagglutinin
pKa	=	Acid dissociation constant
PLL	=	Polylysine
ppm	=	Part per million
Q-TOF	=	Tandem quadrupole/time-of flight mass spectrometer
SD	=	Standard deviation
S/N	=	Signal to noise ratio
SFC	=	Spot forming cells
SIM	=	Selected ion monitoring
SPE	=	Solid phase extraction
TLC	=	Thin-layer chromatography
α	=	Alpha
β	=	Beta
δ	=	Chemical shift
ϵ	=	Epsilon
μg	=	Microgram
μM	=	Micromolar

CHAPTER I INTRODUCTION

β -lactam antibiotics, particularly penicillins and cephalosporins, represent the most prescribed drugs for infectious diseases.⁽¹⁾ Early on, penicillins were commonly prescribed; however, the rate of cephalosporins prescriptions have dramatically increased and nowadays cephalosporins have become the most commonly prescribed antibiotics for hospital inpatients.⁽²⁾ Cephalosporins, especially ceftriaxone, were reported as the major cause responsible for allergic reactions because they were mostly used in clinics.⁽³⁻⁶⁾ In general, once a cephalosporin allergic reaction had been found in a patient, physicians and pharmacists usually avoided re-administering that cephalosporin, including other cephalosporins, and other related β -lactam antibiotics to those patients. The abstinence of β -lactam antibiotics have resulted in the prescription of alternative antibiotics, which are generally more expensive for patients and cause unnecessary bacterial resistance to new classes of antibiotics.⁽⁷⁾ The cross-reactivity to other β -lactam antibiotics should be of concern because they share a common β -lactam ring nucleus. However, several studies have also shown that allergic reactions could be related to similarity of the side chain.^(8, 9) Cephalosporins with different side chains may be safely used in patients with a history of cephalosporin allergy. The avoidance of all β -lactam antibiotics in the case of allergy to one of the β -lactam antibiotics may be inappropriate.

Diagnosis of a drug allergy is necessary for decision-making in drug prescription. Despite the validated *in vivo* or *in vitro* allergy tests not available for most drugs, skin testing is widely used.⁽¹⁰⁾ Penicillins have an available commercial skin test reagents while

cephalosporins do not. There is evidence showing that low molecular weight compounds, termed haptens, could sensitize an allergic reaction *in vivo*, as an antigenic determinant, by covalent conjugation to macromolecular carriers such as protein.⁽¹¹⁻¹⁶⁾ The commercial skin test kit of penicillins is composed of a major antigenic determinant (benzylpenicilloyl-polylysine conjugate) and a minor antigenic determinant mixture (a mixture of benzylpenicillin and its degradation products such as benzylpenicilloate, benzylpenicilloic acid).⁽¹⁷⁾

This study has attempted to reveal the relationship between the structure of ceftriaxone and its immunogenicity. The tested compounds, including ceftriaxone itself, and other cephalosporins which share an identical or different side chain with ceftriaxone, its side chain moieties, cephalosporins ring nucleus, degradation products, and octalysine conjugated products, were prepared. The immunogenicity of tested compounds was evaluated using an enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay technique. Eventually, knowledge of the relationship between the structure and immunogenicity of ceftriaxone could lead to the development of a standard approach for cephalosporin allergy diagnosis.

CHAPTER II LITERATURE REVIEW

β -Lactam antibiotics

β -lactam antibiotics have been the most used antibiotics due to their broad spectrum of antibacterial action. The first β -lactam antibiotic, penicillin, was discovered in *Penicillium* mold by Alexander Fleming. Nowadays, β -lactam antibiotics encompass various drugs, due to continuous development. A four-membered cyclic amide ring, also known as the β -lactam ring, is presented in all β -lactam antibiotics. β -lactam antibiotics have been classified based on a core nucleus of drug molecules, as shown in Figure 1.⁽¹⁸⁻²⁰⁾

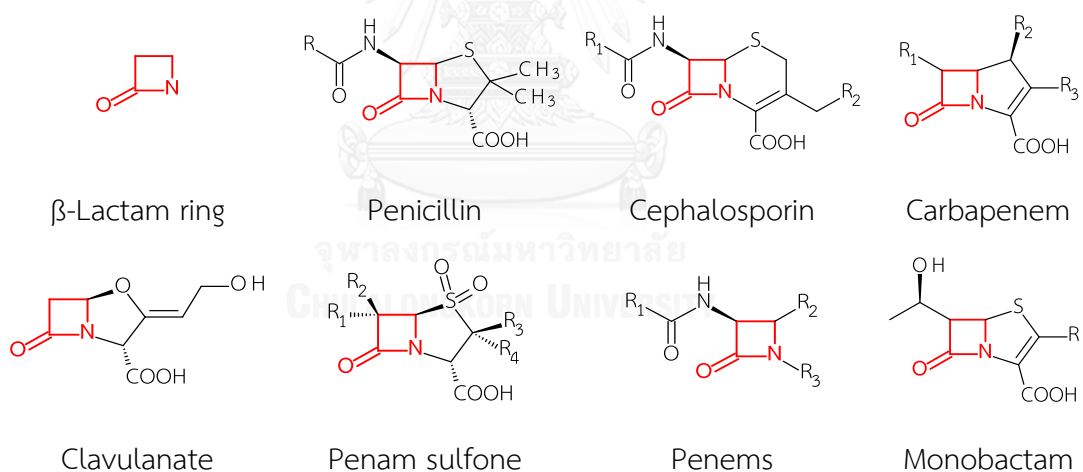


Figure 1: The structures of the β -lactam ring and β -lactam family

β -lactam antibiotics are bactericidal antibiotics; their activity arises from the inhibition of biosynthesis of bacterial cell walls. The β -lactam ring portion binds to penicillin-binding proteins (PBPs), a group of bacterial enzymes, thereby rendering them inactive for their role in cell wall synthesis.

Cephalosporins

Cephalosporins are semi-synthetic antibiotics derived from naturally occurring cephalosporins C that was first isolated from cultures of *Cephalosporium acremonium*. A cephalosporin nucleus, a 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), consists of a four-membered cyclic amide ring (β -lactam ring) and a dihydrothiazine ring. The variety of side chains at the C3 (methylene substituent, R_2) and C7 position (acylamino group, R_1) results in a variety of cephalosporins and antibacterial spectrums.^(16, 20, 21) The ring nucleus of cephalosporins is shown in Figure 2.

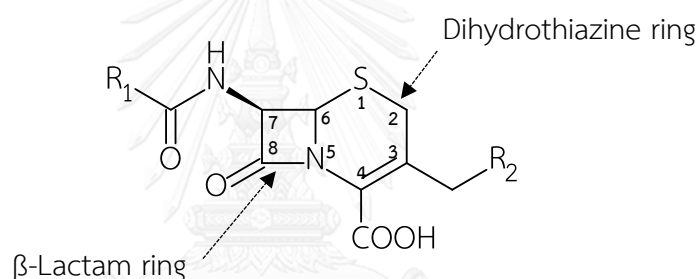


Figure 2: The structure of cephalosporins ring nucleus

Due to variations in their chemical structures and antibacterial spectrums, they are classified into five generations. In brief, first- and second-generation cephalosporins show good activity against gram-positive bacteria, while most third-generation cephalosporins have better gram-negative activity. The fourth- and fifth-generation agent have both gram-positive and gram-negative activity.^(22, 23) The classification of cephalosporins is shown in Table 1.

Table 1: Cephalosporins classification^(22, 23)

1 st Generation	2 nd Generation	3 rd Generation	4 th Generation	5 th Generation
Cefadroxil	Cefaclor	Cefdinir	Cefepime	Ceftaroline
Cefazolin	Cefamandole	Cefixime	Cefpirome	
Cephalexin	Cefmetazole	Cefodizime		
Cephalotin	Cefminox	Cefoperazone		
Cephapirin	Cefonicid	Cefotaxime		
Cephradine	Cefotetan	Cefpodoxime		
	Cefotiam	Ceftizoxime		
	Cefoxitin	Cefpiramide		
	Cefuroxime	Ceftazidime		
	Loracarbacef	Ceftibuten		
		Ceftriaxone		

Ceftriaxone

The chemical structure of ceftriaxone ($C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$, MW 554.58) is shown in Figure 3. There are three pKa values; pKa₁ 2.37 (COOH), pKa₂ 3.03 (aminothiazole), and pKa₃ 4.21 (hydroxytriazinone). The sodium salt of ceftriaxone ($C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$, MW 661.60) was used in this study. Ceftriaxone sodium is soluble in water and sparingly soluble in methanol.^(24, 25)

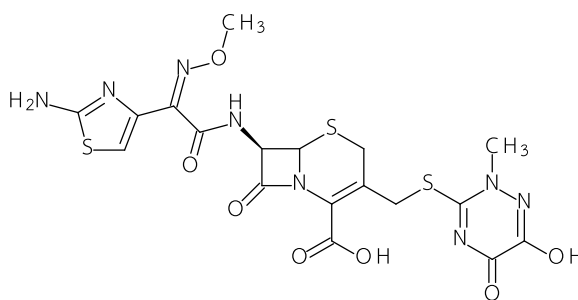


Figure 3: A chemical structure of ceftriaxone

Drug allergy and immunogenicity of cephalosporins

Drug allergy or drug hypersensitivity is a small subset of all adverse drug reactions (ADR). Hypersensitivity reactions are divided into four types, according to the Gell and Coombs classification system. Type I hypersensitivity is mediated by an IgE antibody. The response (such as; urticaria, angioedema, bronchospasm, pruritus, anaphylaxis) is very rapid. Type II, a cytotoxic reaction, is mediated by specific IgG or IgM antibodies and causes hemolytic anemia. Type III is activated by an antigen-antibody complex and results in serum sickness. Type IV, the delayed type, is based on cell mediated. For the delayed type, the drug molecules are presented to T cells by a major histocompatibility complex (MHC). Cytokines and inflammatory mediators are released. Allergic contact dermatitis is presented in 2 to 7 days after drug exposure.⁽²⁶⁾

The stimulation on T cells can be described by three pathways; the hapten/pro-hapten concept, the pharmacological interaction (PI) concept, and the altered peptide repertoire model.⁽²⁷⁻³²⁾ The hapten concept explains that the small molecules (less than 1000 Da), termed hapten, are not antigenic by themselves. They can become antigenic by irreversible covalent conjugation with a macromolecular carrier, such as

an endogenous protein. This implies that the hapten is a chemically reactive molecule. On the other hand, many drugs can elicit immune responses even though they are chemically inert molecules. This phenomenon might be explained by the pro-hapten concept, in that the non-reactive molecules gain their reactivity by metabolism and become reactive. After that it is like the hapten concept, the metabolites bind to endogenous protein and elicit an immune response. The modified proteins from haptization are disturbed in their functions. They might lead to inflammation, production of danger signals, activation of dendritic cells and T cells, and, eventually, immune responses. For the PI concept, the drugs that lack chemical reactivity might fit with an adequate affinity to an appropriate T cell receptors or to the MHC molecules. This non-covalent and reversible interaction can lead to an immune response. For the altered peptide repertoire model, the culprit drug changes the chemistry of the binding cleft since the drug occupies the peptide-binding groove position of MHC protein. These peptides are recognized as a foreign by the immune system.

According to the hapten hypothesis, cephalosporins could conjugate with an endogenous protein and become an antigenic determinant. Their immunogenicity may cause immediate reactions mediated by IgE antibodies,^(33, 34) or non-immediate reactions mediated by T lymphocytes.⁽³⁵⁾ The allergic response may be either selective reactivity to unique cephalosporins or cross-reactivity to other β -lactam antibiotics.^{(36,}

Structural studies on immunogenicity of cephalosporins

Carbonyl moiety in the β -lactam ring of penicillins or cephalosporins could bind to endogenous protein that act as a nucleophile under physiological conditions; therefore, a penicilloyl or cephalosporoyl derivative is formed. The structure of a penicillin major antigenic determinant, a penicilloyl derivative, is stable enough for isolation and elucidation. Therefore a commercial benzylpenicillin major antigenic determinant, a benzylpenicilloyl-polylysine conjugate, is available. On the other hand, the cephalosporoyl derivative was difficult to isolate and elucidate due to its stability. It was proposed that this cephalosporoyl derivative is unstable and undergoes a process of multiple fragmentation in the dihydrothiazine ring.^(21, 22, 38, 39)

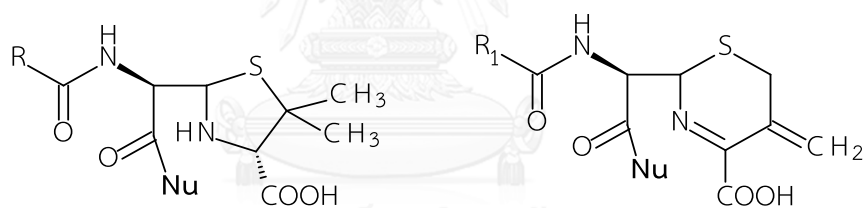


Figure 4: Penicilloyl (left) and cephalosporoyl (right) derivatives

Several studies have attempted to reveal the cephalosporins antigenic determinant. The antigenic determinant of cephalothin was studied and reported by Brandriss *et al.* The human γ -globulin (HGG) conjugated compounds of cephalothin and benzylpenicillin were prepared. Their immunogenicity was studied in rabbits using hemagglutination and passive cutaneous anaphylaxis reactions. The HGG-cephalothin conjugate elicited the formation of antibodies. The cross-reaction between the HGG-cephalothin conjugate and HGG-benzylpenicillin conjugate was shown. The authors

claimed that cephalothin becomes an antigenic determinant through protein adduct at β -lactam carbonyl carbon. However, the structure of HGG-cephalothin conjugate, an antigenic determinant, had not been proved.⁽⁴⁰⁾

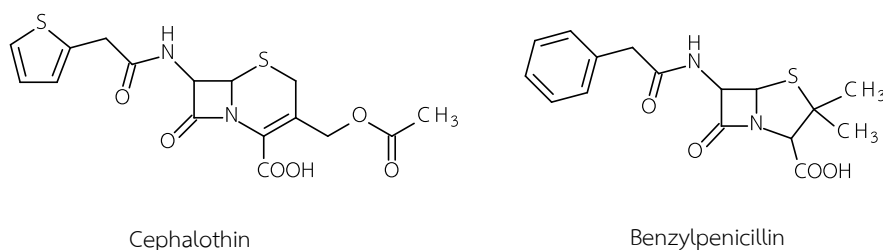


Figure 5: Structures of β -lactam antibiotics which were studied by Brandriss *et al.*⁽⁴⁰⁾

Batchelor *et al.* studied the immunogenicity of cephalosporin derivatives (cephalothin and cephaloridine) and their cross-reaction with penicillins (benzylpenicillin and 6-aminopenicillanic acid, 6-APA). The bovine γ -globulin (BGG) and polylysine (PLL), with the degree polymerizations of 16 and 65, were used as protein carrier to form conjugates. The protein conjugates of 6-APA and benzylpenicillin showed a high degree of cross-reaction. The protein conjugate of 6-APA showed no cross-reaction to protein conjugates of cephalothin and cephaloridine. The authors concluded that a ring nucleus was involved in the allergic reactions. However, there was a cross-reaction between the protein conjugate of benzylpenicillin and cephalosporins (cephalothin, cephaloridine). The author ascribed that might be due to an immunologically similar side chain.⁽⁴¹⁾

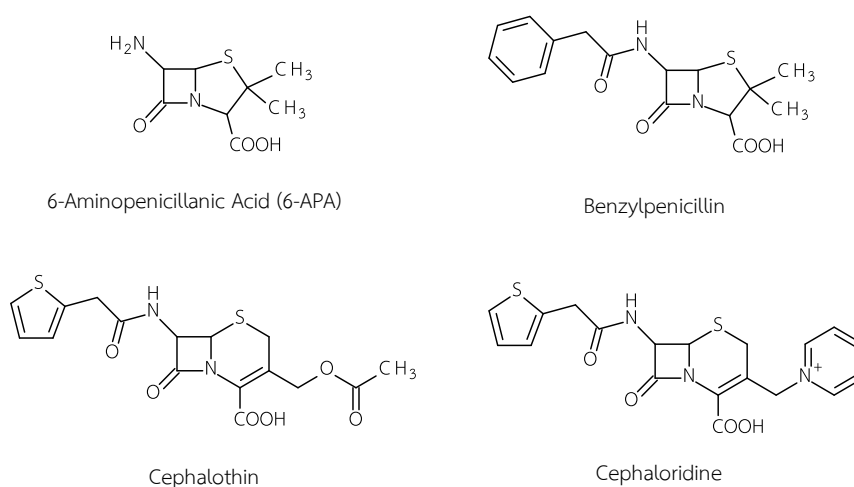


Figure 6: Structures of β -lactam antibiotics which were studied by Batchelor et al.⁽⁴¹⁾

Structural correlation with cross-reactivity of β -lactam antibiotics was performed by Uno and Yamasaku. Tested compounds were studied by using a leucocyte migration inhibition test. The cross-reactivity of tested compounds was evaluated in sixteen patients with history of allergy to cephalosporins that contained a tetrazolyl group at C3. The results showed degree of cross-reaction of 78% to cephalosporins with the tetrazolyl group, 33% to cephalosporins ring nucleus (7-ACA), 29% to tetrazolyl free moiety, 5% to cephalosporins without the tetrazolyl group, and 0% to penicillins. The authors suggested that the tetrazolyl free moiety, as well as cephalosporins ring nucleus moiety, were strongly involved in cephalosporins containing tetrazolyl group allergy.⁽⁴²⁾

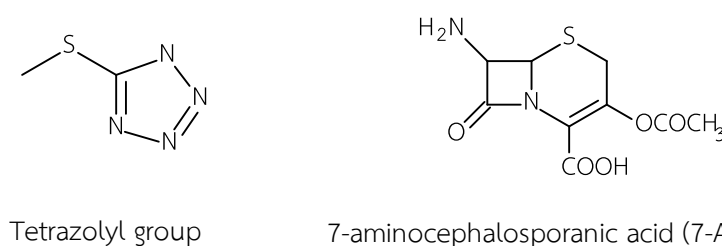


Figure 7: Structures of compounds which were studied by Uno and Yamasaku⁽⁴²⁾

Miranda *et al.* studied the role of side chains on cross-reaction between penicillins and cephalosporins. Amoxicillin showed a high degree of cross-reaction to cefadroxil with no cross-reaction to cefamandole. These results implied that the C7 side chain of cephalosporins contribute to the cross-reactivity.⁽⁴³⁾ Furthermore, Pham and Baldo reported that both side chains at C3 and C7 of cephalosporins were necessary for antibody recognition.⁽⁴⁴⁾

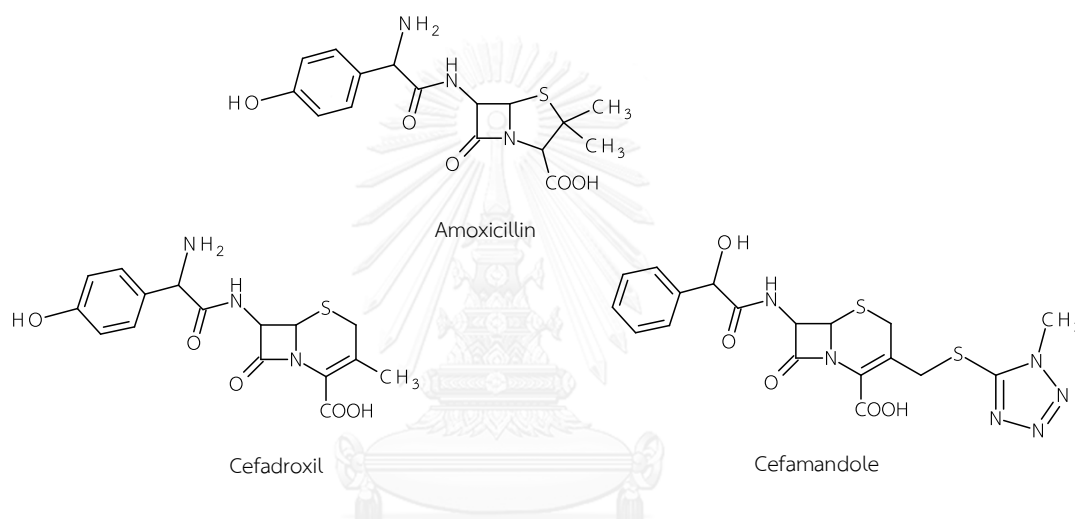


Figure 8: Structures of β -lactam antibiotics which were studied by Miranda *et al.*⁽⁴³⁾

Sánchez-Sancho *et al.* and Montañez *et al.* attempted to study the structure of protein-cephalosporin conjugates. The proposed epitopes that may arise from degradation of protein-cephalosporin conjugates were synthesized. The synthesized epitopes were then tested for their immunogenicity using radioallergosorbent and radioallergosorbent inhibition test. The author suggested that the S1-C6 bond in the dihydrothiazine ring of protein-cephalosporin conjugates could break down due to degradation *in vivo*. They confirmed that the C7 side chain of cephalosporins was necessary for IgE recognition.^(38, 39)

Protein or peptide conjugate of β -lactam antibiotics synthesis

The preparative procedure of protein conjugate of benzylpenicilloyl was presented by Levine. Alkyl amines, aromatic amines and polylysine with various degrees of polymerization were used as carriers. The reaction was performed in alkaline condition (maintained pH about 10-11) at room temperature. The conjugate was precipitated from the reaction mixture by adjusting pH to 3.6 and washed with cold water. The precipitate was re-dissolved in an alkaline aqueous solution, re-precipitated at pH 3.6, and washed with cold water. Finally, it was dried by lyophilization.^(45, 46) For a benzylpenicilloyl-octa-L-lysine conjugate, the benzylpenicilloyl content was assayed with a penamaldate assay. Levine claimed that the number of benzylpenicilloyl groups per molecule of octa-L-lysine was 8.02.⁽⁴⁶⁾

The human γ -globulin (HGG) conjugates of benzylpenicillin and cephalothin were prepared by Brandriss *et al.* The conjugate formation was performed at pH 10.5-11.0 and room temperature. Finally, the reaction solution was brought to pH 7.5-8.0. The conjugate was dialyzed against a buffered saline solution. The author claimed that the conjugate contained 25-35 benzylpenicilloyl groups per molecule of HGG. The amount of cephalothin in the conjugate molecule was not reported.⁽⁴⁰⁾

Batchelor *et al.* prepared the protein conjugate of four β -lactam antibiotics (benzylpenicillin, 6-APA, cephalothin, and cephaloridine). The native antibiotics reacted with bovine γ -globulin (BGG) and polylysine (average degree polymerization of 16 and 65) in an aqueous solution at pH 11-12, 23°C, for 24 hours. The reaction

solution was subjected to exhaustive dialysis against de-ionized water and then lyophilized. There were no data of conjugate characterization.⁽⁴¹⁾

A conjugation of cefaclor and human serum albumin (HSA) was prepared by Pham and Baldo. The reaction was performed at pH 5.5 for 20 hours at 25°C and the conjugates were dialyzed against distilled water at 0°C for 3 days. Characterization of the conjugates was not reported.⁽⁴⁴⁾

Zhao *et al.* prepared the benzylpenicilloyl-polylysine (polylysine with a degree of polymerization of 50) and benzylpenicilloyl-HSA conjugates in an alkaline solution at room temperature for 2 hours. The conjugates were cleaned up using a Sephadex G-25 column, dialyzed, and lyophilized. Characterization of the conjugates was performed by using a penamaldate assay and nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer. The NMR results revealed that a conjugation bond occurred between carbonyl carbon in the β -lactam ring of benzylpenicillin and the ϵ -amino group of polylysine. The penamaldate assay showed that the benzylpenicilloyl group was contained in the benzylpenicilloyl-polylysine conjugate for 11-67% and in the benzylpenicilloyl-HSA conjugate for 24-59%.⁽⁴⁷⁾

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS

OBJECTIVE

This study focused on the relationship between the structure of ceftriaxone and its immunogenicity. Briefly, twelve tested compounds were selected and prepared. The structures of all compounds were characterized spectroscopically, the purity determined, and their immunogenicity evaluated.

MATERIALS

Apparatus and instruments

- Analytical balance (Mettler Toledo, Switzerland)
- Analytical column; a C18 column, XSelect[®] CSH[™], 2.1x100-mm, 2.5- μ m (Waters, USA)
- Autopipette, Rainin Pipet-Lite (Mettler Toledo, USA)
- Filter paper No.1 (Whatman, UK)
- Freeze dryer (Labogene, Denmark)
- HPLC/PDA; a HPLC system included two of LC 10ADVP pumps, an autosampler, a column oven, and a photo diode array detector (Shimadzu, Japan)
- HPLC/MS; a HPLC system (Dionex, USA) couple to microTOF-Q II, a tandem mass spectrometer with an electrospray ionization ion source (ESI-Q-TOF), (Bruker, USA)
- Magnetic stirrer/hot plate (Corning, USA)

- NMR spectrometer (500 MHz), AVANCE III HD (Bruker, USA)
- Nylon membrane filter, 0.22- μm (Pall Corporation, USA)
- Nylon syringe filter, 0.22- μm (Filtrex, USA)
- Refrigerated centrifuge (Labogene, Korea)
- Sep-Pak[®] C18, 3-mL, 500-mg (Waters, USA)
- TLC Silica gel 60 F₂₅₄, plastic sheet (Merck, USA)
- Ultrasonic bath (Elma Schmidbauer, Germany)
- Vortex mixer (Vortex-Genie, Germany)
- Water purification system (Millipore, Germany)

Chemicals and reagents

- 2-Amino- α -(methoxyimino)-4-thiazoleacetic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- 7-Aminodesacetoxycephalosporanic acid (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- Ammonium formate (Acros, USA)
- Ammonia solution (Lobachemie, India)
- Cefepime dihydrochloride monohydrate (S.Z. Phystandard Bio-Tech Co., Ltd., China)
- Cefotaxime sodium (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- Cefoperazone (S.Z. Phystandard Bio-Tech Co., Ltd., China)
- Cefpirome sulphate (BePharm Ltd., China)
- Ceftazidime (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- Ceftriaxone disodium hemiheptahydrate (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- D₂O (Merck, Switzerland)

- Disodium hydrogen phosphate (Merck, Germany)
- DMSO-*d*6 (Merck, Switzerland)
- Formic acid (Merck, Germany)
- Hydrochloric acid (Merck, Germany)
- L-Lysine (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (B&J, Korea)
- Octa-L-lysine (GenScript, USA)
- Potassium chloride (Merck, Germany)
- Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)
- Sodium chloride (Merck, Germany)
- Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- Tetrahydro-2-methyl-3-thioxo-1,2,4-triazine-5,6-dione (Sigma-Aldrich, USA)

METHODS

The overall approach of this study was composed of the preparation of tested compounds and screening of immunogenicity of the prepared tested compounds.

Tested compounds

This study was designed to test the immunogenicity of twelve compounds as shown in Figure 9. Ceftriaxone itself was certainly included in our study. Furthermore, cephalosporins which share an identical R₁ side chain with ceftriaxone (cefepime, cefpirome, and cefotaxime) and cephalosporins which contain different side chains from ceftriaxone (ceftazidime and cefoperazone) were also selected.

Small moieties which represented the cephalosporin ring nucleus (7-aminodesacetoxycephalosporanic acid, 7-ADCA), R₁ side chain of ceftriaxone (2-amino- α -(methoxyimino)-4-thiazoleacetic acid, MTTA), and R₂ side chain of ceftriaxone (tetrahydro-2-methyl-3-thioxo-1,2,4-triazine-5,6-dione, TMTD) were also included.

Due to the stability issue of ceftriaxone, it is possible that the compound can be degraded under hydrolytic reaction conditions. So the degradation products of ceftriaxone (desacetylcefotaxime and desacetylcefotaxime lactone) were also included.

According to the hapten hypothesis described previously, the octyllysine-ceftriaxone conjugated compound is interesting and therefore included in our study. Thus, this conjugate was synthesized.

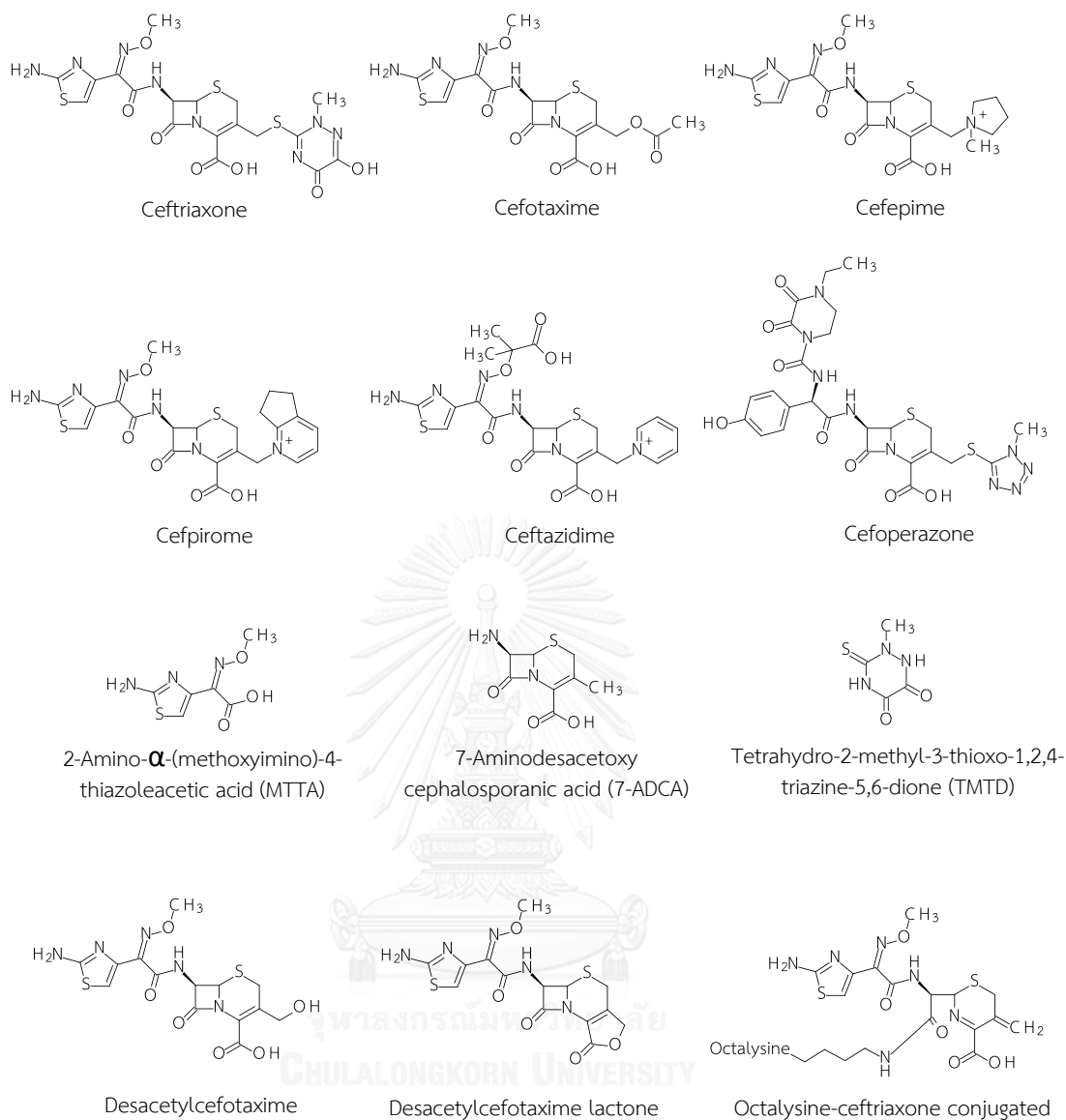


Figure 9: Structures of tested compounds

Synthesis of desacetylcefotaxime

Cefotaxime sodium (0.936 g) was dissolved in 20 mL of 0.3 N sodium hydroxide solution. The reaction solution was stirred in an ice bath with a temperature not greater than 5°C. The reaction was monitored by TLC (silica gel 60 F₂₅₄) using a mixture of methanol : ethyl acetate (1:2) as a developing solvent. After 3 hours, the solution was brought to pH 7-8 using hydrochloric acid and cleaned up by solid-phase extraction (SPE) with an octadecyl (C18) cartridge (Sep-Pak®). Finally, the eluted solution was lyophilized.

Synthesis of desacetylcefotaxime lactone

Cefotaxime sodium (0.468 g) was dissolved in 10 mL of 0.3 N sodium hydroxide solution. The reaction solution was stirred in an ice bath with a temperature not greater than 5°C. After 3 hours, the solution was brought to about pH 2 with hydrochloric acid and proceeded by stirring at room temperature. After 2 hours, the stirred solution was cooled down in an ice bath and brought up to pH 7-8 using a 2 N sodium hydroxide solution. The reaction was followed by TLC (silica gel 60 F₂₅₄) using a mixture of methanol : ethyl acetate (1:2) as a developing solvent. The formed precipitate was collected using filter paper No.1 and washed with a small amount of cold ultrapure water. The moist precipitate was lyophilized.

Synthesis of octalysine-ceftriaxone conjugate

Octalysine (52.17 mg) and ceftriaxone disodium hemiheptahydrate (66.16 mg) was dissolved in 1 mL of 0.1 N sodium hydroxide solution. The reaction solution was then stirred at room temperature and maintained at about pH 11. The reaction was monitored by TLC (silica gel 60 F₂₅₄) using a mixture of water : methanol : ethyl acetate : ammonia solution (0.5:1:1.5:0.05) as a developing solvent. After 2 hours, the solution was brought to pH 7-8 with 1 N hydrochloric acid solution, centrifuged at 5000 rpm, 4°C for 10 minutes and cleaned up by Sep-Pak[®] C18. Finally, the eluted solution was lyophilized.

Structure confirmation of tested compounds

The structures of all tested compounds were confirmed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high resolution mass spectrometry (HRMS) techniques. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD NMR spectrometer at 500 MHz. All chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm). Mass spectra were recorded on a Bruker micrOTOF-Q II mass spectrometer with an electrospray ionization ion source (ESI-Q-TOF) in positive mode.

Purity determination of tested compounds

Purity of the tested compounds was determined by using high performance liquid chromatography coupled with a photo diode array detector (HPLC/PDA). All tested compounds were prepared with a concentration of 100 μ g/mL. The chromatographic separation was on an XSelect[®] CSH[™] C18 column (2.1x100-mm, 2.5- μ m) operated at

40°C. The mobile phase was a gradient of buffer (5 mM ammonium formate or 0.1% formic acid) and methanol with a flow rate of 0.3 mL/min. The peak purity values were considered using the PDA which was operated in the wavelength range of 200-800 nm. The percentage of area responses from the specific wavelength was reported as chromatographic purity of the tested compound.

For the octalysine-ceftriaxone conjugate, the free octalysine, an excess reactant, was determined using HPLC coupled with a mass spectrometer (HPLC/MS). The chromatographic separation was on a C18 column (XSelect[®] CSH[™], 2.1x100-mm, 2.5- μ m) operated at 40°C. The mobile phase was an isocratic of 0.1% formic acid and methanol with a flow rate of 0.3 mL/min. The mass spectrometer was operated in positive electrospray ionization (ESI+) mode. The ions were monitored with a selected ion monitoring (SIM) mode. Quantification was achieved by monitoring the ions at m/z of 261.6998. Purity of the octalysine-ceftriaxone conjugate was considered using both HPLC/PDA and HPLC/MS results.

Biological samples

Control sample

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 control subjects without a history of β -lactam antibiotics allergy were used as control samples. The research protocol with the title of “Relationship between the structure and immunogenicity of ceftriaxone” was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of

Medicine, Chulalongkorn University (Certificate of approval No. 630/2015, IRB No. 131/58, Approval date: September 17, 2015).

Allergic sample

The retained PBMC from allergic subjects with a history of ceftriaxone allergy were used as allergic samples. Those PBMC were obtained from a study with the title of “*In vitro* investigation to study cross-reactivity reactions to third generation cephalosporins in patients with a history of beta-lactam allergy” (Certificate of approval No. 523/2014, IRB No. 251/57, Approval date: August 7, 2014).

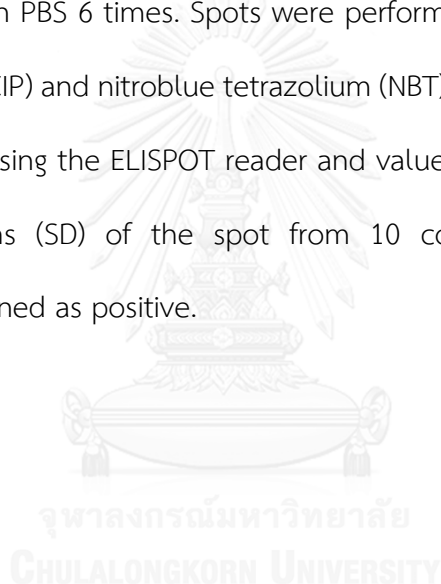
Blood sample collection and processing

Whole blood samples (20 mL) were collected into acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tubes. PBMC were separated from the whole blood by a density gradient centrifugation technique using Ficoll-Hypaque solution and kept frozen in liquid nitrogen until use.

ELISPOT assay

The 96-well flat-bottom nitrocellulose plates (MultiScreen HTS™ IP, Millipore, Ireland) were coated with anti-human IFN- γ mAb 1-D1K (Mabtech, Sweden). The plates were incubated overnight at 4°C. They were washed with phosphate buffer saline (PBS), blocked by 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) in RPMI medium (RPMI 1640, PAN™ Biotech, Germany) at 37°C for at least 1 hour, and then washed with PBS. PBMC were seeded in wells (200,000-250,000 cells per well) and incubated at 37°C in 5%

CO₂ in the presently tested compounds with a concentration of 400 μM (10 μg/mL for octalysine-ceftriaxone conjugate). Wells containing PBMC alone served as negative controls and wells containing PBMC spiked with phytohemagglutinin (PHA, Sigma[®], USA) served as positive controls. After 40-48 hours, the plates were washed with PBS 6 times. Anti-human IFN-γ mAb biotinylated (Mabtech) was added into the wells, incubated at 37°C for 1.5 hours, and washed with PBS 6 times. Streptavidin-alkaline phosphatase solution (Mabtech) was added into each well, incubated at 37°C for 1 hour and washed with PBS 6 times. Spots were performed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) as substrates. The number of spots was analyzed using the ELISPOT reader and values greater than the mean plus 2 standard deviations (SD) of the spot from 10 control subjects, each tested compound, were defined as positive.



CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION

PREPARATION OF TESTED COMPOUNDS

Design of tested compounds

Cephalosporins, especially ceftriaxone, are among the most commonly reported drugs causing allergic reaction;⁽³⁻⁶⁾ the relationship between the structure and its immunogenicity is of our current interest. This study focused on the relationship between the structure of ceftriaxone and its immunogenicity. Twelve compounds were designed and prepared. Ceftriaxone itself was specifically selected for our study.

Cross-reactions between β -lactam antibiotics that share the same side chain have been reported in several studies.⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾ Cephalosporins that share the same R_1 side chain with ceftriaxone (cefotaxime, cefepime, and cefpirome) were selected for our study. Furthermore, the cephalosporins that contain different side chains from ceftriaxone (ceftazidime and cefoperazone) were also included.

There are some studies reporting that the ring nucleus of β -lactam antibiotics as well as their side chains, both R_1 and R_2 side chains, could contribute to immunogenicity of β -lactam antibiotics. Therefore, the cephalosporin ring nucleus, 7-ADCA, was included. Moreover, the R_1 and R_2 side chain moieties, MTTA and TMTD, were also included.

Due to the stability issue of ceftriaxone,⁽⁴⁸⁾ the R_2 side chain might be cleaved from ceftriaxone, while the β -lactam ring still remains, to provide a degradation product, desacetylcefotaxime. In addition, a lactone derivative could be derived from

desacetylcefotaxime in an acidic environment. Therefore, the two plausible degradation products (desacetylcefotaxime and desacetylcefotaxime lactone) were prepared and studied in this work.

According to the hapten hypothesis, small molecules bind to macromolecules, carrier protein, to provoke an immune response. In our study, octalysine (MW 1043.40) was used as such a carrier protein. Octalysine-ceftriaxone conjugate was thus prepared.

Synthesis of desacetylcefotaxime

Desacetylcefotaxime not only is a degradation product of cefotaxime but also a degradation product of ceftriaxone as described in Figure 10. The free R₂ side chain of cefotaxime is easier to remove from the reaction; hydrolysis of cefotaxime provided desacetylcefotaxime as a degradation product together with acetic acid as a free R₂ side chain. So, cefotaxime was used as a reactant to produce the desacetylcefotaxime in our study.

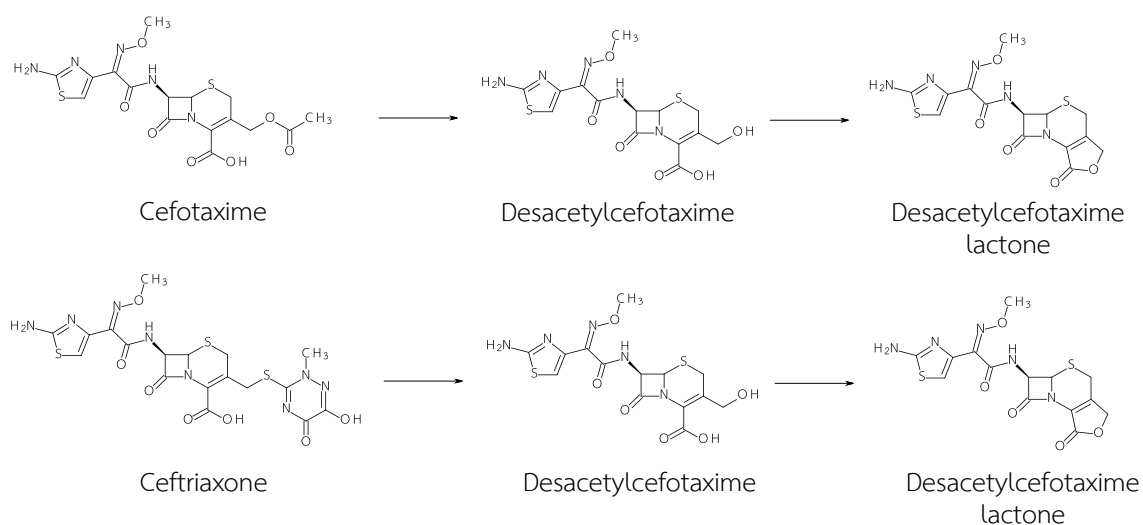


Figure 10: The hydrolysis reaction of cefotaxime and ceftriaxone

The reaction was set up in an alkaline condition using sodium hydroxide solution as described in the previous work by Fabre *et al.*⁽⁴⁹⁾ and Vilanova *et al.*⁽⁵⁰⁾ The first attempt in our experiment was based on concern of the nucleophilic attack towards the stability of the β -lactam ring. In order to preserve the β -lactam ring, the synthetic reaction of desacetylcefotaxime was initially set up at low temperature. Cefotaxime was dissolved in sodium hydroxide solution and stirred in an ice bath. The reaction was monitored with TLC (silica gel 60 F₂₅₄) using a mixture of methanol : ethyl acetate (1:2) as a developing solvent. In the first attempt, the reaction was performed until the cefotaxime disappeared. At the end of the reaction time, the spot of cefotaxime at the R_f value of 0.42 disappeared. It showed only one UV-absorbed spot at the R_f value of 0.25. The TLC results are shown in Figure 11.

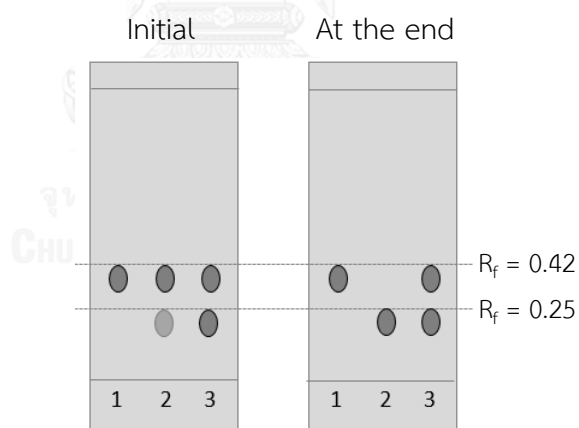


Figure 11: TLC results from synthesis reaction of desacetylcefotaxime. 1) cefotaxime standard solution; 2) reaction solution at initial or at the end of reaction time; 3) co-spot.

The reaction solutions at the initial and end reaction times were analyzed by HPLC/PDA. The chromatograms of both reaction solutions are shown in Figure 12. At the end of the reaction time, the peak of cefotaxime at the retention time of 4.1 min disappeared. Two peaks with retention times of 2.3 and 2.8 min were observed at the end of the reaction time.

The HPLC/UV/MS result of reaction solutions at the end of the reaction times showed two peaks in both the UV and MS detectors (Figure 13). Each peak was considered (Figure 14). Although the two peaks showed the same molecular ion at m/z of 414 and 827, the differences in their retention times convinced us that they were different species. According to reverse phase chromatographic separation, the species in the second peak showed less polarity than the species in the first peak. The structure of both species was proposed based on molecular ion data. The proposed species in the first and second peak were desacetylcefotaxime and its dimer, respectively. The results revealed that the dimer of desacetylcefotaxime was generated together with desacetylcefotaxime in this synthetic reaction.

The dimer of desacetylcefotaxime was a by-product of this reaction. Amino moiety in the R_1 side chain, the aminothiazole group, is deprotonated under the reaction condition. The deprotonated amino group could attack the β -lactam ring of the second molecule of desacetylcefotaxime to form a corresponding dimer. The dimer was difficult to remove from the desacetylcefotaxime. Hence, it was challenging to minimize an amount of dimer in this synthesis; the amount of dimer was thus targeted to not exceed 5%. So, the reaction was stopped prior to completion. Column

chromatography was used to remove the remaining cefotaxime. Eventually, this procedure provided desacetylcefotaxime with a purity of 96.6% in a 53.8% yield.

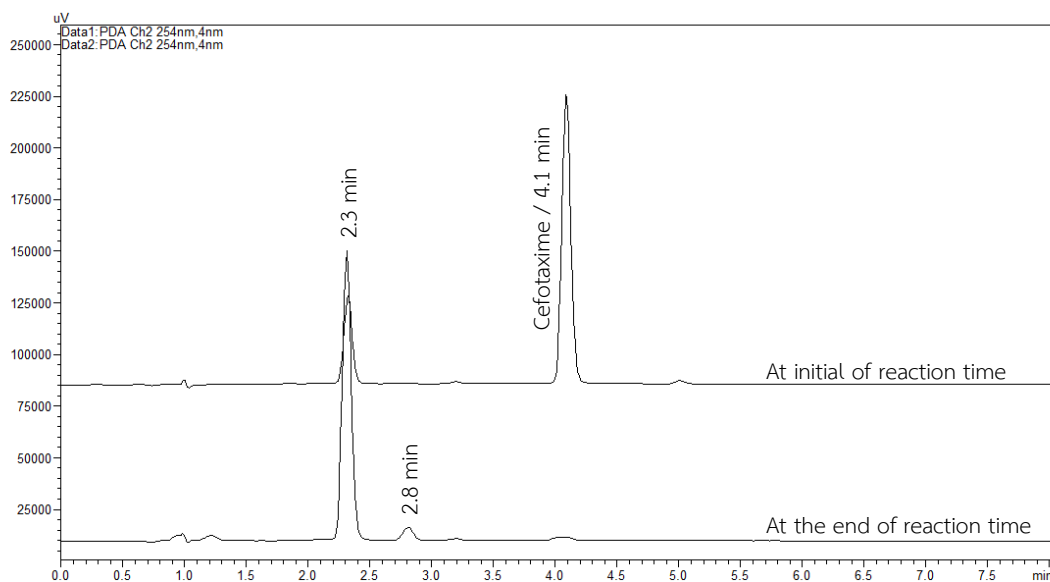


Figure 12: HPLC/PDA chromatograms of the reaction solutions at initial (upper) and the end (lower) of reaction time from desacetylcefotaxime synthesis. Mobile phase was a gradient of 5 mM ammonium formate and methanol. The chromatographic separation was on a C18 column (XSelect[®] CSH[™], 2.1x100-mm, 2.5- μ m).

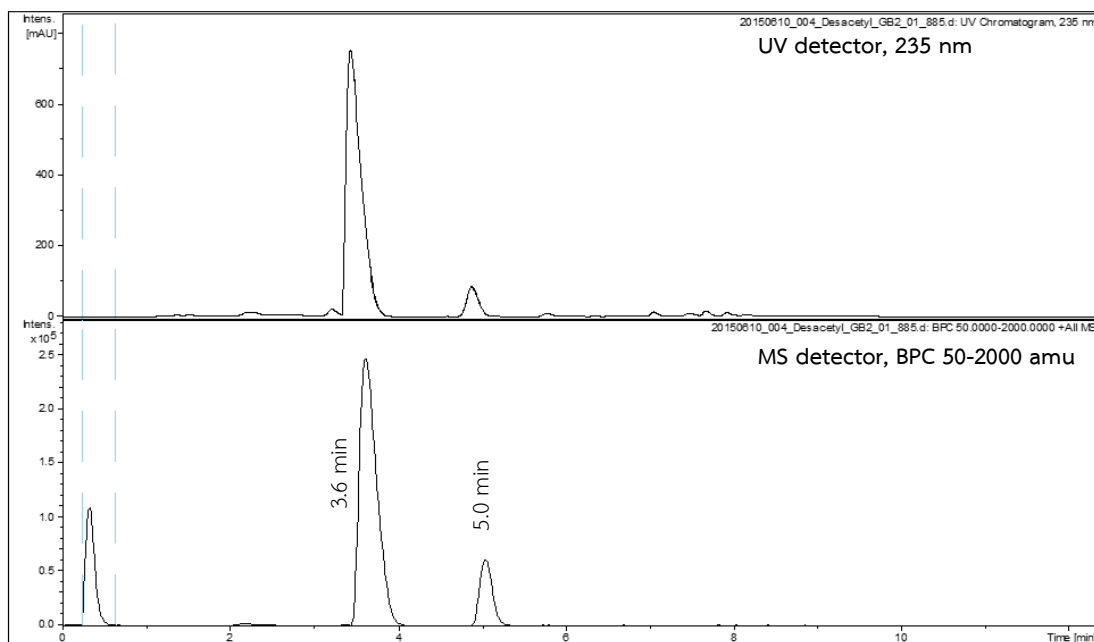


Figure 13: HPLC/UV/MS chromatogram of the reaction solution at the end of reaction time from desacetylcefotaxme synthesis. Mobile phase was a gradient of 5 mM ammonium formate and methanol. The chromatographic separation was on a C18 column (XSelect® CSH™, 2.1x100-mm, 2.5- μ m).

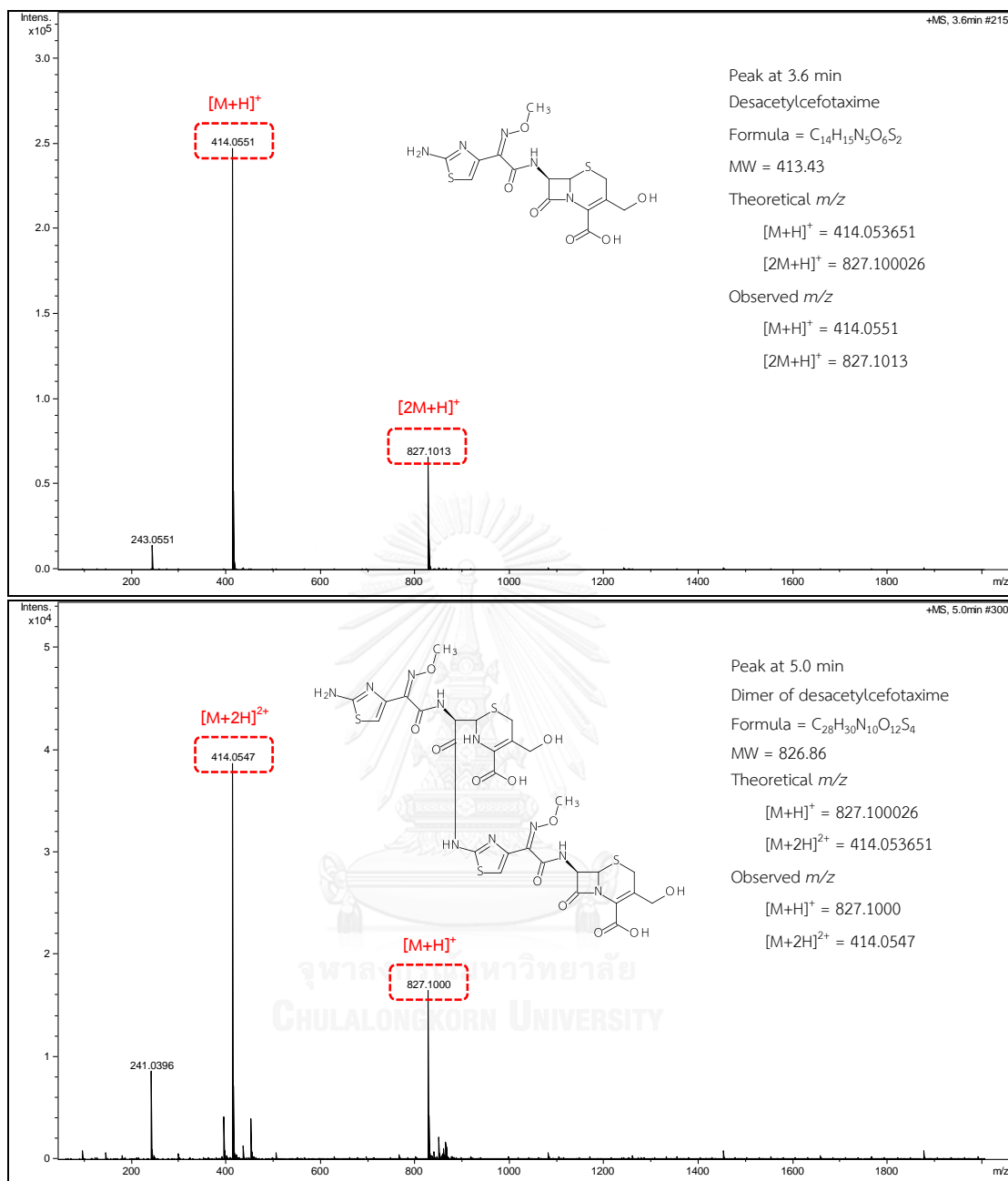


Figure 14: Mass spectra at retention time of 3.6 (upper) and 5.0 (lower) min from chromatogram in Figure 13.

Synthesis of desacetylcefotaxime lactone

As shown in Figure 10, desacetylcefotaxime lactone can be derived from desacetylcefotaxime via hydrolysis. The deacetylated derivative of cefotaxime was generated at low temperature under alkaline condition and consecutively converted to the lactone derivative under acidic condition. TLC (silica gel 60 F₂₅₄) with a developing solvent of methanol : ethyl acetate (1:2) was used to monitor the reaction. The reaction was performed until all the desacetylcefotaxime was converted to desacetylcefotaxime lactone. The TLC result is shown in Figure 15. In an acidic condition, we observed a new UV-absorbed spot at the R_f value of 0.75. The product precipitated when the pH of the reaction solution was brought up and the temperature was cooled down. However, a dimer of desacetylcefotaxime lactone was observed (Figure 16 and Figure 17). It might come from a dimer of desacetylcefotaxime. Eventually, this procedure provided desacetylcefotaxime lactone with a purity of 97.6% in a 60.5% yield.

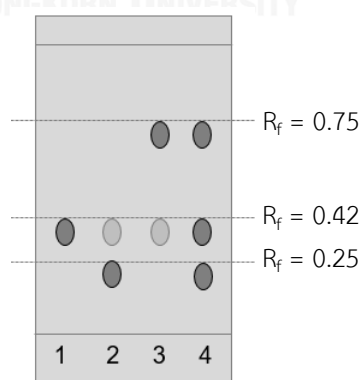


Figure 15: TLC result from synthesis reaction of desacetylcefotaxime lactone. 1) cefotaxime standard solution; 2) reaction solution in alkaline condition; 3) reaction solution in acidic condition; 4) co-spot.

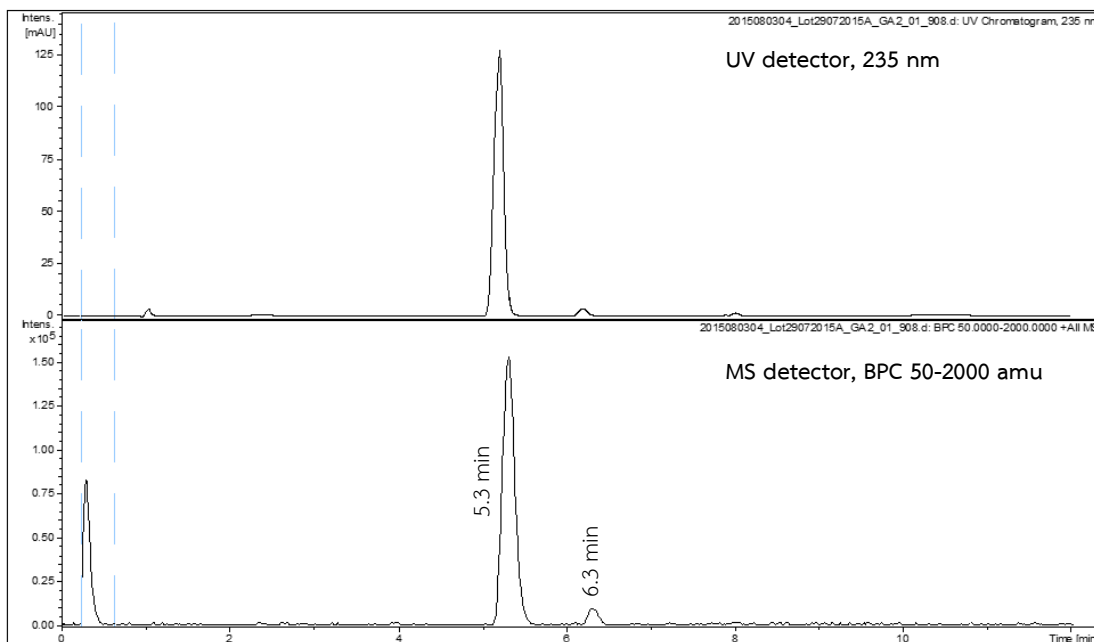


Figure 16: HPLC/UV/MS chromatogram of precipitated product from desacetylcefotaxime lactone synthesis. Mobile phase was a gradient of 5 mM ammonium formate and methanol. The chromatographic separation was on a C18 column (XSelect[®] CSH[™], 2.1x100-mm, 2.5- μ m).

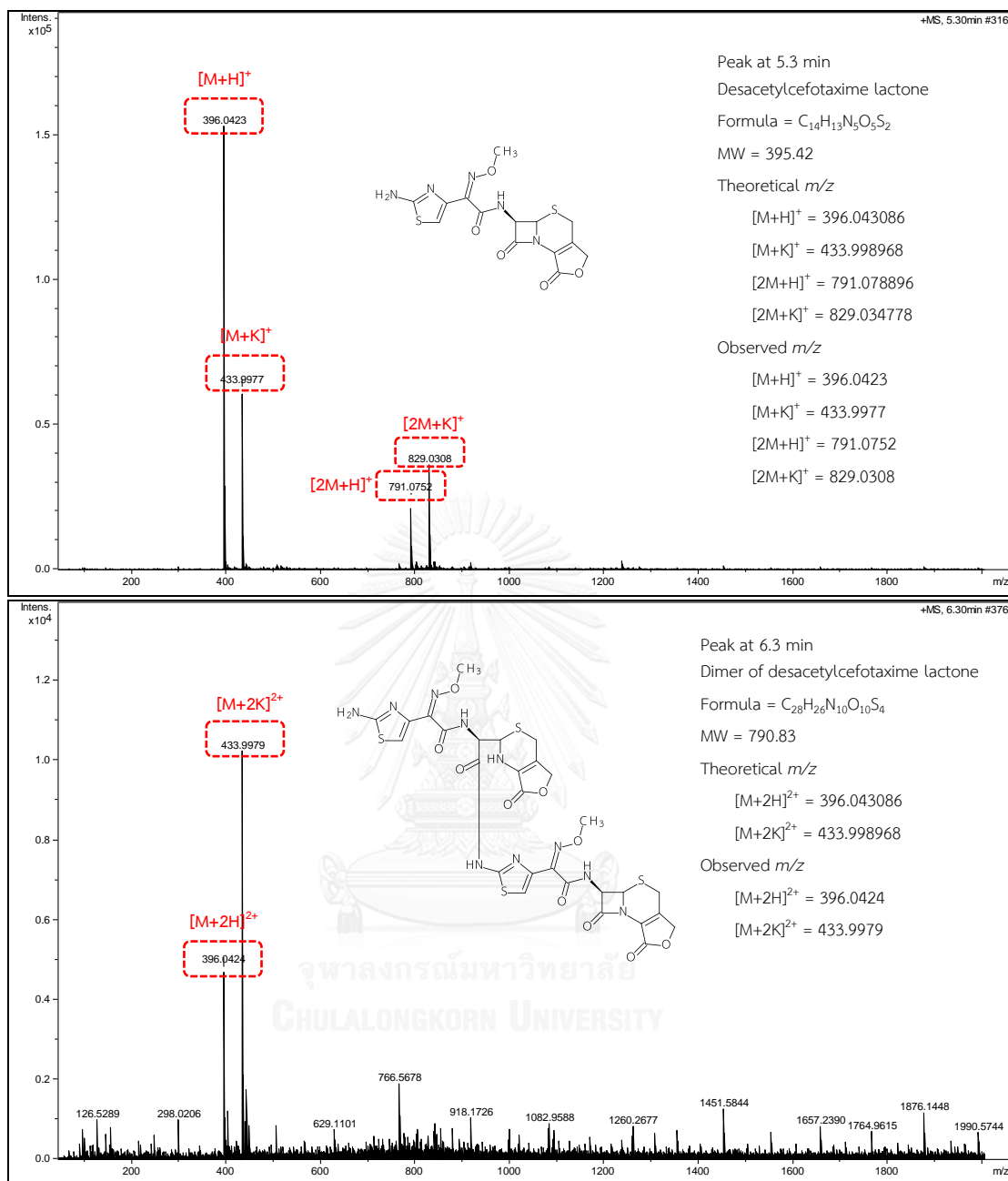


Figure 17: Mass spectra at retention time of 5.3 (upper) and 6.3 (lower) min from chromatogram in Figure 16.

Synthesis of octalysine-ceftriaxone conjugate

Reaction between monolysine and ceftriaxone

Hydrolysis of the β -lactam ring of ceftriaxone and the conjugation reaction may compete; so, an appropriate condition was investigated. Monolysine ($C_6H_{14}N_2O_2$, MW 146.19) was used for a preliminary study of the conjugation reaction. The conjugate reaction of monolysine and ceftriaxone is proposed in Figure 18. The formula of the monolysine-ceftriaxone conjugate is $C_{20}H_{27}N_7O_7S_2$ with a molecular weight of 541.60.

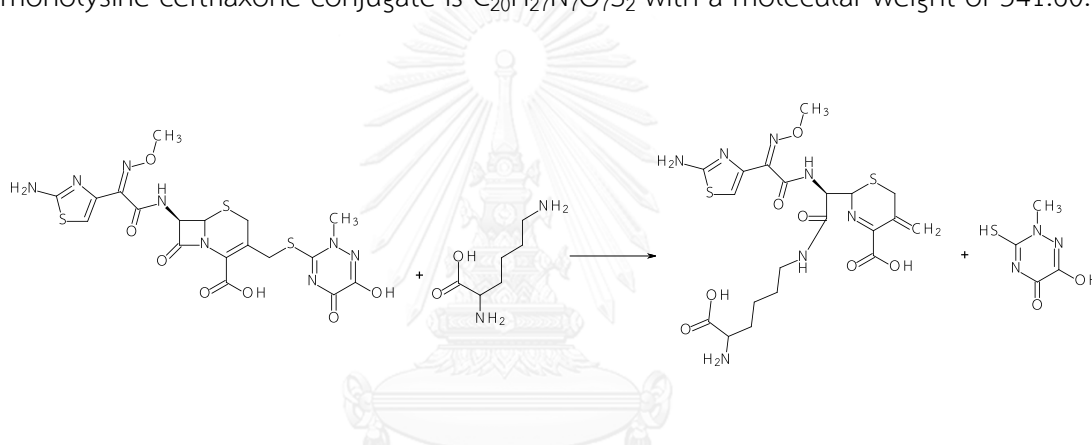


Figure 18: Conjugation reaction of monolysine and ceftriaxone

The reaction between monolysine and ceftriaxone was performed in a 0.1 N sodium hydroxide solution at room temperature. The conjugated product was analyzed using HPLC/MS (Figure 19).

Under alkaline condition, the amino moiety of lysine is deprotonated into a good nucleophile. A carbonyl group of the β -lactam ring of ceftriaxone was attacked by the amino group of lysine. The R_2 side chain was cleaved from C3 of the ceftriaxone. On the other hand, the protonated amino group of lysine, acting as a poor nucleophile, does not react to the β -lactam ring of ceftriaxone, while a water molecule does. So,

degradation of ceftriaxone occurs. Control of the ionization state of lysine needs to be a concern for conjugation.

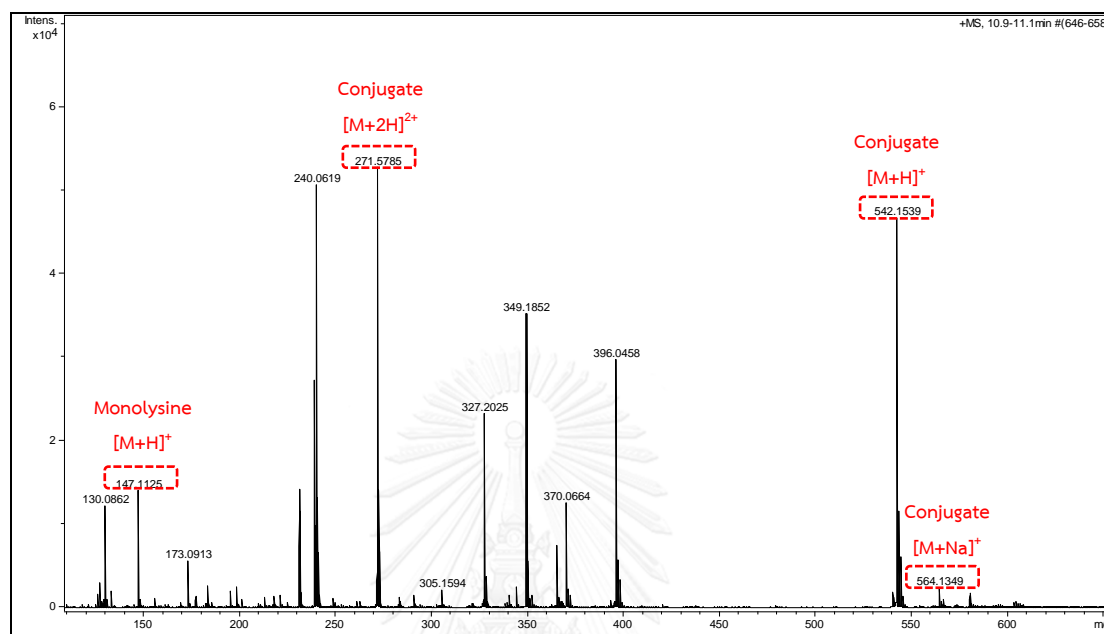


Figure 19: Mass spectrum from the reaction between monolysine and ceftriaxone that performed in alkaline condition at room temperature

Octalysine stability

The chemical structure of octalysine (C₄₈H₉₉N₁₆O₉, MW 1043.40) is shown in Figure 20. Since the hapten hypothesis could be one explanation for allergic reactions, a peptide conjugate of ceftriaxone was prepared for this study. Octalysine was used as a carrier protein in order to form an octalysine-ceftriaxone conjugate in this study. Due to a concern of peptide bond stability, stability of octalysine was investigated prior to performing the conjugate reaction.

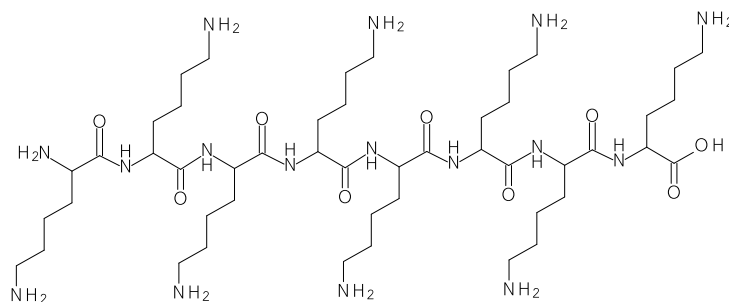


Figure 20: A chemical structure of octalysine

The stability of octalysine was studied under various conditions. An octalysine solution was prepared with a concentration of 50 mM and stirred for 18 hours in water at room temperature, in water at 60°C, in 0.45 N hydrochloric acid solution at room temperature, and in 0.45 N sodium hydroxide solution at room temperature. The testing solutions were analyzed using a mass spectrometer.

Mass spectra in Figure 21 shows the signal of octalysine with protonated molecular ions of $[M+3H]^{3+}$ and $[M+4H]^{4+}$. A broken piece of octalysine (Table 2) was not detected in any MS testing condition. The result suggests that octalysine was stable under testing conditions within the MS detection experiment.

Table 2: Theoretical m/z of the predicted broken piece of octalysine

Sequence	m/z	Sequence	m/z
K	$[M+H]^+ = 147.112804$	KKKKK	$[M+H]^+ = 659.492656$
KK	$[M+H]^+ = 275.207767$		$[M+2H]^{2+} = 330.249966$
	$[M+2H]^{2+} = 138.107522$		$[M+3H]^{3+} = 220.502403$
KKK	$[M+H]^+ = 403.302730$		$[M+4H]^{4+} = 165.628621$
	$[M+2H]^{2+} = 202.155003$	KKKKKK	$[M+H]^+ = 787.587619$
	$[M+3H]^{3+} = 135.105761$		$[M+2H]^{2+} = 394.297448$
KKKK	$[M+H]^+ = 531.397693$		$[M+3H]^{3+} = 263.200724$
	$[M+2H]^{2+} = 266.202485$		$[M+4H]^{4+} = 197.652362$
	$[M+3H]^{3+} = 177.804082$	KKKKKKK	$[M+H]^+ = 915.682582$
	$[M+4H]^{4+} = 133.604881$		$[M+2H]^{2+} = 458.344929$
			$[M+3H]^{3+} = 305.899045$
			$[M+4H]^{4+} = 229.676103$

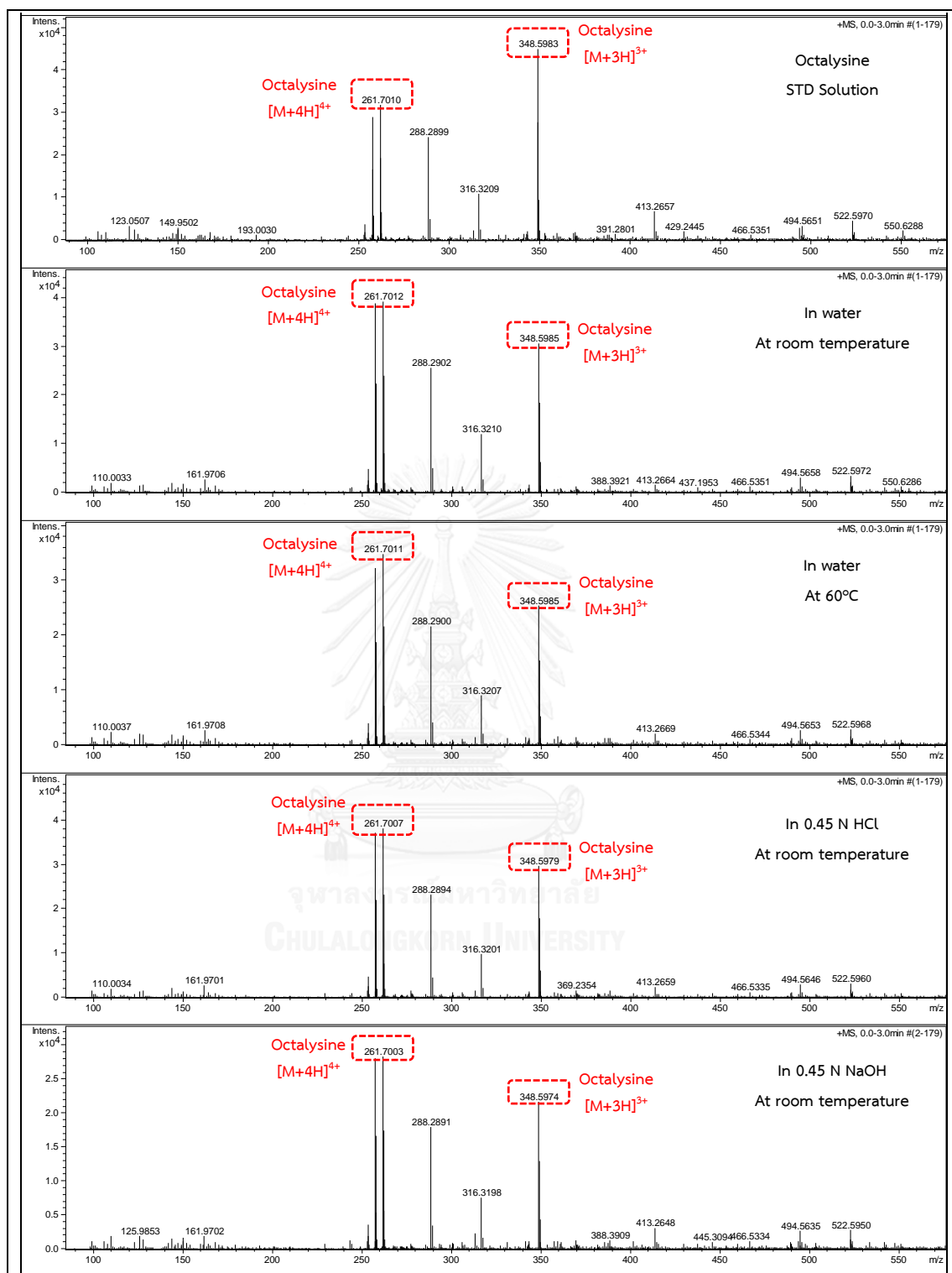


Figure 21: Mass spectra from the stability study of octalysine

Reaction between octalysine and ceftriaxone

According to the preliminary experiment on the reaction between monolysine and ceftriaxone, the reaction was performed under alkaline condition. A molecule of octalysine has nine amino groups (Figure 20) that could be involved in this proposed reaction. Octalysine and ceftriaxone with a mole ratio of 1:10 was dissolved in a 0.1 N sodium hydroxide solution. The reaction was performed at room temperature for an hour and monitored with a mass spectrometer and TLC (silica gel 60 F₂₅₄) using a mixture of water : methanol : ethyl acetate : ammonia solution (0.5:1:1.5:0.05) as a developing solvent.

From TLC result, the reaction mixture showed a new UV-absorbed spot at the origin ($R_f = 0$), while neither the octalysine standard/control solutions nor the ceftriaxone standard/control solutions did. The result is shown in Figure 22. For the MS result, the signal of ceftriaxone decreased over time while the signal of octalysine could not be detected after 15 minutes. All the results suggested that the reaction between octalysine and ceftriaxone proceeded, and all octalysine was presumably consumed in the reaction. However, the signal of conjugated molecules could not be detected by mass spectrometer in both positive and negative modes in this experiment. This might be caused by a low ability to ionize in an ion source, or to fly-through mass analyzer of molecular ions in the conjugated molecules.

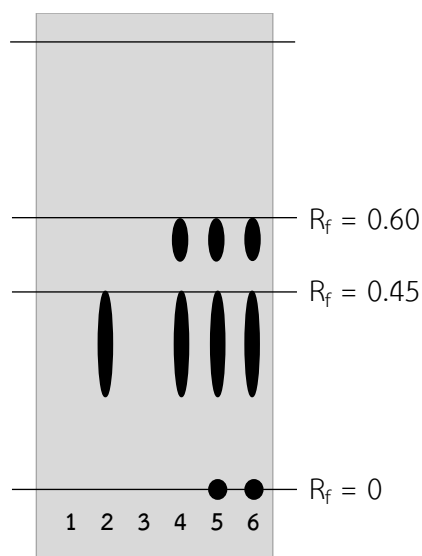


Figure 22: TLC result from octalysine-ceftriaxone conjugate reaction. 1) octalysine standard solution; 2) ceftriaxone standard solution; 3) octalysine control solution; 4) ceftriaxone control solution; 5) reaction solution; and 6) co-spot. For octalysine standard and octalysine control solutions, a stained spot at origin was obtained after sprayed with ninhydrin solution.

At first, a conjugate reaction was performed using a mole ratio of 1:10 for octalysine and ceftriaxone. It was expected to result in a high stoichiometry of ceftriaxone on octalysine. However, we were unable to detect this by mass spectrometer. These phenomena could be due to the low ability to ionize or to fly. The mole ratio of octalysine and ceftriaxone in reaction was reduced to 1:2. Octalysine and ceftriaxone were dissolved in a 0.1 N sodium hydroxide solution. The solution was stirred at room temperature, maintained at a pH of about 11, and monitored by TLC and MS.

The reaction mixture gave a UV-absorbed spot at the origin on TLC, which was not the same R_f with octalysine or ceftriaxone. Moreover, the MS result demonstrated a signal of conjugated products between octalysine and ceftriaxone in the ratios of 1:1, 1:2,

and 1:3 (Figure 23). The molecular weight of the 1:1, 1:2 and 1:3 conjugated molecules are 1438.81, 1834.23, and 2229.65, respectively.

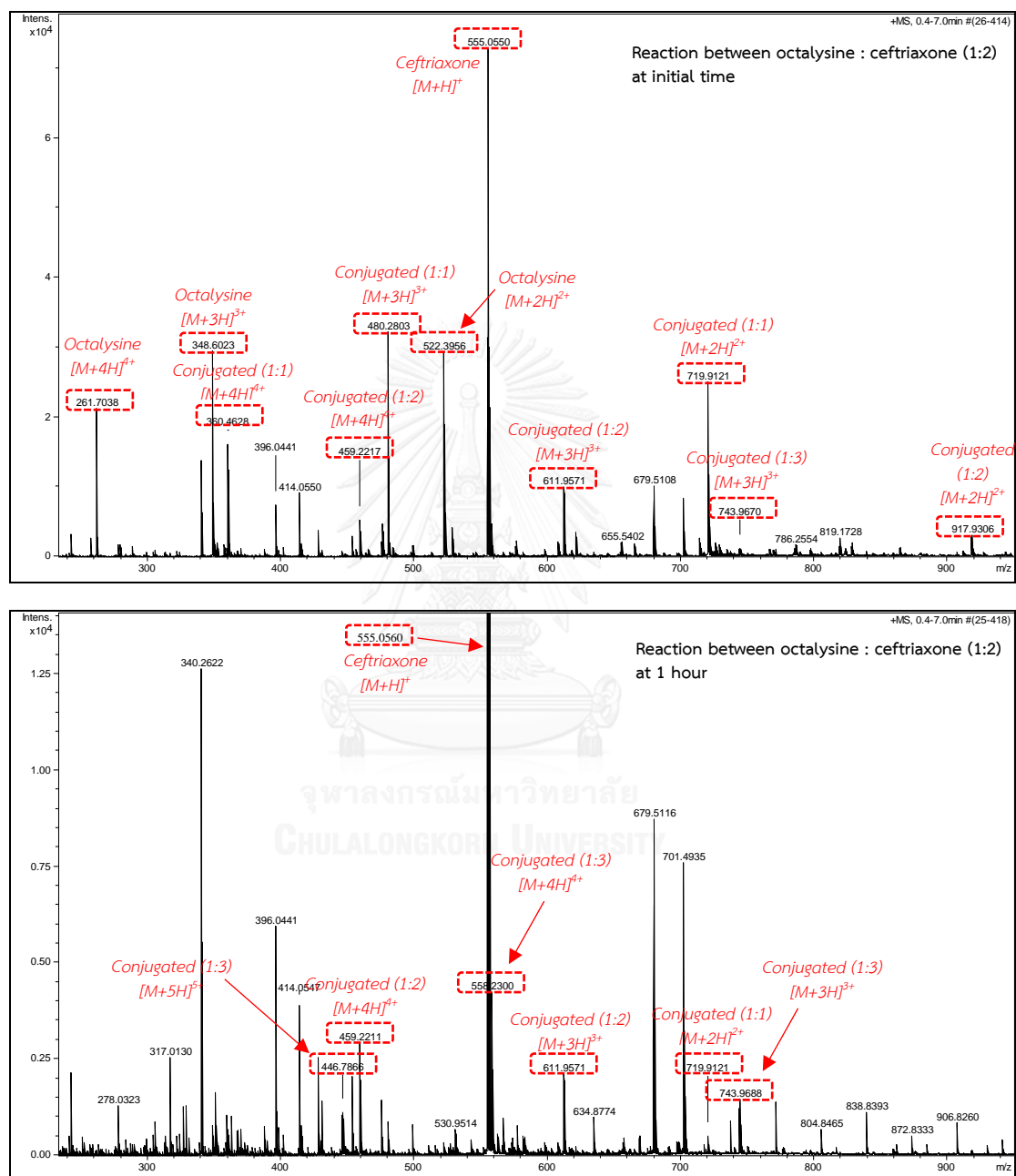


Figure 23: Mass spectra from the reaction between octalysine and ceftriaxone (1:2) that performed in alkaline condition at room temperature

The conjugate was cleaned up using column chromatographics. Mass spectrum of the octalysine-ceftriaxone conjugate after being cleaned up is shown in Figure 24. The majority of the molecular ratios of octalysine to ceftriaxone in conjugated products was 1:2. However, this procedure provided more than 99% purity of octalysine-ceftriaxone conjugate with an overall yield of 4.4%.

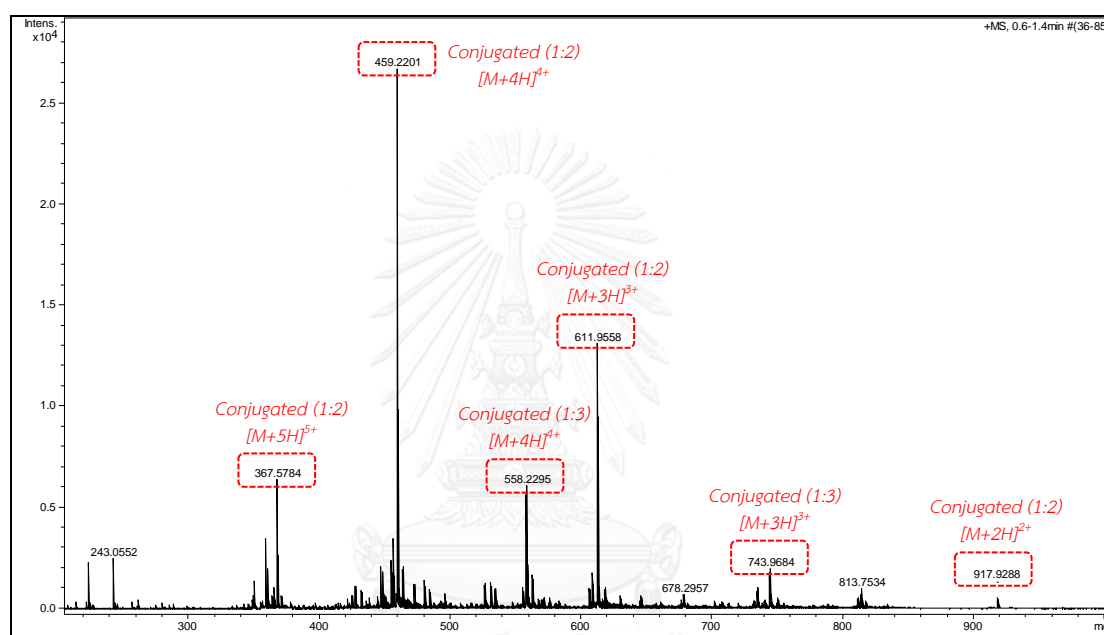


Figure 24: Mass spectrum from octalysine-ceftriaxone conjugate after cleaned up

The stoichiometry of octalysine and ceftriaxone in the synthesis reaction of octalysine-ceftriaxone conjugate was 1:2. This reaction provided the mixture for three conjugated products. The major conjugated product showed the stoichiometry of two ceftriaxones on octalysine. One or three ceftriaxones on octalysine were minor components in the mixture of conjugated products. Under our assumption, the position of the conjugation bond should not affect the immunogenicity of the conjugate. The position of lysines which formed the covalent bond with ceftriaxone in the conjugation reaction were not clarified.

As described in most studies, the β -lactam ring of cephalosporins can open by nucleophilic attack of either proteins or peptides. This generates a conjugated molecule termed a cephalosporoyl derivative even though several studies have proposed that the cephalosporoyl derivative is chemically unstable and undergoes a process of multiple fragmentations in the dihydrothiazine ring.^(22, 38, 39) On the other hand, an octalysine-ceftriaxone conjugate, a cephalosporoyl derivative, was successfully synthesized in our study.

STRUCTURE CONFIRMATION OF TESTED COMPOUNDS

The tested compounds confirmed their chemical structures using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high resolution mass spectrometry (HRMS) techniques. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD spectrometer at 500 MHz. All chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm). Mass spectra were recorded on a Bruker micrOTOF-Q II mass spectrometer with an electrospray ionization ion source (ESI-Q-TOF) in positive mode. The results are shown below.

Ceftriaxone

^1H NMR⁽⁵¹⁾ (500 MHz, D_2O): δ 3.36 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.62 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.94 (d, $J=13.5\text{Hz}$, 1H), 4.23 (d, $J=13.5\text{Hz}$, 1H), 5.08 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 5.66 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H), 6.89 (s, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, D_2O): δ 26.53, 33.68, 42.68, 57.19, 58.68, 62.67, 113.40, 119.17, 130.33, 140.39, 148.05, 156.71, 160.59, 163.66, 164.37, 164.86, 168.59, 170.91. Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_3$. HRMS (ESI): m/z 555.0535 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Cefotaxime

^1H NMR⁽⁵⁰⁾ (500 MHz, D_2O): δ 1.99 (s, 3H), 3.29 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3.56 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3.88 (s, 3H), 4.61 (d, $J=12.5\text{Hz}$, 1H), 4.78 (d, $J=12.5\text{Hz}$, 1H), 5.10 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H), 5.71 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 6.90 (s, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, D_2O): δ 20.31, 25.68, 57.19, 58.82, 62.73, 64.17, 113.26, 116.33, 131.51, 140.00, 147.78, 163.84, 164.69, 168.40, 170.88, 174.10. Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$. HRMS (ESI): m/z 456.0656 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Cefepime

^1H NMR⁽⁵²⁾ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.03-2.10 (m, 4H), 2.93 (s, 3H), 3.41-3.44 (m, 2H), 3.58-3.63 (m, 2H), 3.66 (d, $J=17\text{Hz}$, 1H), 3.91 (s, 3H), 4.04 (d, $J=17.5\text{Hz}$, 1H), 4.33 (d, $J=13.5\text{Hz}$, 1H), 4.59 (d, $J=13.5\text{Hz}$, 1H), 5.33 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H), 5.87 (dd, $J=5, 8\text{Hz}$, 1H), 6.88 (s, 1H), 9.83 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H). Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$. HRMS (ESI): m/z 481.1318 ($[\text{M}]^+$).

Cefpirome

^1H NMR⁽⁵³⁾ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.19-2.27 (m, 2H), 3.07-3.12 (m, 2H), 3.36-3.38 (m, 2H), 3.41 (d, $J=17.5\text{Hz}$, 2H), 3.79 (s, 3H), 5.02 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 5.18 (d, $J=14\text{Hz}$, 1H), 5.45 (d, $J=14\text{Hz}$, 1H), 5.63 (dd, $J=4.5, 8\text{Hz}$, 1H), 6.70 (s, 1H), 7.19 (s, 2H), 7.88 (t, $J=7\text{Hz}$, 1H), 8.33 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 9.28 (d, $J=6\text{Hz}$, 1H), 9.51 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H). Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$. HRMS (ESI): m/z 515.1153 ($[\text{M}]^+$).

Ceftazidime

^1H NMR⁽⁵⁴⁾ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.38 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 3.10 (d, $J=17.5\text{Hz}$, 1H), 3.51 (d, $J=17.5\text{Hz}$, 1H), 5.07 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 5.20 (d, $J=13.5\text{Hz}$, 1H), 5.65 (d, $J=13\text{Hz}$, 1H), 5.72 (dd, $J=5, 7.5\text{Hz}$, 1H), 6.68 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 8.12 (t, $J=7\text{Hz}$, 2H), 8.55 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 9.41 (d, $J=6\text{Hz}$, 2H), 9.81 (s, 1H). Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$. HRMS (ESI): m/z 547.1055 ($[\text{M}]^+$).

Cefoperazone

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.07 (t, $J=7\text{Hz}$, 3H), 3.51-3.55 (m, 4H), 3.65 (d, $J=18\text{Hz}$, 2H), 3.87-3.91 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 4.18-4.32 (dd, $J=13.5, 56.5\text{Hz}$, 2H), 4.98 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 5.47 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 5.71 (dd, $J=4.5, 8\text{Hz}$, 1H), 6.71 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.20 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 9.33 (d, $J=9.5\text{Hz}$, 1H), 9.44 (s, 1H), 9.70 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H). Formula: $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_9\text{O}_8\text{S}_2$. HRMS (ESI): m/z 646.1480 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

7-Aminodesacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.96 (s, 3H), 3.28 (d, $J=17\text{Hz}$, 1H), 3.54 (d, $J=17\text{Hz}$, 1H), 4.68 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H), 4.90 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 19.36, 28.39, 58.49, 63.30, 122.82, 127.78, 163.81, 169.52. Formula: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. HRMS (ESI): m/z 215.0483 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 237.0308 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

2-Amino- α -(methoxyimino)-4-thiazoleacetic acid (MTTA)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3.84 (s, 3H), 6.84 (s, 1H), 7.24 (s, 2H). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 62.25, 108.32, 141.41, 148.19, 163.86, 168.78. Formula: $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$. HRMS (ESI): m/z 202.0288 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Tetrahydro-2-methyl-3-thioxo-1,2,4-triazine-5,6-dione (TMTD)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3.63 (s, 3H), 12.42 (s, 1H), 13.00 (s, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 44.18, 150.15, 152.59, 169.83. Formula: $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$. HRMS (ESI): m/z 160.0187 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Desacetylcefotaxime

^1H NMR⁽⁵⁰⁾ (500 MHz, D_2O): δ 3.36 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3.56 (d, $J=17.5\text{Hz}$, 1H), 3.88 (s, 3H), 4.16 (dd, $J=13, 20\text{Hz}$, 2H), 5.10 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 5.68 (d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 6.91 (s, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, D_2O): δ 25.58, 57.21, 58.67, 61.01, 62.68, 113.44, 121.28, 129.50, 140.36, 148.08, 163.88, 164.92, 169.01, 170.97. Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$. HRMS (ESI): m/z 414.0535 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Desacetylcefotaxime lactone

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3.78 (d, $J=7\text{Hz}$, 2H), 3.84 (s, 3H), 5.04 (s, 2H), 5.15 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H), 5.92 (dd, $J=5, 8.5\text{Hz}$, 1H), 6.74 (s, 1H), 7.21 (s, 2H), 9.67 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 22.54, 57.38, 59.19, 61.86, 71.36, 108.75, 122.72, 142.44,

142.46, 148.92, 162.92, 163.05, 166.45, 168.36. Formula: $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$. HRMS (ESI): m/z 396.0424 ($[M+H]^+$).

Octalysine-ceftriaxone conjugated

Octalysine-ceftriaxone conjugated (1:2) Formula: $C_{76}H_{124}N_{26}O_{19}S_4$. HRMS (ESI): m/z 917.9288 ($[M+2H]^{2+}$), m/z 611.9558 ($[M+3H]^{3+}$), m/z 459.2201 ($[M+4H]^{4+}$), m/z 367.5784 ($[M+5H]^{5+}$). Octalysine-ceftriaxone conjugated (1:3) Formula: $C_{90}H_{137}N_{31}O_{24}S_6$. HRMS (ESI): m/z 743.9684 ($[M+3H]^{3+}$), m/z 558.2295 ($[M+4H]^{4+}$).

PURITY DETERMINATION OF TESTED COMPOUNDS

Purity of tested compounds

The purity of all tested compounds was determined using the HPLC/PDA. All tested compounds were prepared with a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. The peak purity values were considered using the PDA that was operated in the wavelength range from 200 to 800 nm. The percentage of area responses from the specific wavelength was reported as chromatographic purity of the tested compound. In addition, to determine the purity of the octalysine-ceftriaxone conjugated product, a by-product of free octalysine, an unreacted octalysine in a conjugated compound, was quantified. Octalysine does not have a chromophore, therefore it is not detectable by HPLC/PDA; therefore, the HPLC/MS method was used. The purity of the octalysine-ceftriaxone conjugate was considered using the HPLC/PDA result for the peak of conjugate, together with the HPLC/MS result for free octalysine. The purity value of all tested compounds is shown in Table 3.

Table 3: Chromatographic purity of tested compounds

Compound Name	Peak Purity ^(A) (%)	Chromatographic Purity (%)		
		Wavelength (nm)	Area (%)	Average of %Area
Ceftriaxone	1.00000	240	98.34	98.3
	1.00000		98.35	
	1.00000		98.31	
Cefotaxime	1.00000	235	99.60	99.6
	1.00000		99.59	
	1.00000		99.62	
Cefepime	1.00000	235	99.42	99.4
	1.00000		99.44	
	1.00000		99.36	
Cefpirome	1.00000	265	97.13	97.1
	1.00000		97.13	
	1.00000		97.14	
Ceftazidime	1.00000	255	99.29	99.3
	1.00000		99.28	
	1.00000		99.29	
Cefoperazone	1.00000	230	98.78	98.7
	1.00000		98.77	
	1.00000		98.69	
7-ADCA	1.00000	265	100.00	100.0
	1.00000		100.00	
	1.00000		100.00	
MTTA	1.00000	235	100.00	100.0
	1.00000		100.00	
	1.00000		100.00	

Compound Name	Peak Purity ^(A) (%)	Chromatographic Purity (%)		
		Wavelength (nm)	Area (%)	Average of %Area
TMTD	1.00000	278	100.00	100.0
	1.00000		100.00	
	1.00000		100.00	
Desacetylcefotaxime	1.00000	235	96.78	96.6
	1.00000		96.65	
	1.00000		96.26	
Desacetylcefotaxime lactone	1.00000	235	97.69	97.6
	1.00000		97.53	
	1.00000		97.53	
Octalysine- ceftriaxone conjugate	1.00000	205	100.00	> 99 ^(B)
	1.00000		100.00	
	1.00000		100.00	

^(A)The peak purity values were considered using the PDA in the wavelength range of 200-800 nm; ^(B)This value was considered using HPLC/PDA result for conjugate together with HPLC/MS result for free octalysine. The analytical value of free octalysine in octalysine-ceftriaxone conjugate was lower than 0.9%.

HPLC/MS method for determination of free octalysine

According to the purity control of the conjugate, free octalysine, an unreacted octalysine, was determined. The HPLC/MS method was established for determining free octalysine in the octalysine-ceftriaxone conjugated product. The method was tested for selectivity, sensitivity, carry over, linearity, accuracy, and precision prior to use.

Selectivity

Molecular ions of octalysine were monitored using a selected ion monitoring (SIM) mode. Quantification was achieved by monitoring the ions at m/z of 261.6998. The selectivity test demonstrates that our method was able to differentiate octalysine from any interference. This was proved by analyzing a blank sample and a standard solution. There was no interference peak at the retention time of the octalysine in the blank sample. The chromatogram is shown in Figure 25. This method was found to be selective.

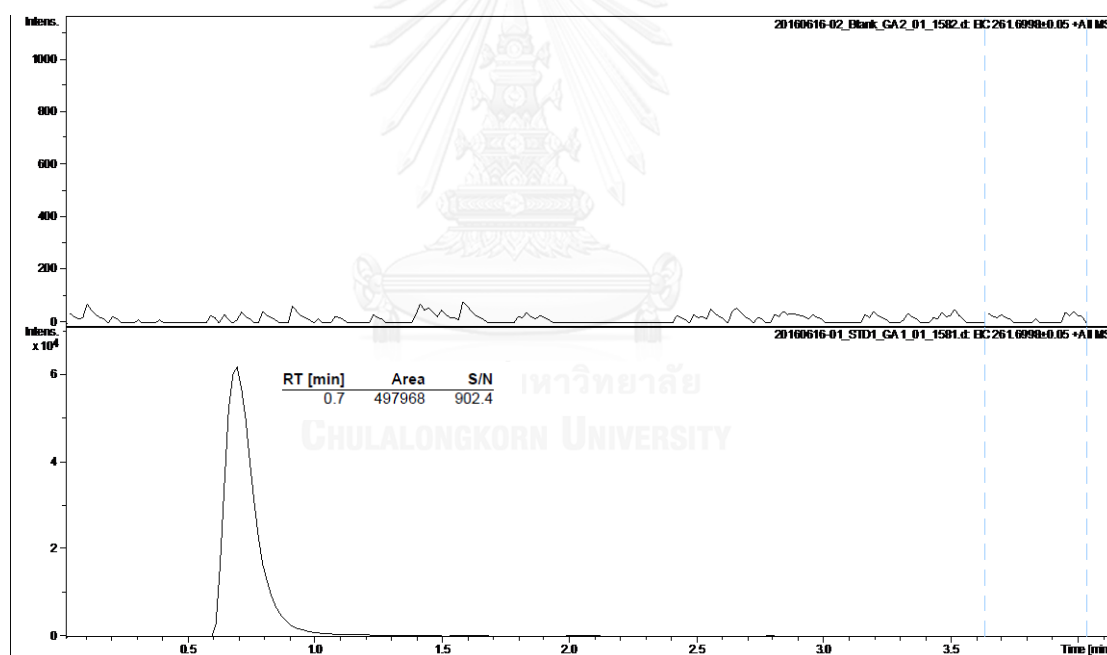


Figure 25: HPLC/MS chromatograms of blank sample (upper) and octalysine standard solution at lowest concentration of calibration curve (lower)

Sensitivity

LOD and LOQ values were obtained from a calibration curve which covered the range of 1.047-5.235 $\mu\text{g/mL}$. The LOD and LOQ were determined as $3.3 \sigma/S$ and $10 \sigma/S$, respectively. This method gave LOD and LOQ values of 0.339 and 1.047 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Carry over

The blank sample was injected after the six replicates of octalysine standard solution, at the highest concentration of the calibration curve (5.235 $\mu\text{g/mL}$).⁽⁵⁵⁾ The result showed no integrated peak, which agrees with the retention time of octalysine. The method showed no carry over.

Linearity and range

Linearity and range describes the relationship between the instrument responses with regard to the concentration of analyte over a specified concentration range. These were determined by analyzing the standard solutions of five concentrations in the range of 1.047-5.235 $\mu\text{g/mL}$. The backed calculated concentration of the standard solutions should be within 80-115% of the nominal concentration, except for the lowest concentration which should be within 75-120%.⁽⁵⁶⁾ The coefficient of determination (r^2) value should be greater than 0.99.⁽⁵⁶⁾ This method showed linearity over the range of 1.047-5.235 $\mu\text{g/mL}$. The linear regression is described as the equation

of $y = 666,192.5711(x) - 209,878.2333$ with an r^2 value of 0.9968. Analytical data are shown in Figure 26 and Table 4.

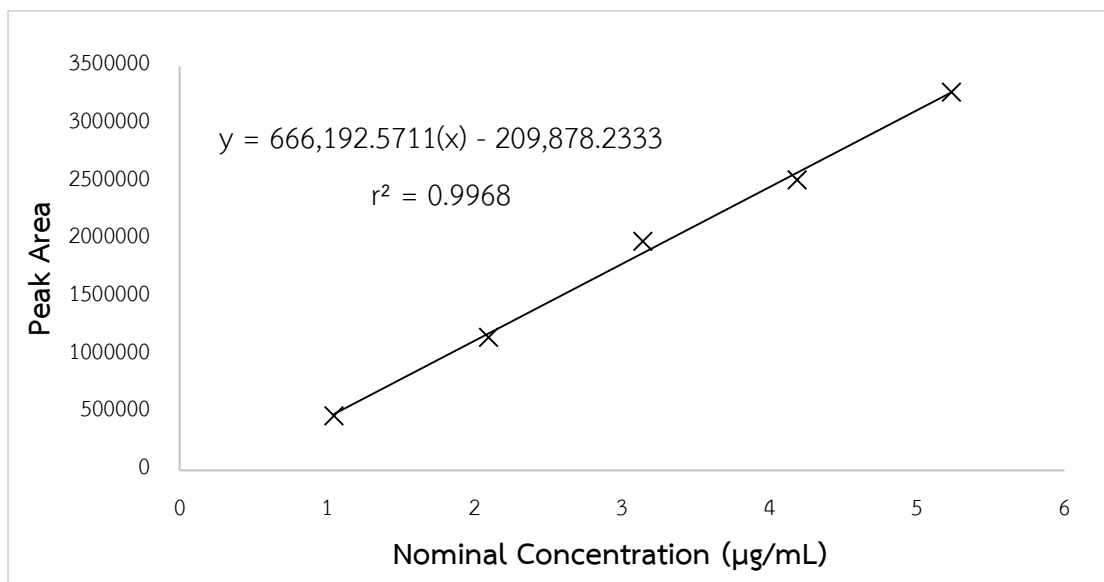


Figure 26: Linear regression of HPLC/MS method for determination of free octalysine

Table 4: Linearity and range of HPLC/MS method for determination of free octalysine

Nominal Concentration (µg/mL)	Peak Area	Average	Back Calculated Concentration (µg/mL)	Accuracy (%)
1.047	470034	473736	1.026	98
	474510			
	476664			
2.094	1158670	1155112	2.049	98
	1128418			
	1178249			
3.141	1982088	1986048	3.296	105
	1987103			
	1988954			
4.188	2431266	2518593	4.096	98
	2564602			
	2559910			
5.235	3291215	3279434	5.238	100
	3299023			
	3248064			

Accuracy and precision

Accuracy and precision were determined by analyzing the standard solutions containing a known amount of octalysine representing the entire range of the calibration curve. Three samples at each concentration level (3 concentration levels) were analyzed for three replicated injections. The obtained concentration of the standard solutions should be within 80-115% of the nominal concentration, except for the lowest concentration which should be within 75-120%.⁽⁵⁶⁾ The precision of the standard solutions, expressed as the coefficient of variation (CV), should not exceed 6%, except for the lowest concentration which should not exceed 8%.⁽⁵⁶⁾ This method showed accuracy and precision (%CV) with values of 89-107% and 2-8%, respectively. All results are shown in Table 5.

Table 5: Accuracy and precision of HPLC/MS method for determination of free octalysine

Nominal Concentration (µg/mL)	Sample	Average Peak Area	Obtained Concentration (µg/mL)	Accuracy (%)	CV (%)
1.047	A	493052	1.055	101	8
	B	408718	0.929	89	
	C	512732	1.085	104	
3.141	A	2030775	3.363	107	4
	B	2005821	3.326	106	
	C	1884791	3.144	100	
5.235	A	3080205	4.939	94	2
	B	3167614	5.070	97	
	C	3049606	4.893	93	

Determination of free octalysine in a conjugated compound

Octalysine was used as a reactant in the synthesis of an octalysine-ceftriaxone conjugate. It is possible that some amounts of the unreacted octalysine may remain mixed with the conjugated product. In order to determine the purity of the conjugate, the amount of free octalysine needed to be determined. In order to determine the amount of free octalysine, an HPLC/MS method was established. The selectivity, sensitivity, carry over, linearity, accuracy, and precision of our method was evaluated prior to use. Our method showed selectivity and no carry over. In addition, the method also provided accurate and precise results over the range of 1.047-5.235 $\mu\text{g/mL}$ for free octalysine. LOD and LOQ values of this method were 0.339 and 1.047 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

An octalysine-ceftriaxone conjugate was prepared for three samples with a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. Each sample was analyzed for three replicated injections. The amount of free octalysine in the conjugate was calculated using a calibration curve with the equation for linear regression of $y = 666,192.5711(x) - 209,878.2333$.

The results showed that the concentration of free octalysine in the conjugate was below the LOQ of the developed method (below 1.047 $\mu\text{g/mL}$). An analytical result is shown in Table 6. Eventually, the amount of free octalysine in the conjugate was determined to be below 0.9%.

Table 6: Determination of free octalysine in octalysine-ceftriaxone conjugate

Nominal Concentration of Conjugate ($\mu\text{g/mL}$)	Sample	Average Peak Area	Obtained Concentration of Free Octalysine ($\mu\text{g/mL}$)	Found Amount of Free Octalysine (%)
116.000	A	16107	Below LOQ * (0.339)	
	B	13073	Below LOQ * (0.335)	Below 0.9 **
	C	13583	Below LOQ * (0.335)	

*LOQ of this method was 1.047 $\mu\text{g/mL}$; **Calculated based on the LOQ value



IMMUNOGENICITY SCREENING OF TESTED COMPOUNDS

Biological samples

According to a review of penicillins allergy by Bhattacharya⁽⁵⁷⁾, the author reports that about 90% of patients with a history of allergy to penicillins and other β -lactam antibiotics are not truly allergic. Ceftriaxone is a drug commonly reported to cause allergic reactions; nevertheless, they might not be true allergic reactions. Ceftriaxone is widely used. It is the recommended antibiotic for inpatients and as prophylaxis for a number of surgeries.^(58, 59) There are many chances to be misled that some adverse reactions are allergic reactions. For instance, intravenous (IV) injection of ceftriaxone with a high infusion rate can initiate some adverse reactions. These might be mistakenly recognized as allergic reactions, and although the number of patients who are truly allergic to ceftriaxone may be low, the severity must be taken into account. The studies to gain insight into allergic reactions against cephalosporin are interesting.

All allergic samples were obtained from the retained PBMC in a study with the title of “*In vitro* investigation to study cross-reactivity reactions to third generation cephalosporins in patients with a history of beta-lactam allergy” (Certificate of approval No. 523/2014, IRB No. 251/57, Approval date: August 7, 2014). Firstly, we planned to evaluate the immunogenicity of tested compounds by using the PBMC from ten allergic subjects with a history of ceftriaxone allergy. Unfortunately, due to a lack of allergic subject, this study obtained PBMC from only three ceftriaxone allergic subjects. Even more, one of these subjects had a history of SLE and kidney disease, PBMC ID P01, while another one had a history of multiple drug allergies, PBMC ID P03. The allergic

samples were obtained from a male and two females in the age range of 25 to 44 years.

Control samples were obtained from ten control subjects without a history of allergic responses against β -lactam antibiotics. The control samples were obtained from seven females and three males in the age range of 29 to 43 years (Certificate of approval No. 630/2015, IRB No. 131/58, Approval date: September 17, 2015). PBMC were separated from whole blood and kept frozen in liquid nitrogen until use.

Selection of the optimal concentration of tested compounds

According to the literature review, the tested compounds, small molecules, were used under various concentrations. Therefore, an initial experiment was performed to choose the optimal concentration of tested compounds that is enough to stimulate the IFN- γ secretion in an allergic sample and to keep cells alive. PBMC from allergic subjects were tested with various concentrations of tested compounds. The results showed that the optimal concentration for all tested compounds, except for an octalysine-ceftriaxone conjugate, in this study was 400 μ M.

There were two ideas to prepare the concentration of an octalysine-ceftriaxone conjugated compound. First idea, the prepared concentration based on whole molecules of conjugate. It was prepared with a concentration of 5 μ M of conjugate (about 10 μ g/mL of conjugate⁽⁶⁰⁻⁶²⁾). The other was based on ceftriaxone molecules on a conjugated compound. It was prepared with a concentration of 200 μ M of conjugate (equivalent to 400 μ M of ceftriaxone). PBMC from an allergic subject was tested with

both conceptual concentrations. The result showed IFN- γ secretion in the conjugate that was prepared with the first idea, 5 μ M of conjugate. The IFN- γ secretion was not observed in the conjugate that was prepared with the second idea, 200 μ M of conjugate. The different result might be due to cell death under the high concentration of conjugate. Therefore, a 5 μ M of octalysine-ceftriaxone conjugate, approximately equivalent to 10 μ M of ceftriaxone, was selected in this study.

Evaluation of the non-specific response in the ELISPOT IFN- γ assay

In order to define the cut-off values for the IFN- γ secretion from PBMC, values greater than two standard deviations (2SD), approximately a 95% of normally distributed, of the mean values of the responses in ten control subjects were defined as positive responses.

Tested compounds were evaluated for a nonspecific response in the absence or presence of PBMC from control subjects. All of test compounds were not generated the fault positive response in the absence of PBMC. In the present of PBMC from ten control subjects, it might be found a positive response, which showed response over the 95% of normally distributed, in some tested compounds.

ELISPOT IFN- γ assay

Immunogenicity of the tested compounds was studied using PBMC obtained from three allergic subjects with a history of ceftriaxone allergy. The results were shown in Table 7. All three samples obtained from the allergic subjects gave positive responses to ceftriaxone. There was no positive response to ceftriaxone in all control samples

obtained from the ten control subjects. This method obviously showed the sensitivity to differentiate the IFN- γ secretion between the PBMC obtained from subjects with a history of ceftriaxone allergy, and control subjects with no history of ceftriaxone allergy.

PBMC from allergic subjects showed three positive responses to cefotaxime, cefepime, and ceftazidime. These three cephalosporins share an identical R₁ side chain, 2-amino- α -(methoxyimino)-4-thiazoleacetyl group, with ceftriaxone. There were two positive responses to 7-ADCA and MTTA, the cephalosporin ring nucleus and R₁ side chain moiety, respectively. The results implied that the ring nucleus together with an R₁ side chain could play a role in the immune recognition in ceftriaxone allergy more than the ring nucleus or R₁ side chain alone.

From the above results, three cephalosporins, cefotaxime, cefepime, and ceftazidime, that contain 2-amino- α -(methoxyimino)-4-thiazoleacetyl group, showed positive responses in all ceftriaxone allergic samples. However, allergic responses with desacetylcefotaxime and desacetylcefotaxime lactone, the degradation products that contained the identical R₁ side chain to ceftriaxone, were not detected. There were only two positive responses. This result may be explained in that this allergic mechanism depends on the hapten theory. Due to the lack of a good leaving group at C3, the activity of the β -lactam ring in both degradation products is less than in cephalosporins. So, the ability to conjugate with macromolecules to provide an antigenic determinant was difficult.

Ceftazidime, containing a similar R₁ side chain to ceftriaxone (Figure 27), elicited only two positive responses. These positive responses might be caused by a cross reaction

between the R_1 side chain of ceftriaxone and ceftazidime. However, from PBMC ID P03 obtained from multiple drug allergy subjects, the positive from PBMC ID P03 might be caused by multiple drug allergies.

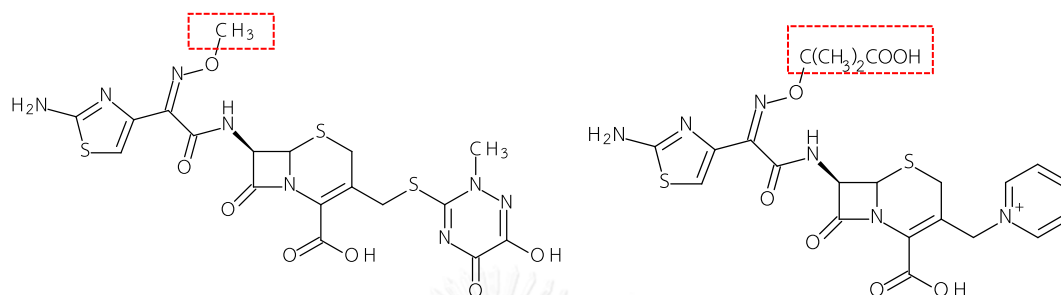


Figure 27: Chemical structures of ceftriaxone (left) and ceftazidime (right). These compounds share the similar R_1 side chain. The R_1 side chain of ceftazidime present two methyl groups and a carboxylic group which were not present in the R_1 side chain of ceftriaxone. The different part of their R_1 side chain were shown in boxes.

Cefoperazone, containing a different R_1 side chain from ceftriaxone (Figure 28), also elicited two positive responses. One of the positive responses was from PBMC ID P03, which might be caused by multiple drug allergies. The other one was from PBMC ID P01. Moreover, the PBMC ID P01 also showed a positive response to 7-ADCA. These results may suggest that this subject might be allergic to cefoperazone or truly allergic to bicyclic β -lactam core.

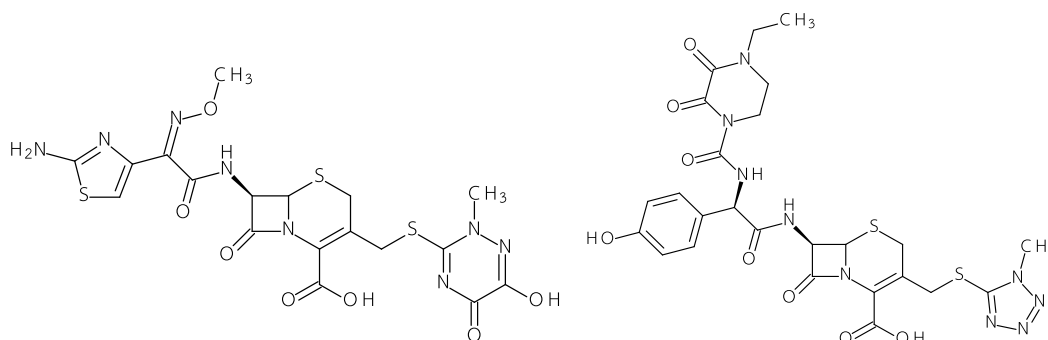


Figure 28: Chemical structures of ceftriaxone (left) and cefoperazone (right)

An octalysine-ceftriaxone conjugate contained two moieties, representing ceftriaxone which was the cephalosporoyl group. Five μM of the conjugate gave positive responses in PBMC from all tested subjects with a history of ceftriaxone allergy. The result implied that octalysine conjugate can enhance the ELISPOT response for a ceftriaxone allergy. Interestingly, without intact β -lactam as a cephalosporin core structure, octalysine-ceftriaxone conjugate demonstrated all positive results. Therefore, the result suggested that the R_1 side chain may be involved in the allergic reaction.

The results of other tested compounds cannot be deduced from the data due to limitations on the number of allergic samples. In addition, the size of the population was small, with an immune disease in one subject, and multiple drug allergies in the other. However, the ELISPOT method in this study showed a sensitivity to diagnosing ceftriaxone allergy. This method can differentiate the response to ceftriaxone between PBMC from a ceftriaxone allergic subject, and PBMC from the control subject. Our result suggested that the ring nucleus together with the R_1 side chain, rather than the ring nucleus or R_1 side chain alone, could play a role in ceftriaxone allergy. According to the ELISPOT result of two degradation products, we hypothesize that the hapten

theory can account for our observations. Furthermore, we found that the octalysine conjugate can enhance the ELISPOT response.

However, a greater population of PBMC obtained from ceftriaxone allergic subjects, without other factors related to allergic reaction, is needed for further study to reveal the strong relationship between the structure and immunogenicity of ceftriaxone.



Table 7: Result of ELISPOT IFN- γ assay

Tested compounds				
PBMC ID And PBMC amount	History of drug allergy	Disease		
P01 2.5 x 10 ⁵ cells/well	Ceftriaxone	SLE, Kidney disease	Octalysine - ceftriaxone conjugate	+
			Desacetylcefotaxime lactone	-
			Desacetylcefotaxime	+
			TMTD	-
			MTTA	+
			7-ADCA	+
			Cefoperazone	+
			Ceftazidime	-
			Cefpirome	+
			Cefepime	+
			Cefotaxime	+
			Ceftriaxone	+
P02 2.5 x 10 ⁵ cells/well	Ceftriaxone	N/A	Octalysine - ceftriaxone conjugate	+
			Desacetylcefotaxime lactone	+
			Desacetylcefotaxime	-
P03 2.5 x 10 ⁵ cells/well	Ceftriaxone, Penicillin G, Tazocin	N/A	Octalysine - ceftriaxone conjugate	* N/A
			Desacetylcefotaxime lactone	+
			Desacetylcefotaxime	+

* Not done, "+ " = Positive response, "- " = Negative response

CHAPTER V CONCLUSION

Twelve tested compounds were selected and prepared in this study. Two designed degradation compounds and an octalysine conjugate of ceftriaxone were successfully synthesized. A structure and purity of greater than 95% of all tested compounds were elucidated and determined prior to their immunogenicity evaluation. The interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT IFN- γ) results suggested that the ring nucleus together with the R₁ side chain, rather than the ring nucleus or R₁ side chain alone, could play a role in ceftriaxone allergy. The hapten theory could explain the ELISPOT results of two degradation products containing both β -lactam moiety and R₁ side chain. Furthermore, we found that octalysine conjugate can enhance the ELISPOT response.

One of the difficulties encountered during this work was the lack of PBMC from ceftriaxone allergic subjects. We could only obtain three allergic samples from truly ceftriaxone allergic subjects. However, a greater population of PBMC obtained from ceftriaxone allergic subjects, without other factors related to allergic reactions, is needed for further study.

REFERENCES

1. Hoffman-Terry ML, Fraimow HS, Fox TR, Swift BG, Wolf JE. Adverse effects of outpatient parenteral antibiotic therapy. *The American journal of medicine.* 1999;106(1):44-9.
2. Dancer SJ. The problem with cephalosporins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2001;48(4):463-78.
3. นฤมล ชนะ ภ.ม., โกวิทย์ จงเจริญประเสริฐ ภ.ม. Adverse Drug Reaction Report : ประสบการณ์ในโรงพยาบาลศิริราช 2545-2547. *Siriraj Medical Journal.* 2005;57(6):235-40.
4. Le J, Nguyen T, Law AV, Hodding J. Adverse Drug Reactions Among Children Over a 10-Year Period. *Pediatrics.* 2006;118(2):555-62.
5. ศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ กองแผนงานและวิชาการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. สรุปรายงานอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาประจำปี 2554. 2011.
6. Qing-Ping S, Xiao-Dong J, Feng D, Mei-Ling Y, Shu-Qiang Z. Adverse Drug Reactions and Pattern Use of Cephalosporins: A Retrospective Review of Hospitalized Patients During 5 Years. *International Journal of Pharmacology.* 2013;9(1):66-73.
7. Satta G, Hill V, Lanzman M, Balakrishnan I. β -lactam allergy: clinical implications and costs. *Clinical and Molecular Allergy.* 2013;11(1):2.
8. Blanca M, Vega JM, Garcia J, Miranda A, Carmona MJ, Juarez C, et al. New aspects of allergic reactions to betalactams: crossreactions and unique specificities. *Clinical & Experimental Allergy.* 1994;24(5):407-15.

9. Baldo BA. Penicillins and cephalosporins as allergens-structural aspects of recognition and cross-reactions. *Clinical And Experimental Allergy: Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology*. 1999;29(6):744-9.
10. Frew A. General principles of investigating and managing drug allergy. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;71(5):642-6.
11. Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *The Journal of Experimental Medicine*. 1935;61(5):643-56.
12. Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. II. *The Journal of Experimental Medicine*. 1936;64(4):625-39.
13. Eisen HN, Orris L, Belman S. Elicitation of delayed allergic skin reactions with haptens; the dependence of elicitation on hapten combination with protein. *The Journal of Experimental Medicine*. 1952;95(5):473-87.
14. Eisen HN, Belmam S. Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. II. Reactions of some allergenic substituted dinitrobenzenes with cysteine or cystine of skin proteins. *The Journal of Experimental Medicine*. 1953;98(6):533-49.
15. Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. *Chemical research in toxicology*. 1998;11(9):969-88.
16. Perez-Inestrosa E, Suau R, Montañez MI, Rodriguez R, Mayorga C, Torres MJ, et al. Cephalosporin Chemical Reactivity and Its Immunological Implications. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2005;5(4):323-30.

17. Nolan RC, Puy R, Deckert K, O'Hehir RE, Douglass JA. Experience with a new commercial skin testing kit to identify IgE-mediated penicillin allergy. *Internal Medicine Journal*. 2008;38(5):357-61.
18. Demain AL, Elander RP. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999;75(1-2):5-19.
19. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the β -lactams. *Current Opinion in Microbiology*. 2010;13(5):551-7.
20. John M. Beale J. Chapter 8: Antibacterial Antibiotics. Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, 12th Edition. 2011:258-329.
21. Krimpen PC, Bennekom WP, Bult A. Penicillins and Cephalosporins. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*. 1987;9(1):1-23.
22. Moreno E, Macías E, Dávila I, Laffond E, Ruiz A, Lorente F. Hypersensitivity Reactions to Cephalosporins. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2008;7(3):295-304.
23. Dickson SD, Salazar KC. Diagnosis and management of immediate hypersensitivity reactions to cephalosporins. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2013;45(1):131-42.
24. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopoeia National Formulary 2016: USP 39 NF 34. 2016.
25. Ali AE. Synthesis, spectral, thermal and antimicrobial studies of some new tri metallic biologically active ceftriaxone complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;78(1):224-30.
26. Riedl MA, Casillas AM. Adverse drug reactions: types and treatment options. *American family physician*. 2003;68(9):1781-90.

27. Adam J, Pichler WJ, Yerly D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;71(5):701-7.
28. Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3 Suppl):S74-81.
29. Ariza A, Mayorga C, Fernandez TD, Barbero N, Martin-Serrano A, Perez-Sala D, et al. Hypersensitivity reactions to β -lactams: relevance of hapten-protein conjugates. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2015;25(1):12-25.
30. Li J, Uetrecht JP. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. *Handbook of experimental pharmacology*. 2010(196):493-509.
31. Pichler WJ. The p-i Concept: Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors. *World Allergy Organization Journal*. 2008;1(6):96-102.
32. White KD, Chung WH, Hung SI, Mallal S, Phillips EJ. Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(2):219-34; quiz 35.
33. Atanaskovic-Markovic M, Velickovic TC, Gavrovic-Jankulovic M, Vuckovic O, Nestorovic B. Immediate allergic reactions to cephalosporins and penicillins and their cross-reactivity in children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2005;16(4):341-7.
34. Antunez C, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Mayorga C, Perez-Inestrosa E, Montanez MI, et al. Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(2):404-10.

35. Romano A, Torres MJ, Di Fonso M, Leyva L, Andriolo M, Pettinato R, et al. Delayed hypersensitivity to cefazolin: report on a case involving lymphocyte transformation studies with different cephalosporins. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2001;87(3):238-42.
36. Romano A, Mayorga C, Torres MJ, Artesani MC, Suau R, Sánchez F, et al. Immediate allergic reactions to cephalosporins: Cross-reactivity and selective responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(6):1177-83.
37. Guéant J-L, Guéant-Rodriguez R-M, Viola M, Valluzzi RL, Romano A. IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(26):3335-45.
38. Sánchez-Sancho F, Perez-Inestrosa E, Suau R, Montañez MI, Mayorga C, Torres MJ, et al. Synthesis, Characterization and Immunochemical Evaluation of Cephalosporin Antigenic determinants. *Journal of Molecular Recognition*. 2003;16(3):148-56.
39. Montañez MI, Mayorga C, Torres MJ, Ariza A, Blanca M, Perez-Inestrosa E. Synthetic Approach to Gain Insight into Antigenic Determinants of Cephalosporins: In Vitro Studies of Chemical Structure–IgE Molecular Recognition Relationships. *Chemical research in toxicology*. 2011;24(5):706-17.
40. Brandriss MW, Smith JW, Steinman HG. Common Antigenic Determinants of Penicillin G, Cephalothin and 6-Aminopenicillanic Acid in Rabbits. *The Journal of Immunology*. 1965;94(5):696-704.
41. Batchelor FR, Dewdney JM, Weston RD, Wheeler AW. The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology*. 1966;10(1):21-33.

42. Uno K, Yamasaku F. Structural correlations with cross-reactivity of β -lactam antibiotics in delayed type hypersensitivity: Cross-allergenicity in hypersensitivity to cepheems with a tetrazolyl group in the C-3 side chain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1989;24(2):251-64.
43. Miranda A, Blanca M, Vega JM, Moreno F, Carmona MJ, Garcia JJ, et al. Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1996;98(3):671-7.
44. Pham NH, Baldo BA. β -Lactam drug allergens: Fine structural recognition patterns of cephalosporin-reactive IgE antibodies. *Journal of Molecular Recognition*. 1996;9(4):287-96.
45. Levine BB, Redmond AP. The nature of the antigen-antibody complexes initiating the specific wheal-and-flare reaction in sensitized man. *The Journal of clinical investigation*. 1968;47(3):556-67.
46. Levine BB. Method and composition for testing to predict and/or diagnose allergy to penicillins. United States Patent US4252784 (A) 19810224; 1981.
47. Zhao Z, Batley M, D'Ambrosio C, Baldo BA. In vitro reactivity of penicilloyl and penicillanyl albumin and polylysine conjugates with IgE-antibody. *Journal of immunological methods*. 2000;242(1-2):43-51.
48. Zajac M, Muszalska I. Mechanism of ceftriaxone degradation in aqueous solution. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 1998;55(1):35-9.
49. Fabre H, Eddine NH, Berge G. Degradation kinetics in aqueous solution of cefotaxime sodium, a third-generation cephalosporin. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1984;73(5):611-8.

50. Vilanova B, Muñoz F, Donoso J, Frau J, Blanco FG. Alkaline hydrolysis of cefotaxime. A HPLC and ¹H NMR study. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1994;83(3):322-7.
51. Yi S, Peng Z, Ning L, Wen L, Yu W. An NMR Study on Cephalosporins. *Chinese Journal of Magnetic Resonance*. 2007;24(3):347-52.
52. Jagadeesh Kumar V, Badarinadh Gupta P, Pavan Kumar KS, Prasada Rao KV, Rao KR, Prasanna SJ, et al. Identification and characterization of new degradation products of cefepime dihydrochloride monohydrate drug substance during stress stability studies. *Analytical Sciences*. 2010;26(10):1081-6.
53. Duan X, Lu Y, Han J, Chen L, Zheng P. One-Pot Synthesis of Cefpirome Sulfate from GCLE. *Synthetic Communications*. 2011;41(5):629-36.
54. QU B, OU B-L, CHEN D-Y, HU Y-Z. Identification, Synthesis and Spectral Characterization of a Potential Impurity of Ceftazidime. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2010;18(5):346-52.
55. Briscoe CJ, Stiles MR, Hage DS. System suitability in bioanalytical LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44(2):484-91.
56. AOAC International. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. AOAC International. 2002.
57. Bhattacharya S. The facts about penicillin allergy: a review. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2010;1(1):11-7.
58. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2013;70(3):195-283.

59. Antibiotic Guidelines 2015-2016: Treatment Recommendations For Adult Inpatients. Johns Hopkins Medicine.
60. Brauer F, Schmidt K, Zahn RC, Richter C, Radeke HH, Schmitz JE, et al. A rationally engineered anti-HIV peptide fusion inhibitor with greatly reduced immunogenicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(2):679-88.
61. Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, Sidney J, Harndahl M, Southwood S, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(25):9959-64.
62. Precopio ML, Butterfield TR, Casazza JP, Little SJ, Richman DD, Koup RA, et al. Optimizing Peptide Matrices For Identifying T Cell Antigens. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008;73(11):1071-8.





APPENDIX A: NMR SPECTRA



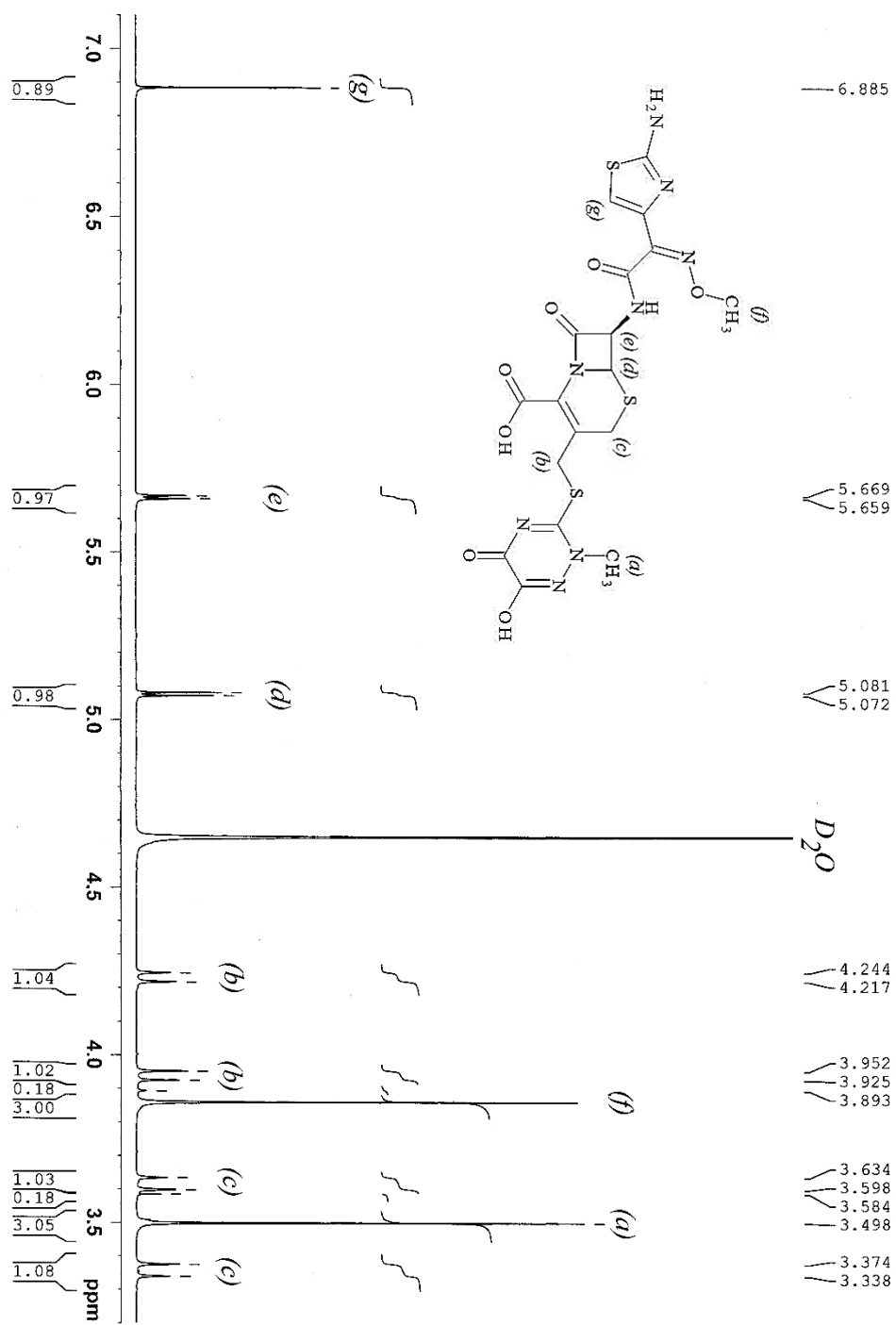


Figure 29: ^1H NMR spectrum of ceftriaxone

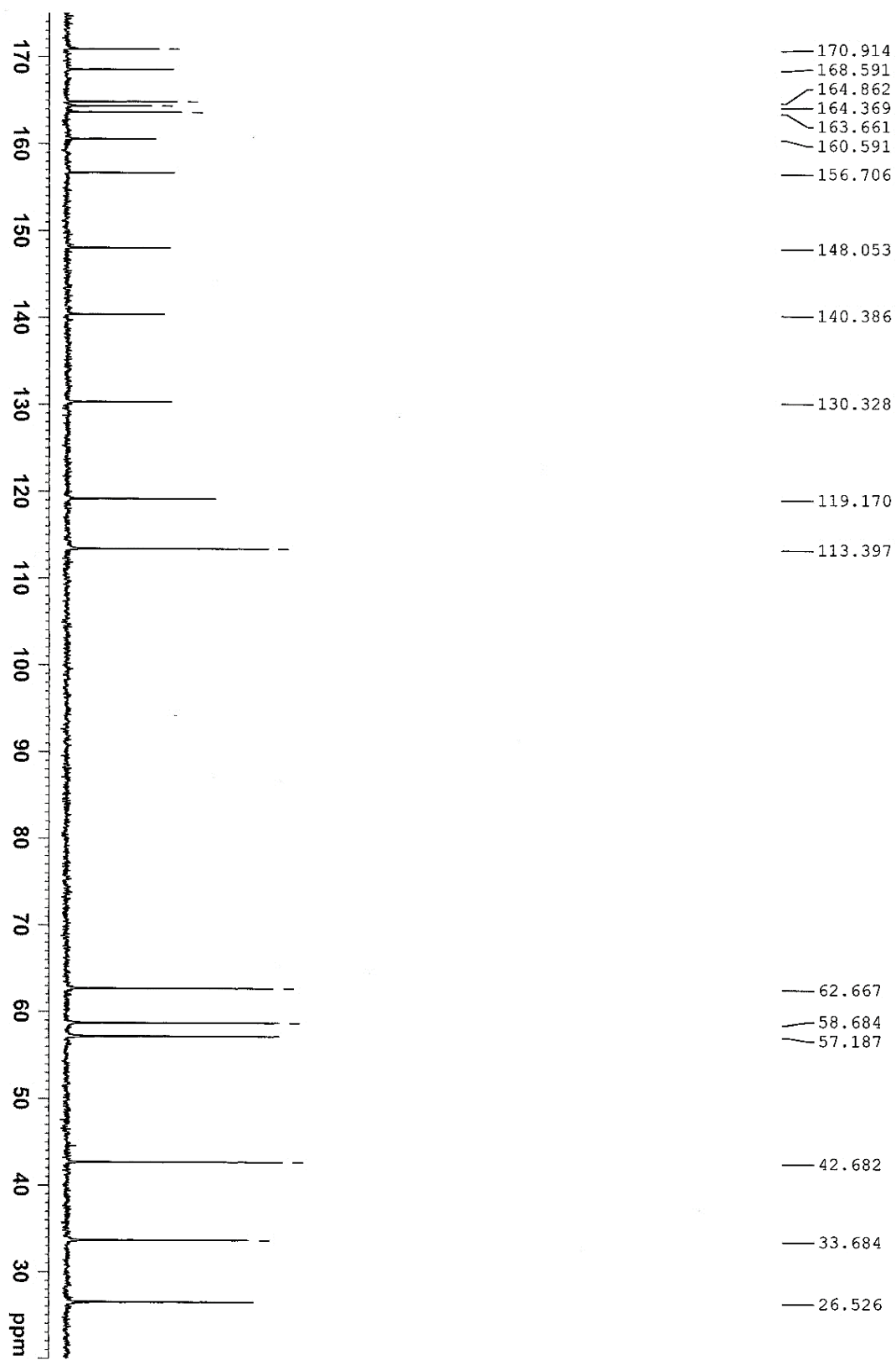


Figure 30: ^{13}C NMR spectrum of ceftriaxone

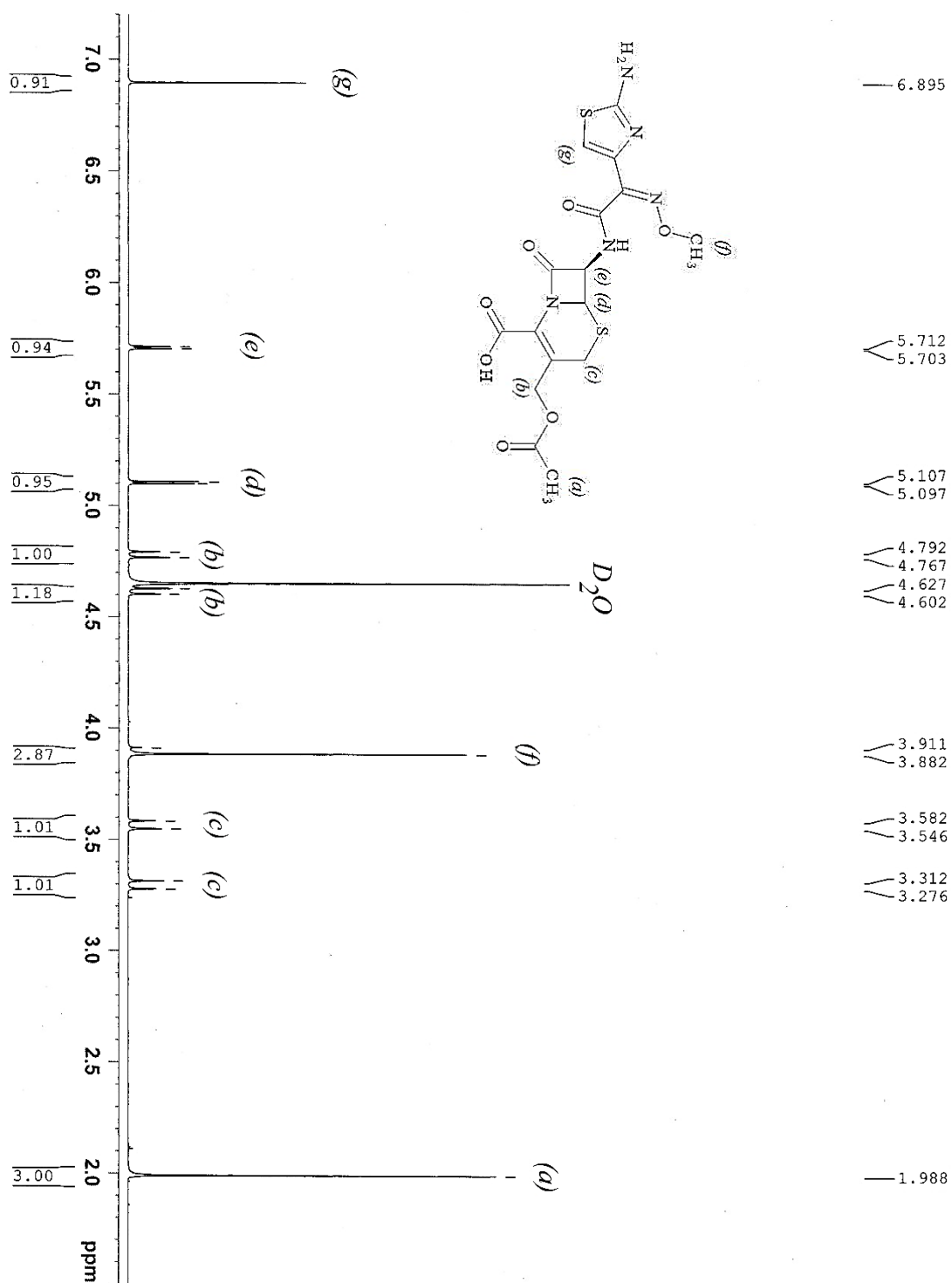


Figure 31: ^1H NMR spectrum of cefotaxime

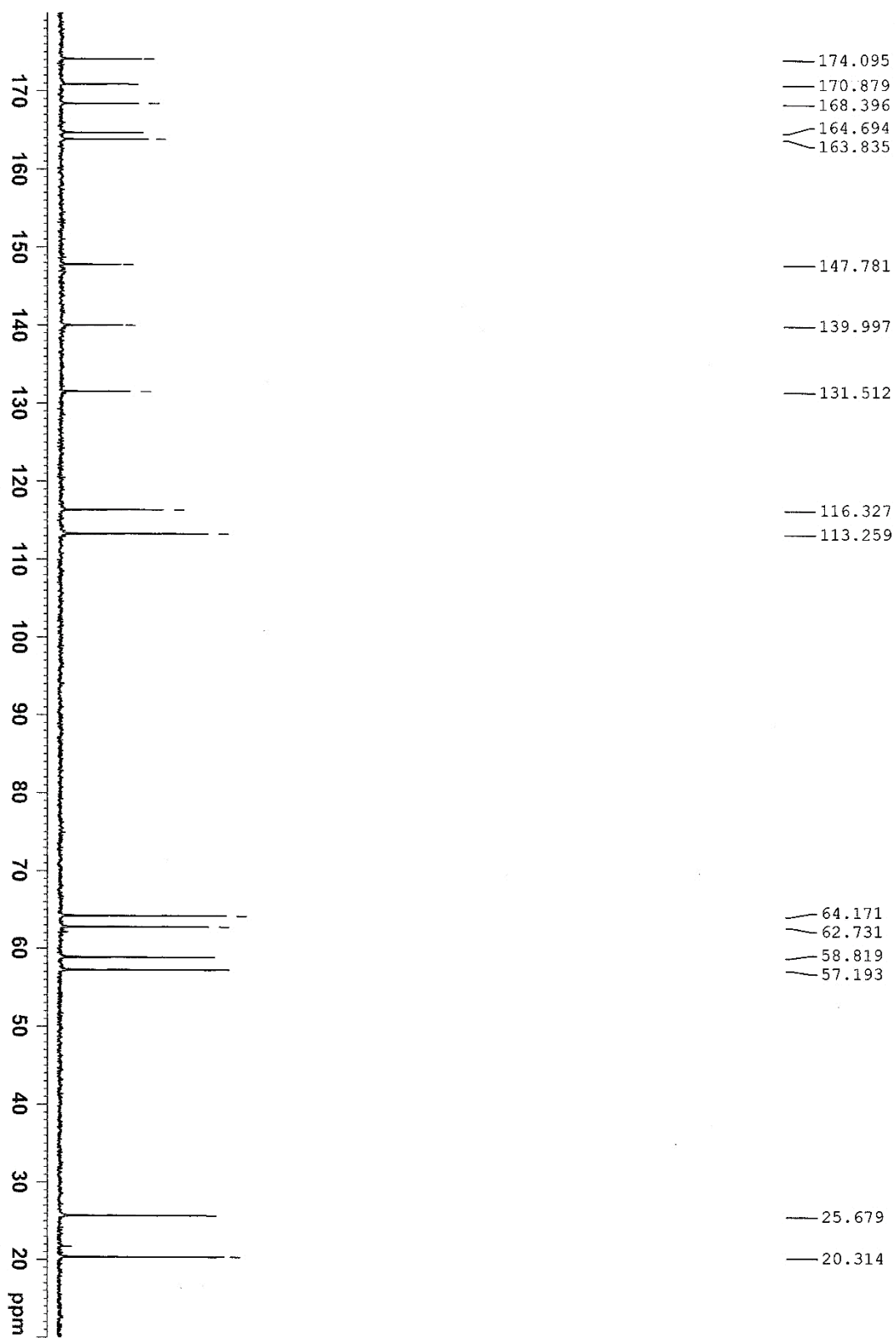
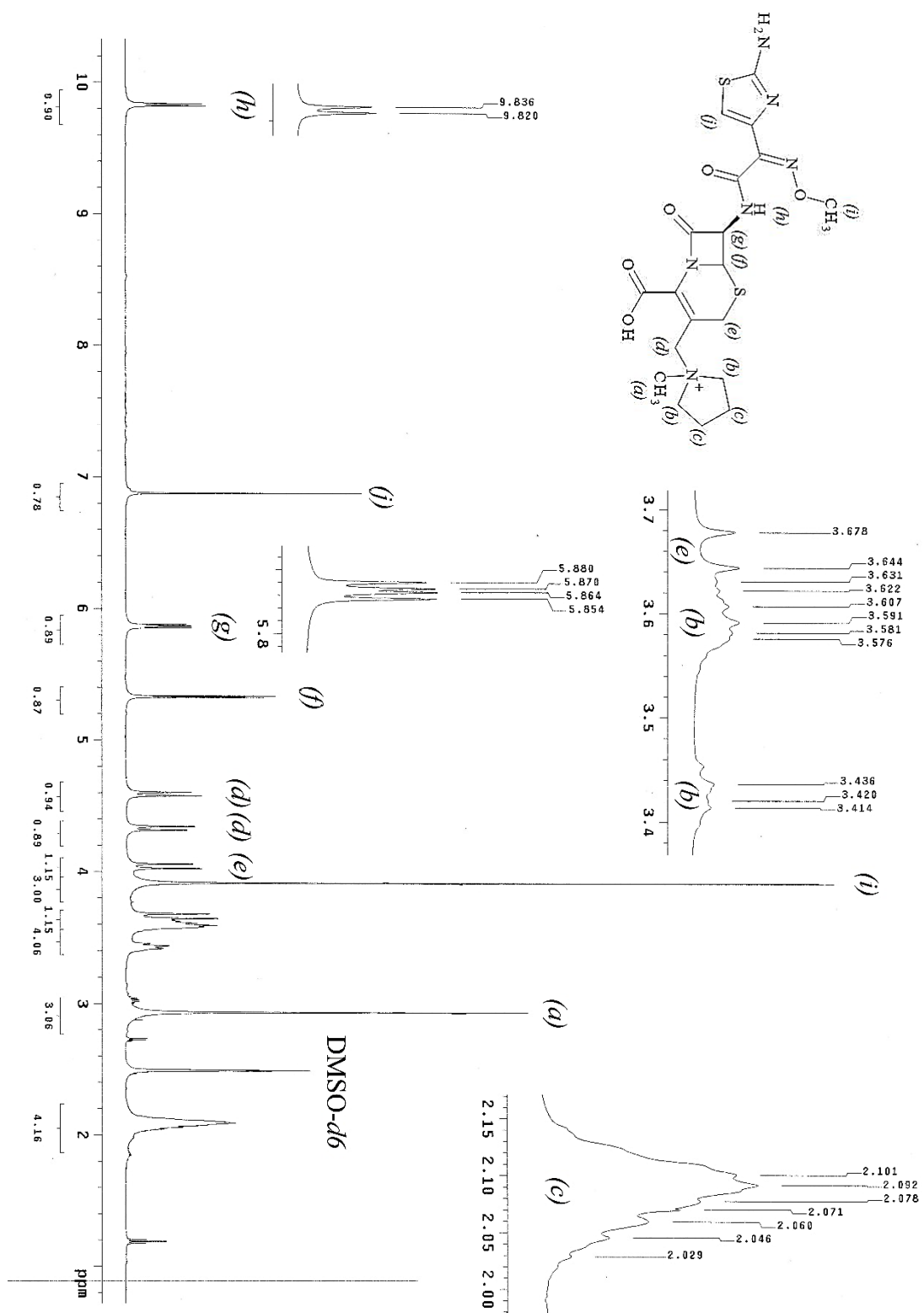
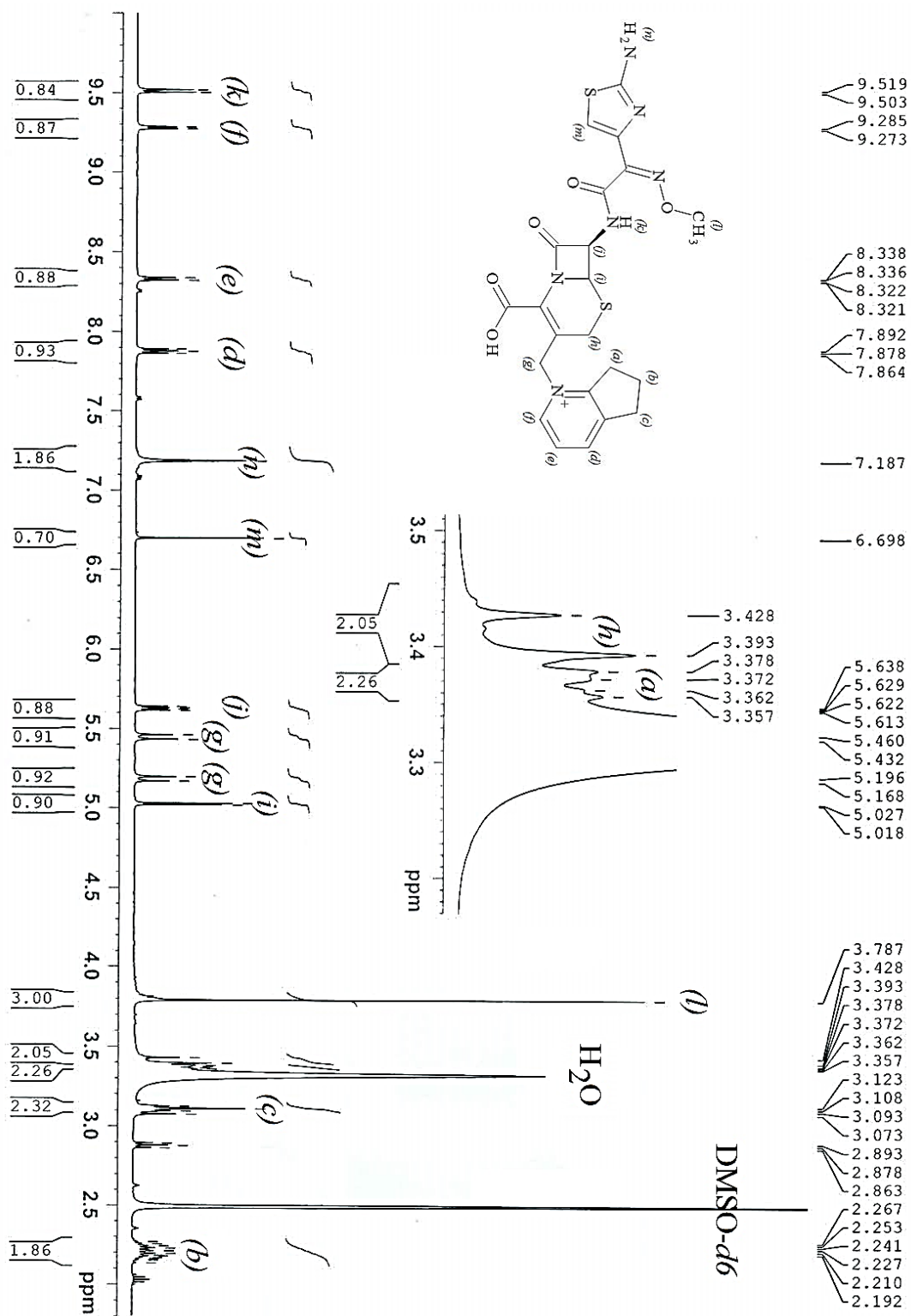


Figure 32: ^{13}C NMR spectrum of cefotaxime

Figure 33: ¹H NMR spectrum of cefepime

Figure 34: ^1H NMR spectrum of cefpirome

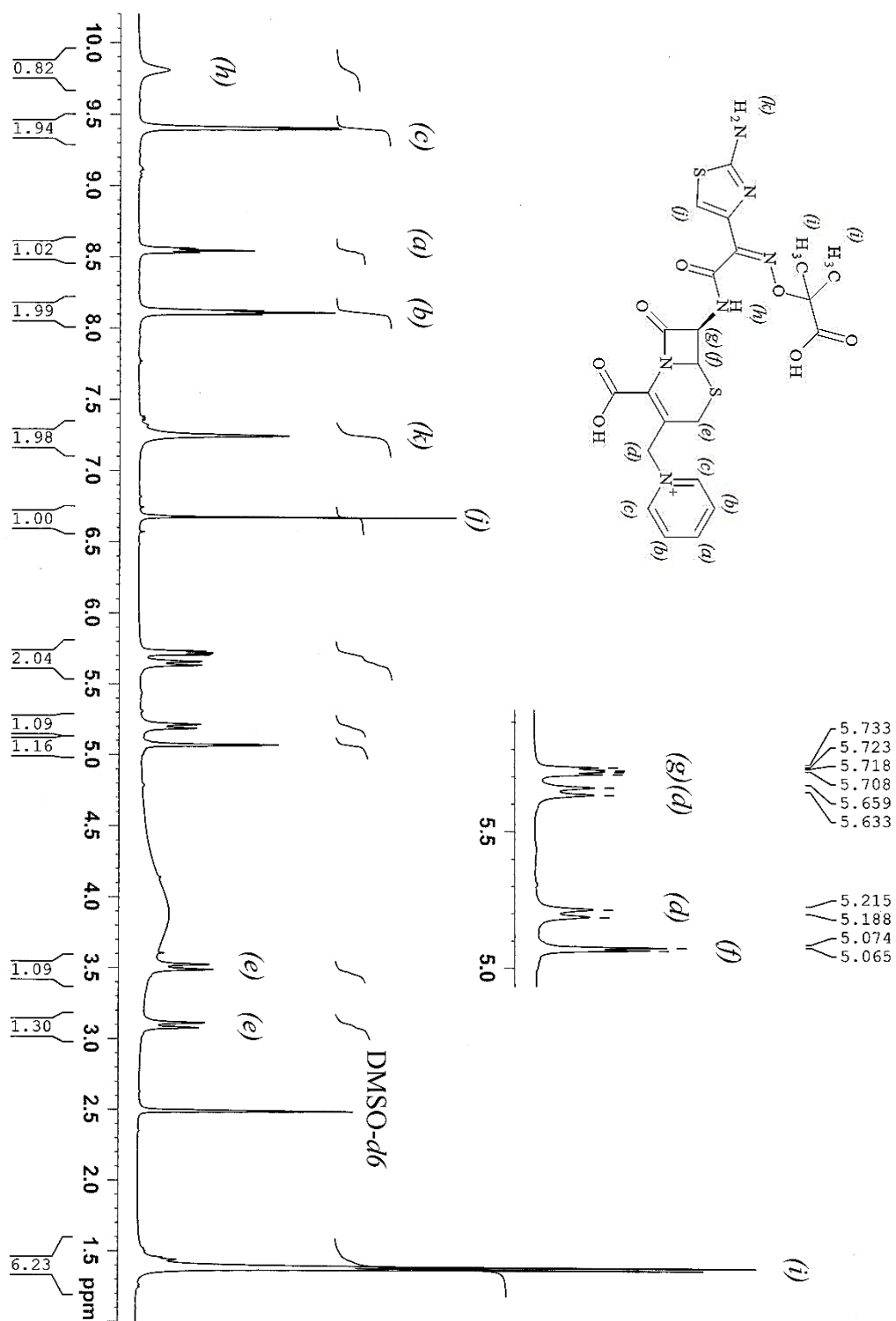


Figure 35: ^1H NMR spectrum of ceftazidime

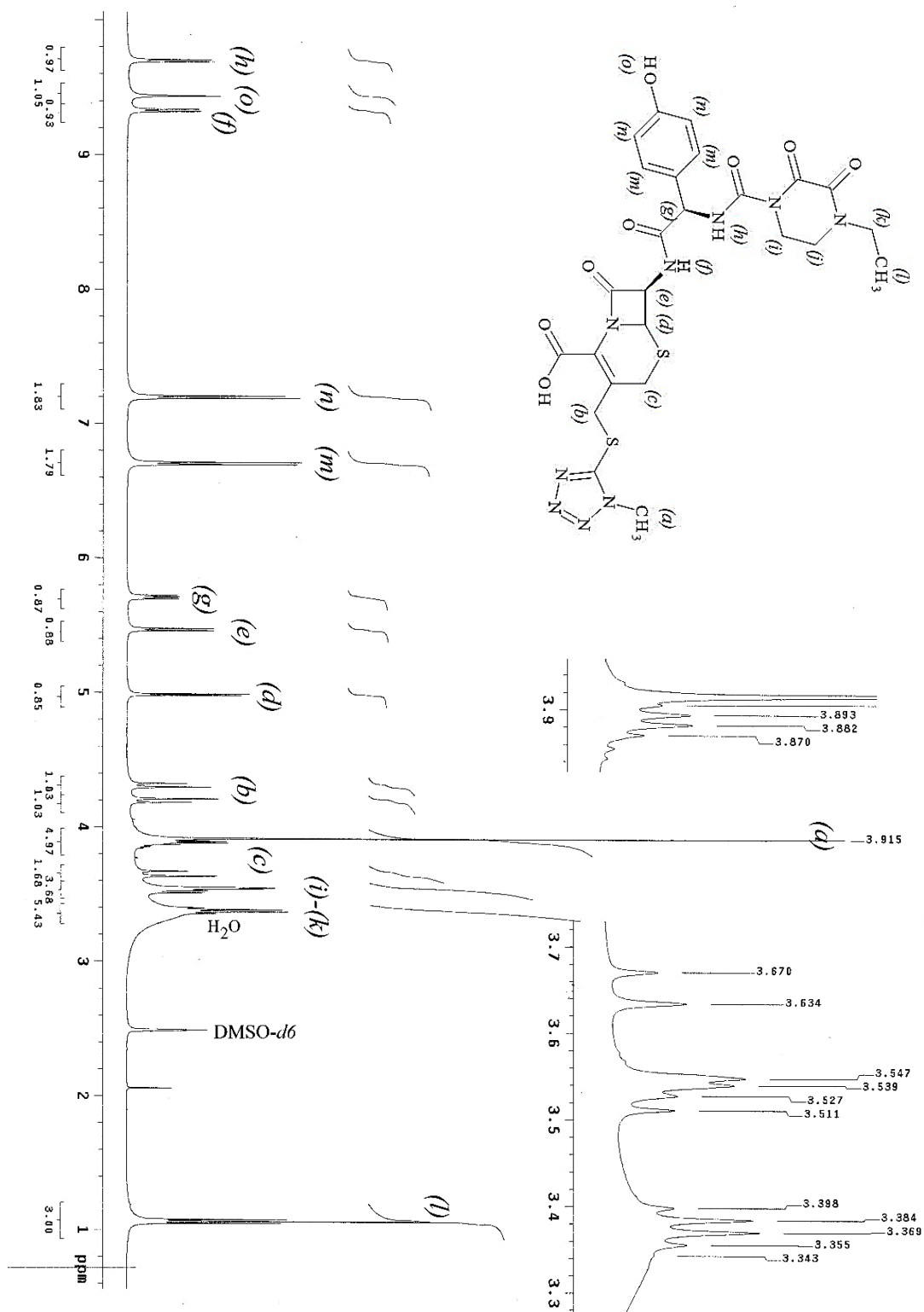


Figure 36: ^1H NMR spectrum of cefoperazone

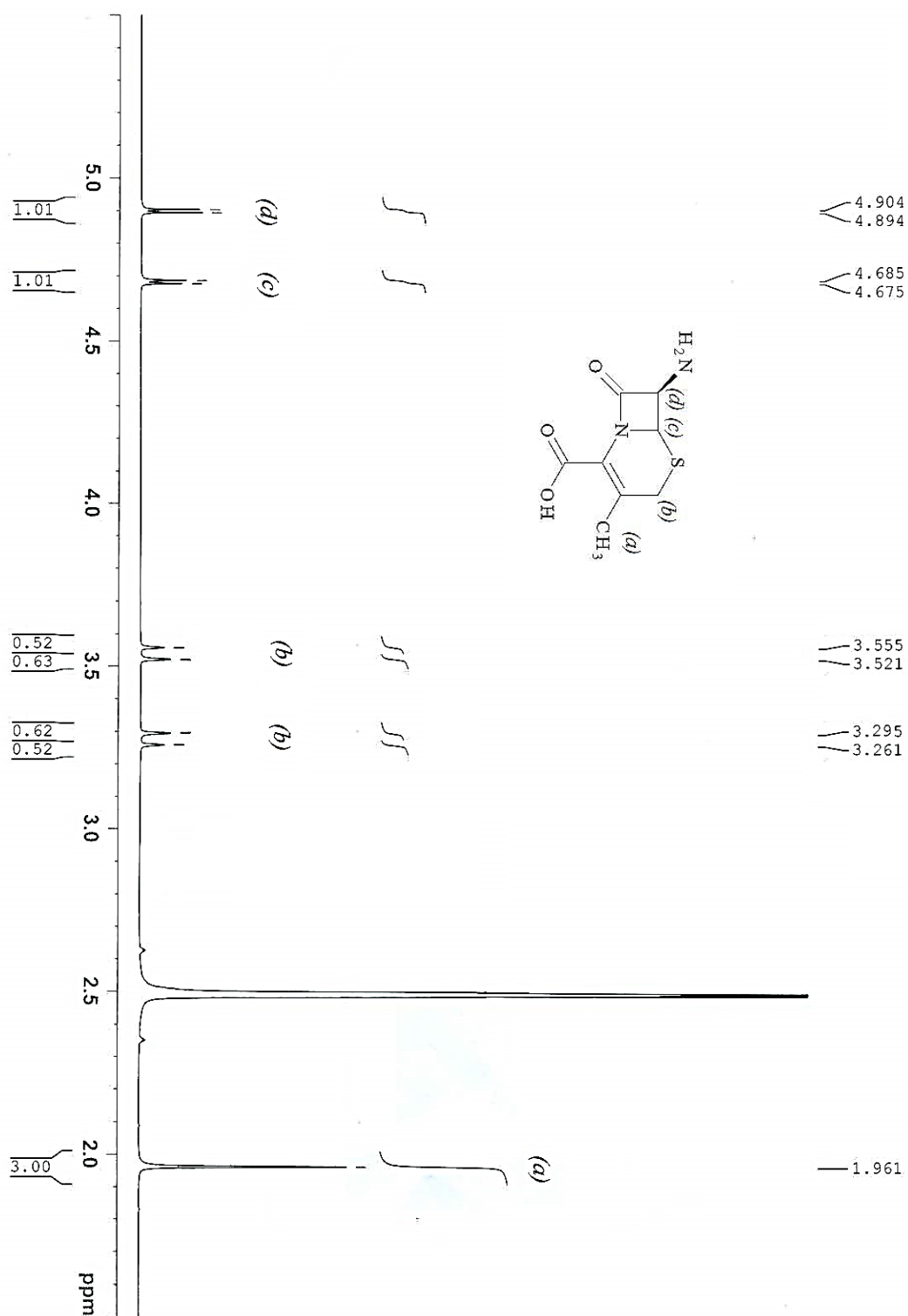


Figure 37: ^1H NMR spectrum of 7-ADCA

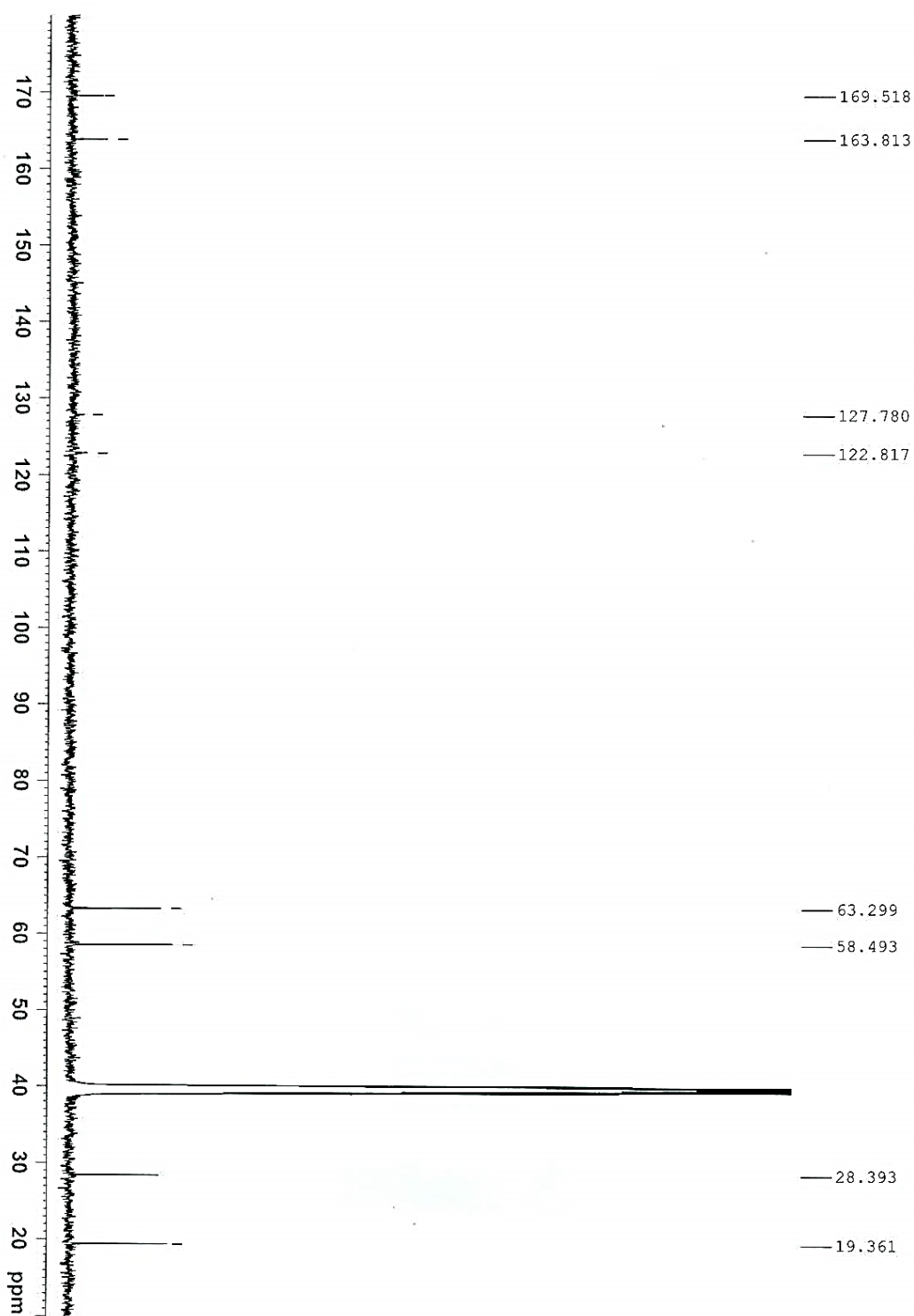
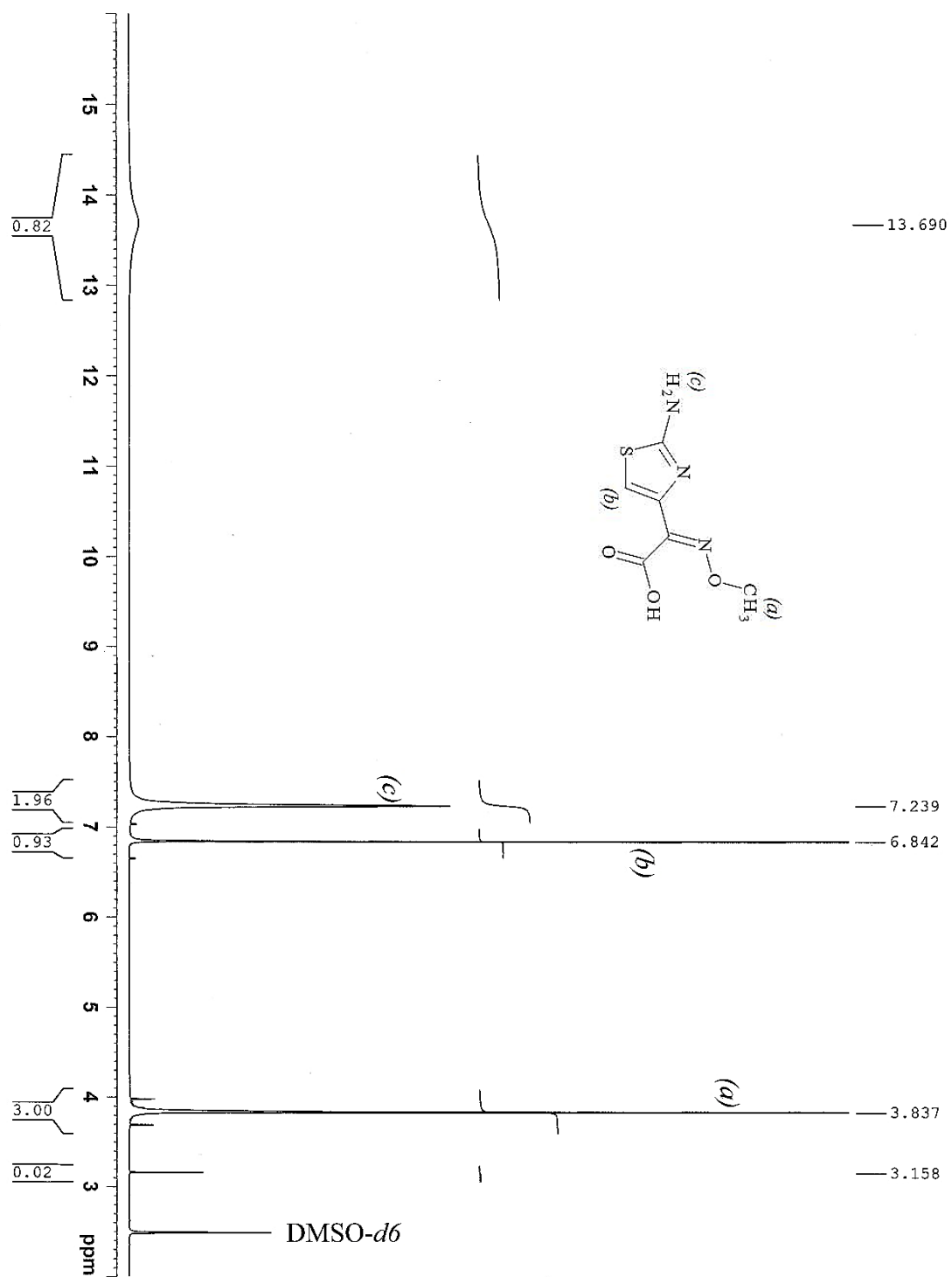


Figure 38: ^{13}C NMR spectrum of 7-ADCA

Figure 39: ^1H NMR spectrum of MTTA

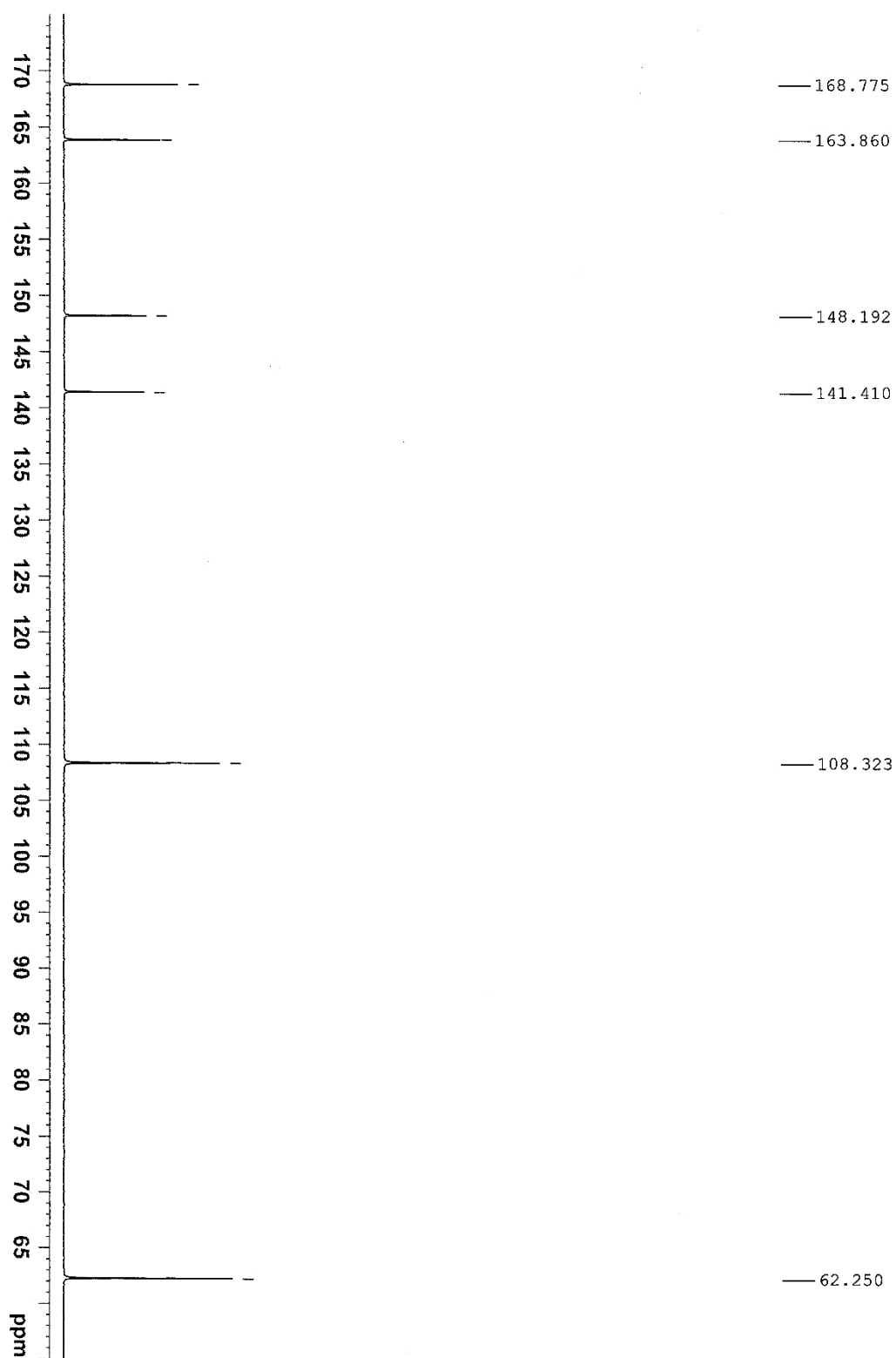
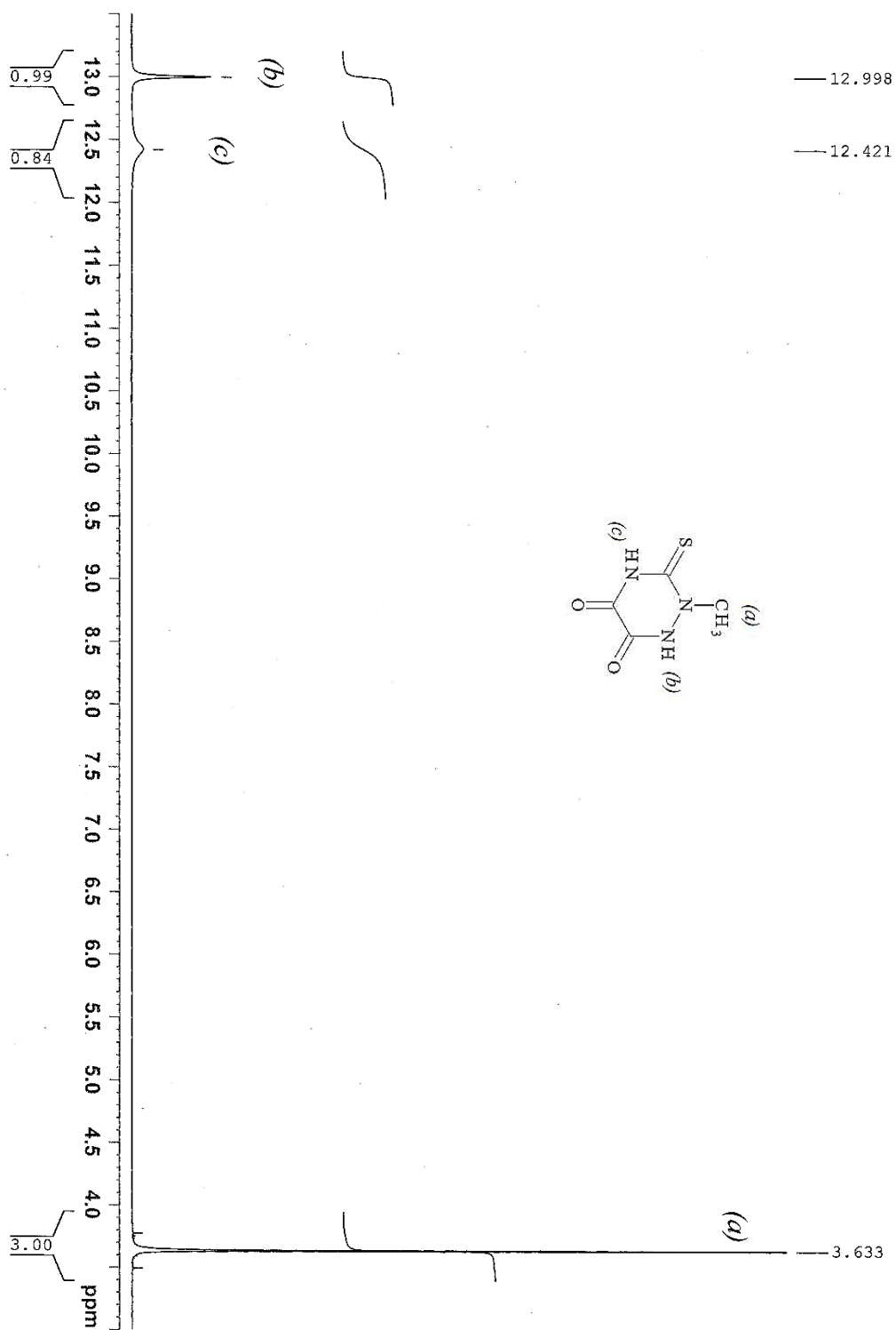


Figure 40: ^{13}C NMR spectrum of MTTA

Figure 41: ^1H NMR spectrum of TMTD

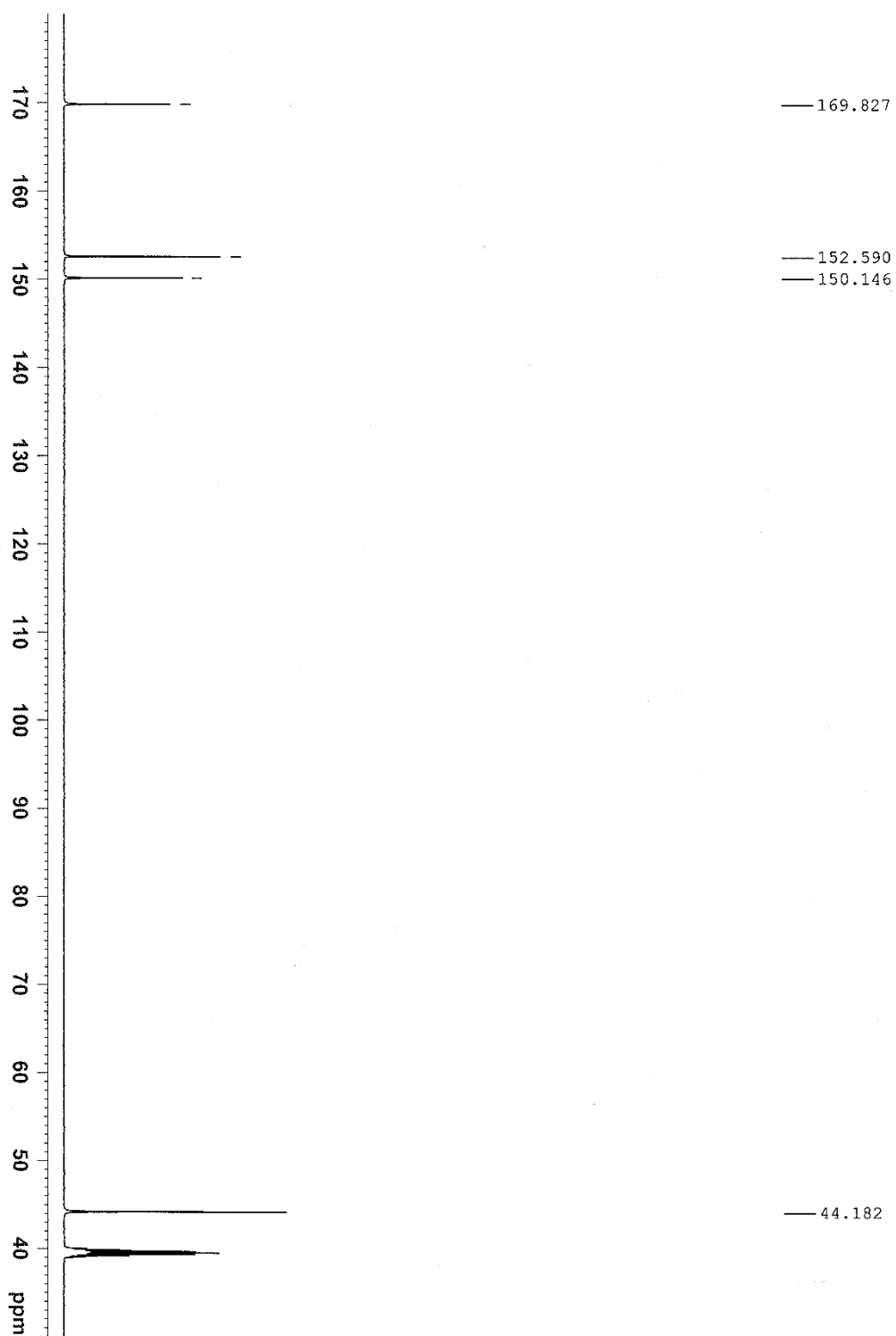


Figure 42: ^{13}C NMR spectrum of TMTD

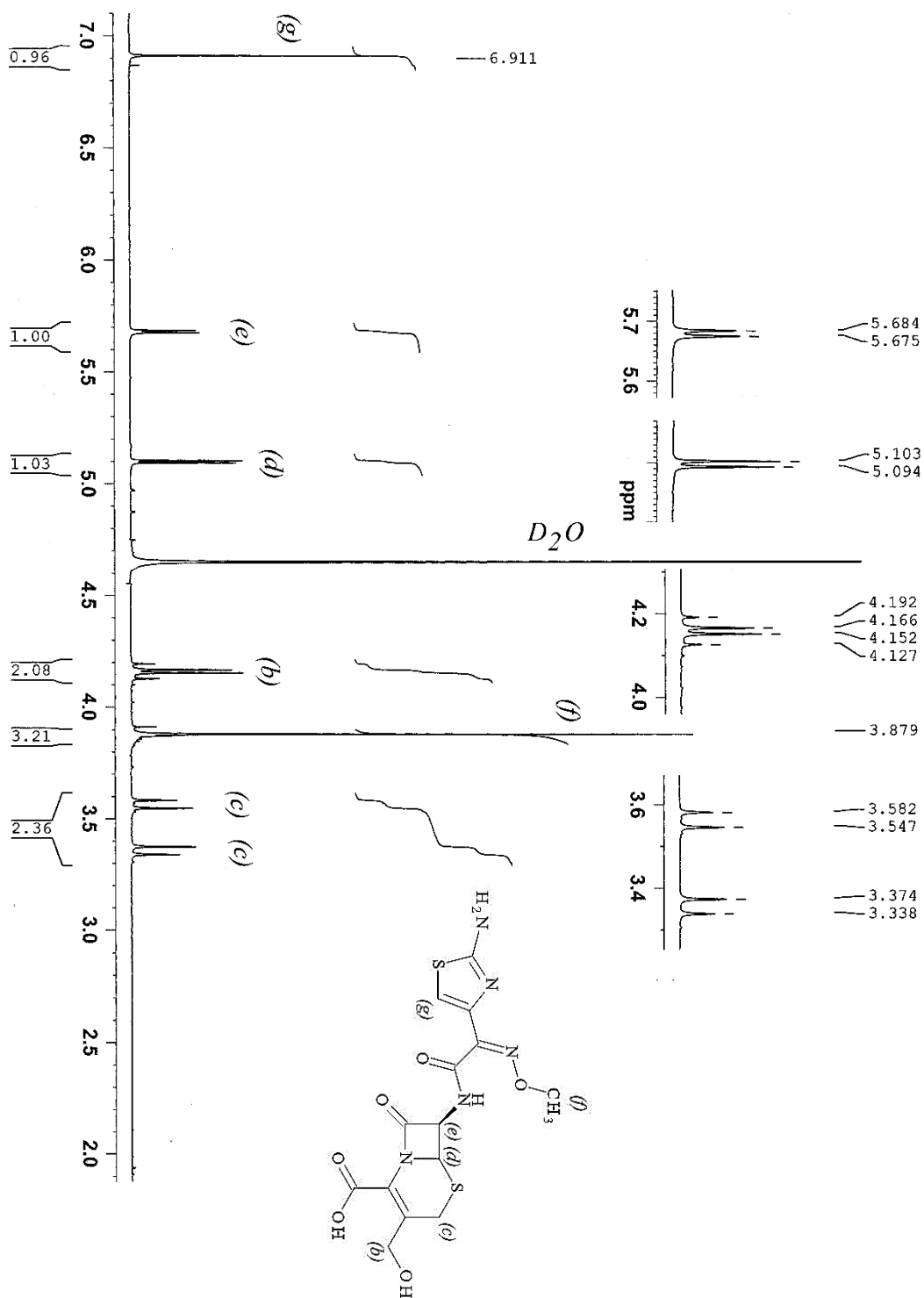


Figure 43: ¹H NMR spectrum of desacetylcefotaxime

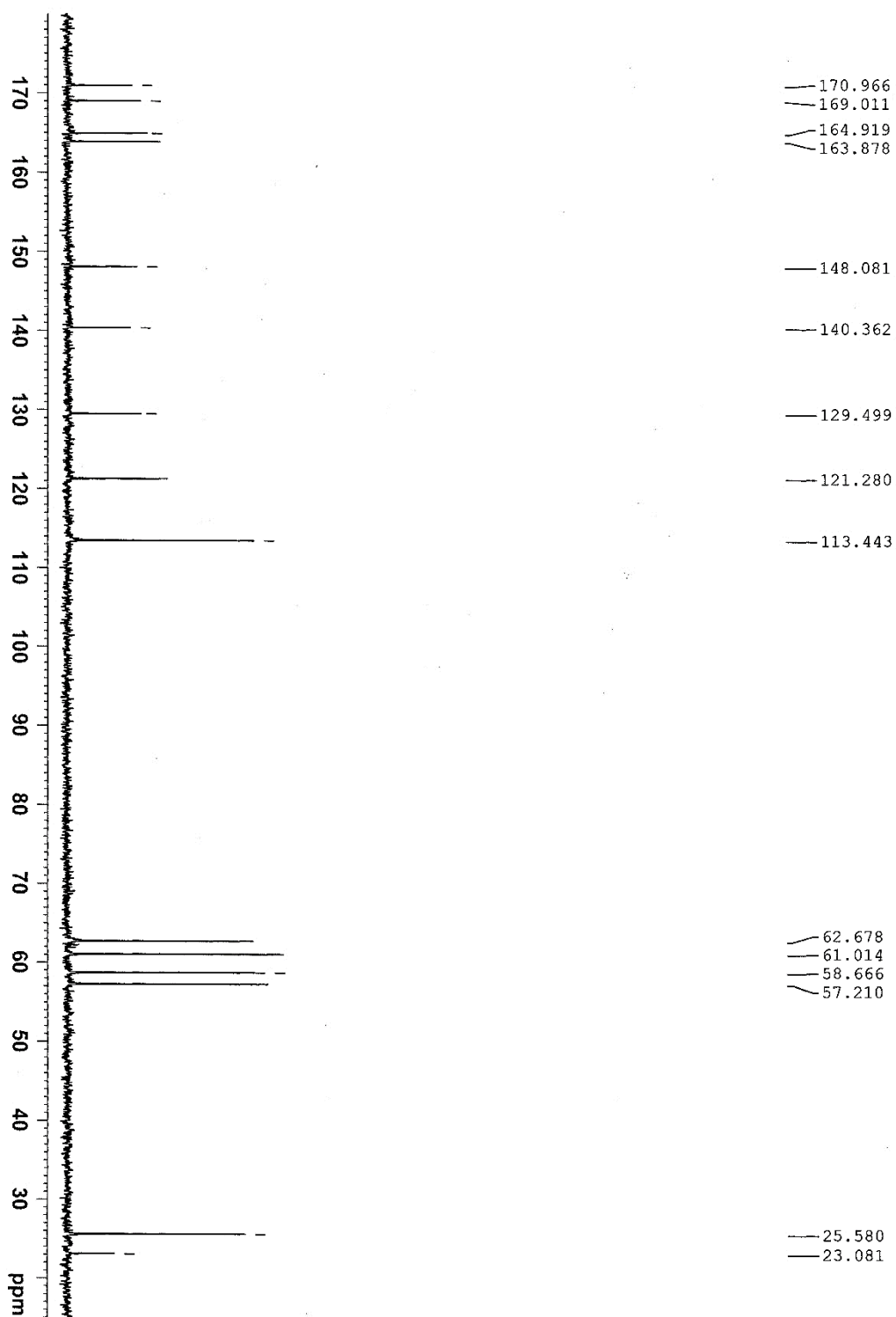


Figure 44: ^{13}C NMR spectrum of desacetylcefotaxime

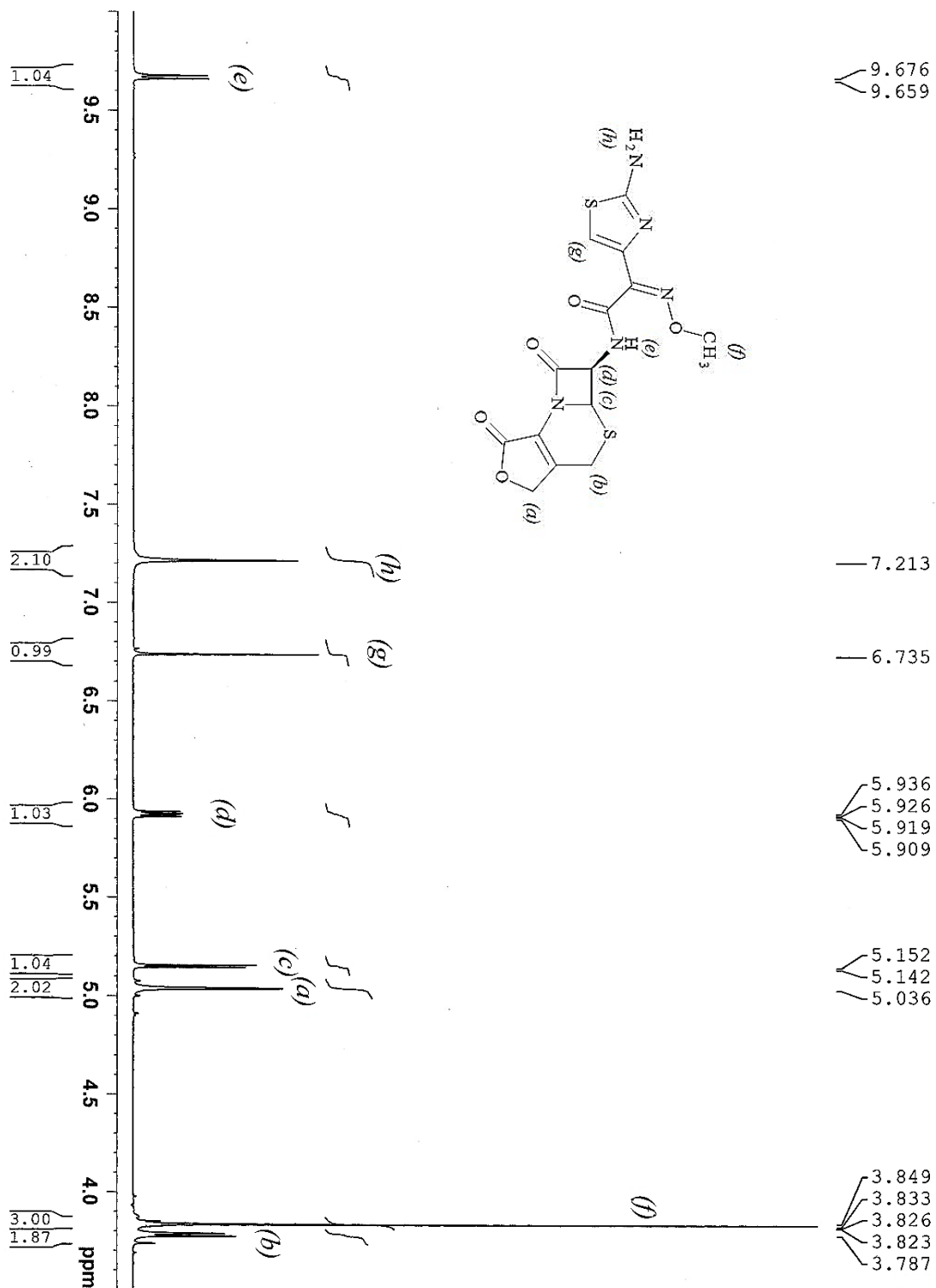


Figure 45: ^1H NMR spectrum of desacetylcefotaxime lactone

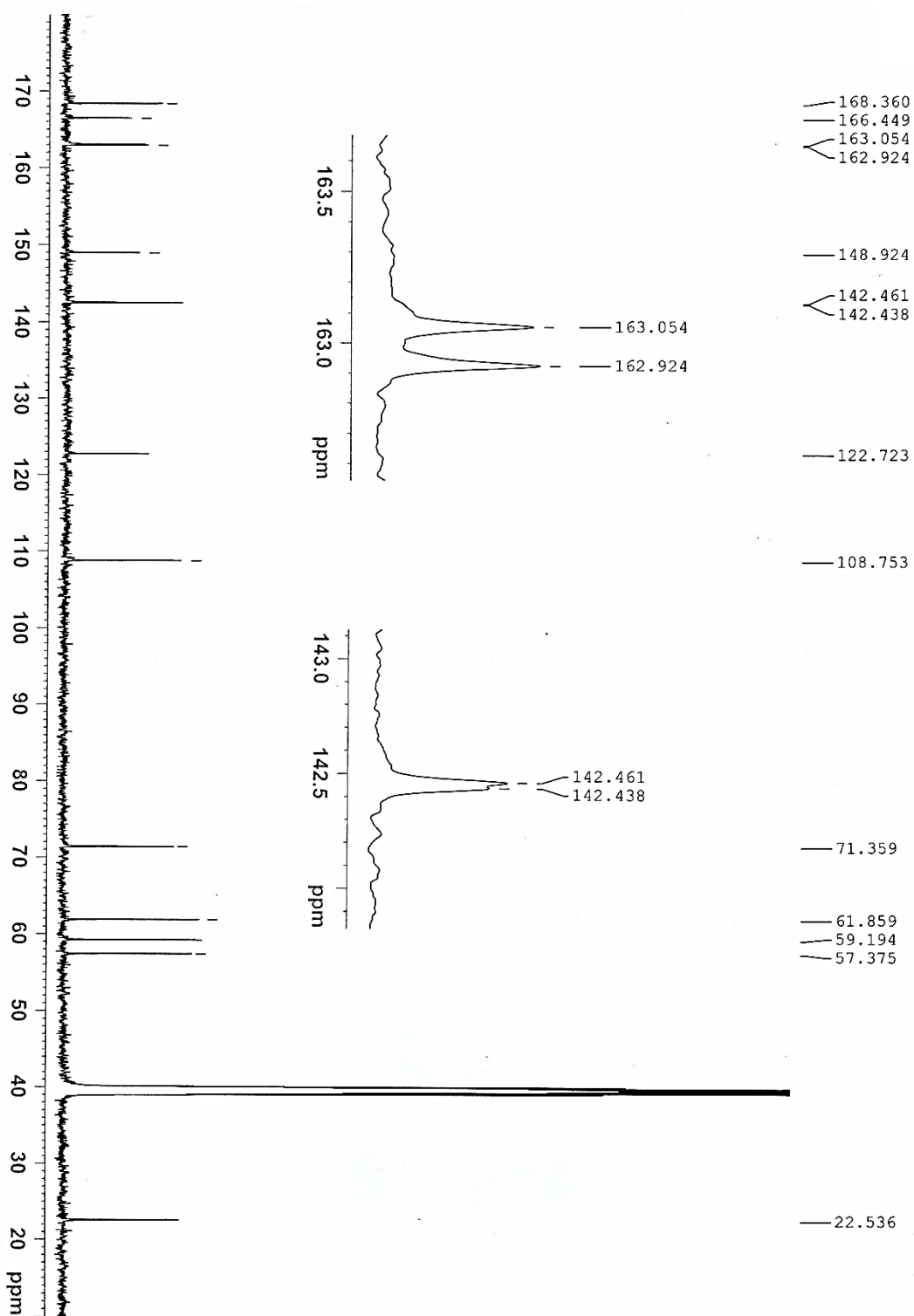


Figure 46: ^{13}C NMR spectrum of desacetylcefotaxime lactone

APPENDIX B: MS SPECTRA



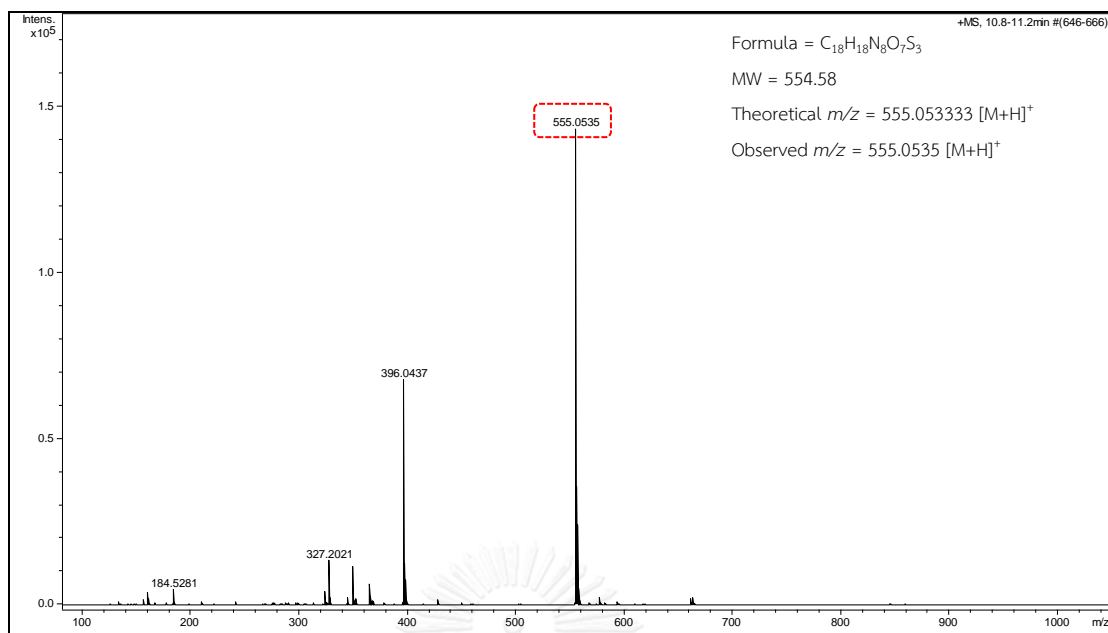


Figure 47: MS spectrum of ceftriaxone

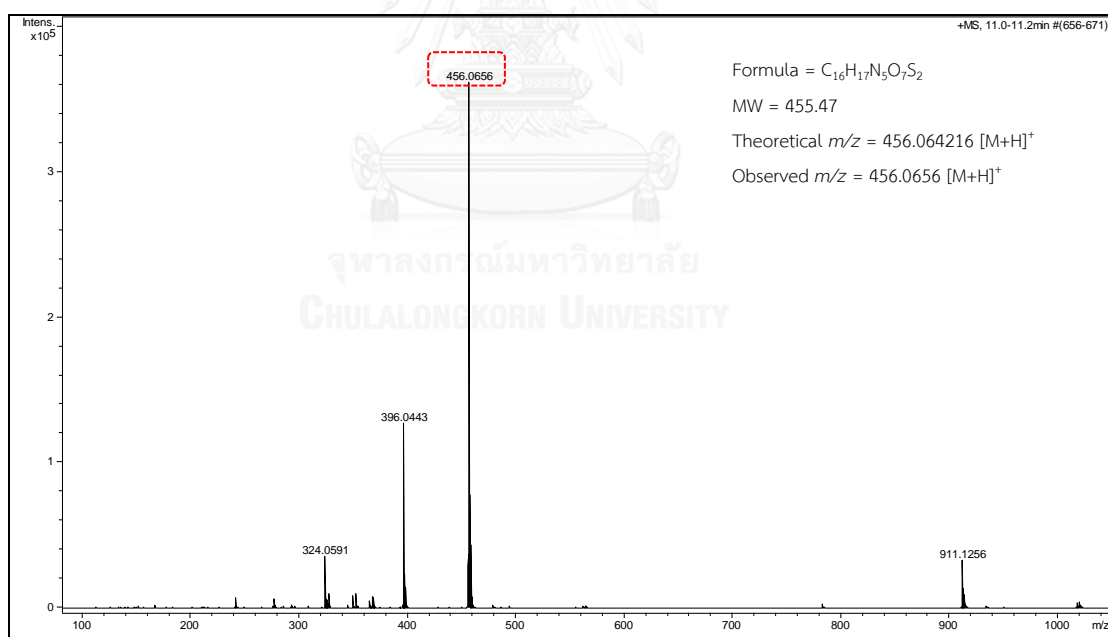


Figure 48: MS spectrum of cefotaxime

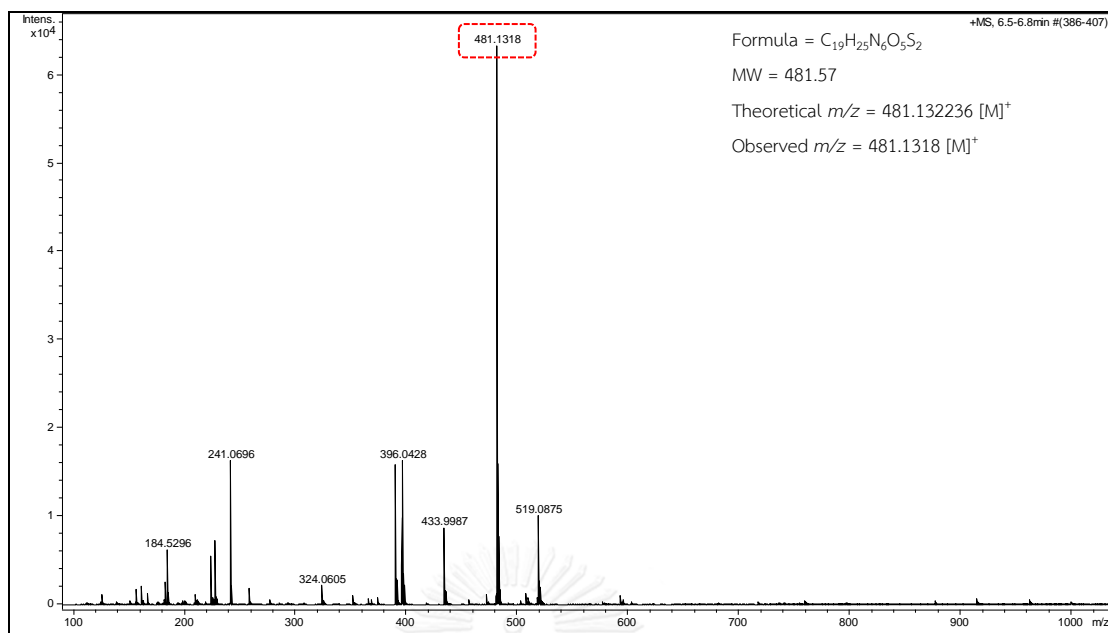


Figure 49: MS spectrum of cefepime

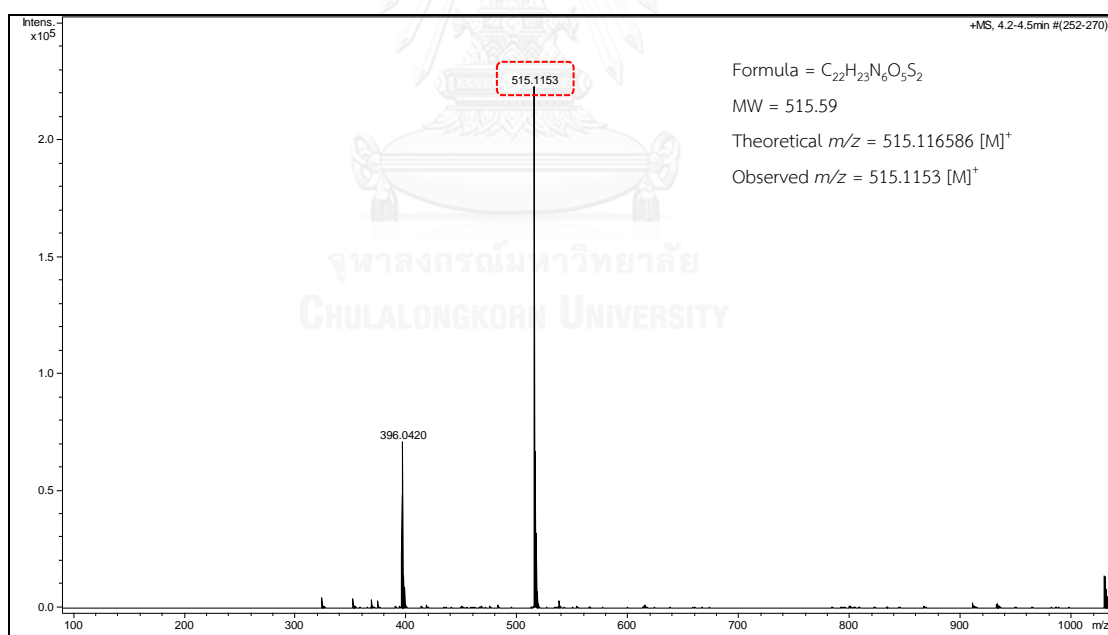


Figure 50: MS spectrum of ceftiofime

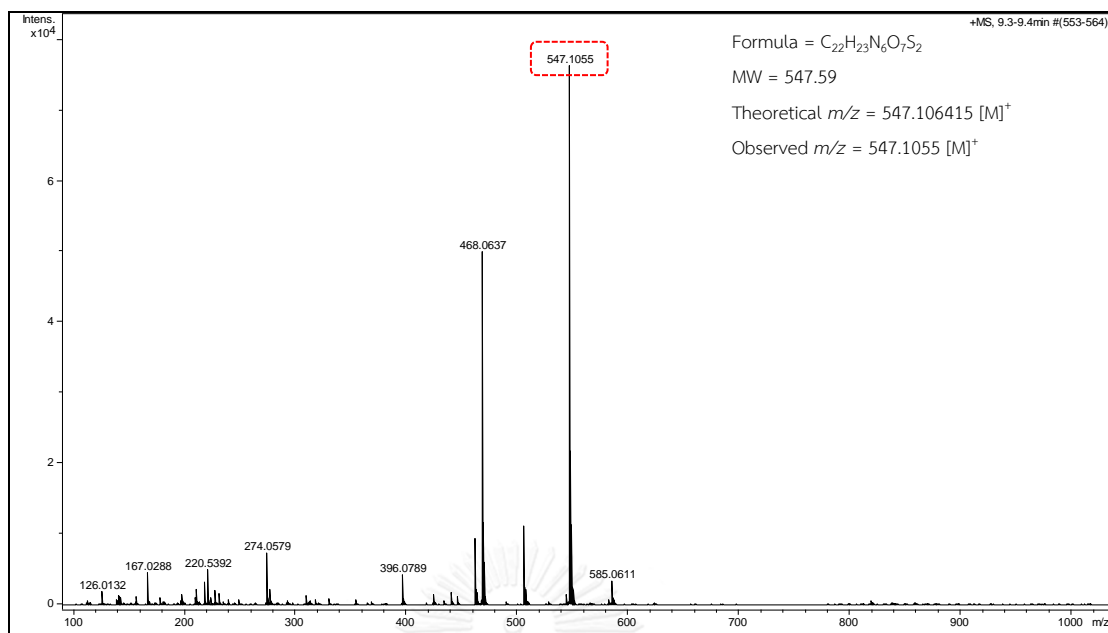


Figure 51: MS spectrum of ceftazidime

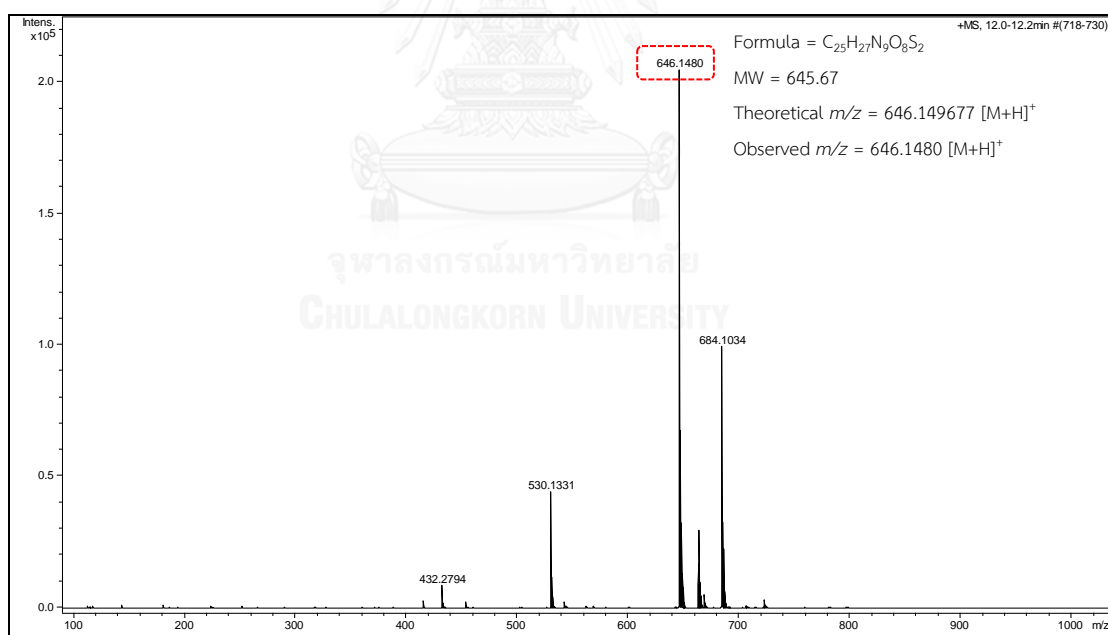


Figure 52: MS spectrum of cefoperazone

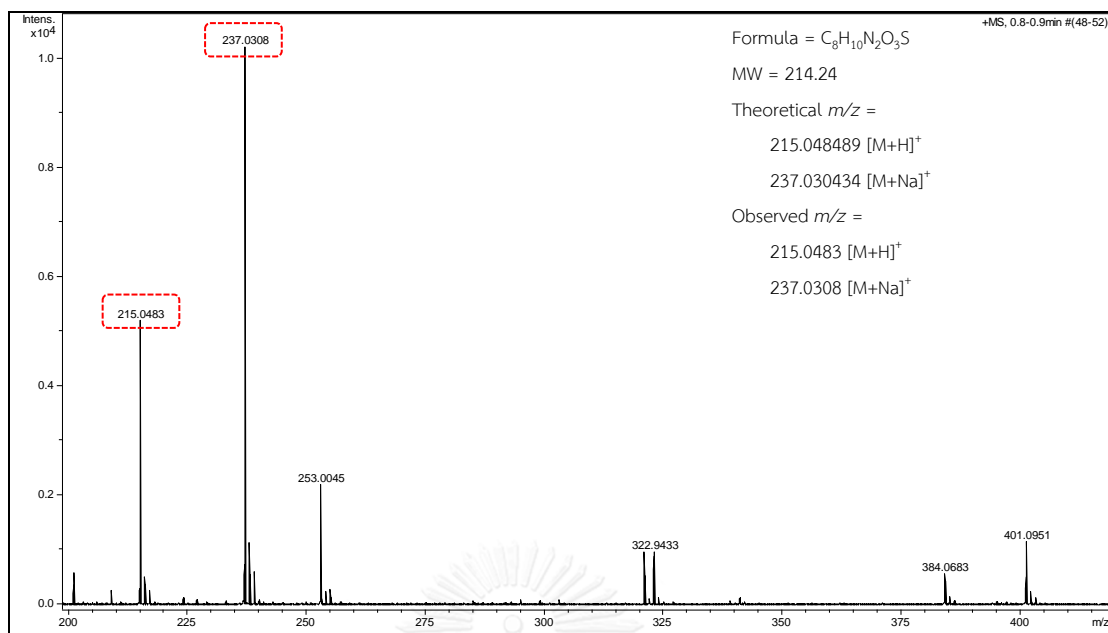


Figure 53: MS spectrum of 7-ADCA

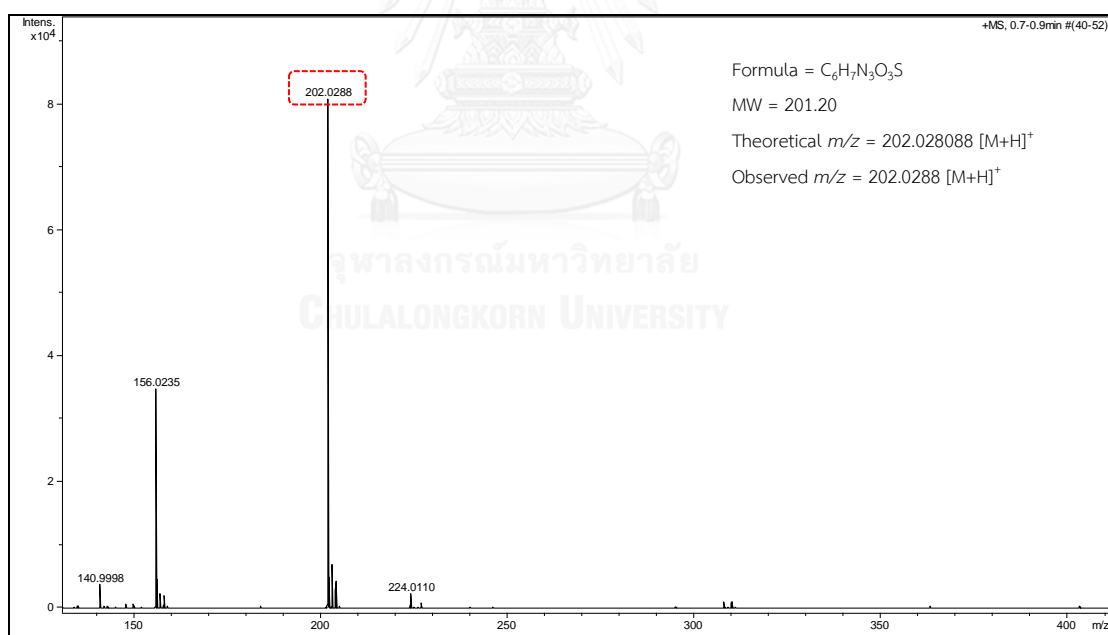


Figure 54: MS spectrum of MTTA

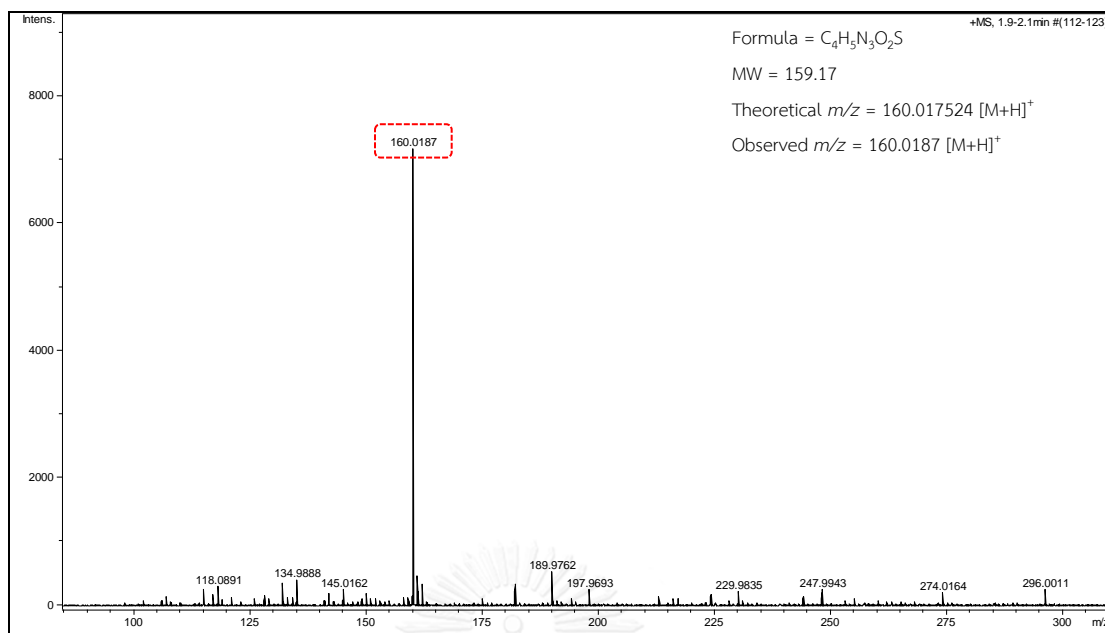


Figure 55: MS spectrum of TMTD

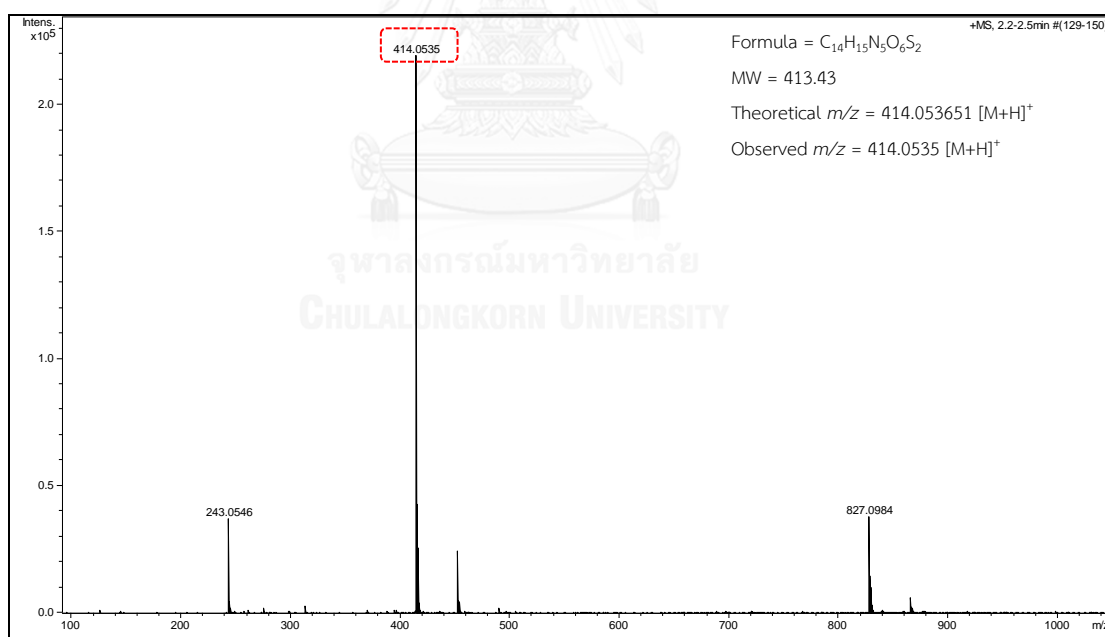


Figure 56: MS spectrum of desacetylcefotaxime

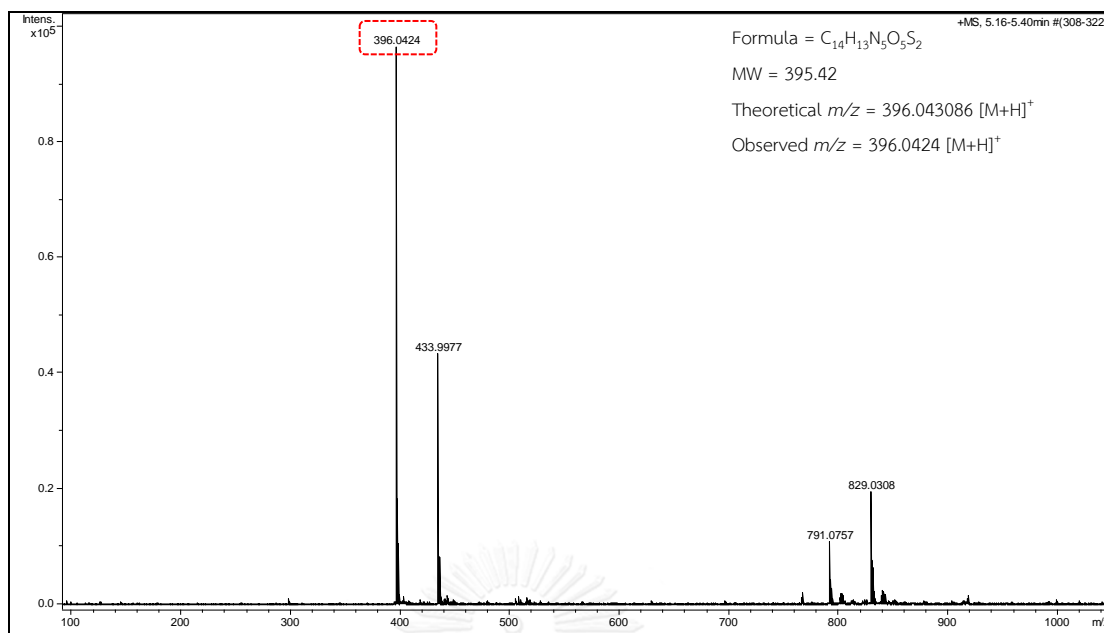


Figure 57: MS spectrum of desacetylcefotaxime lactone

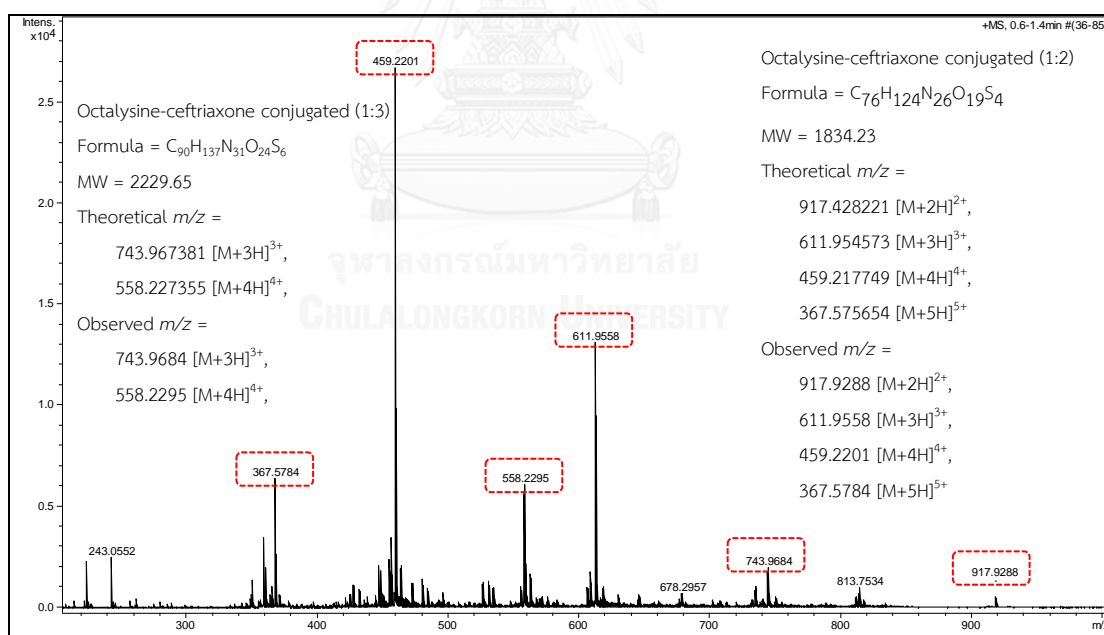


Figure 58: MS spectrum of octalysine-ceftriaxone conjugate

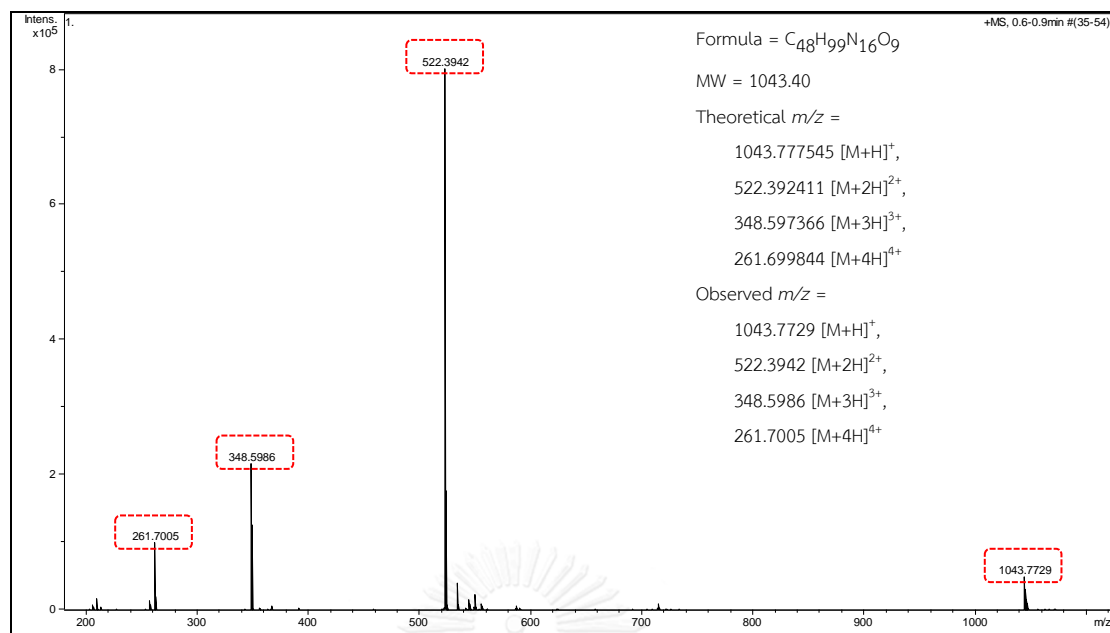
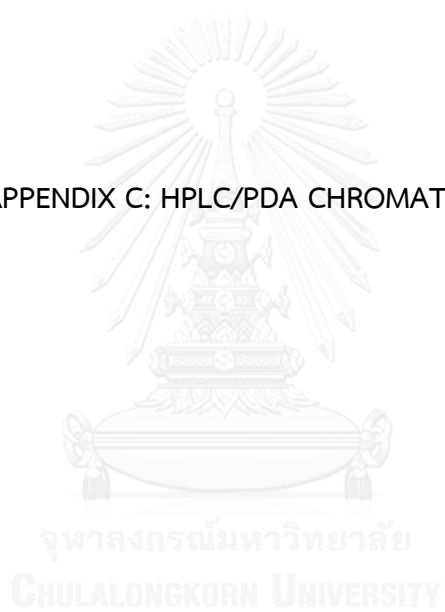
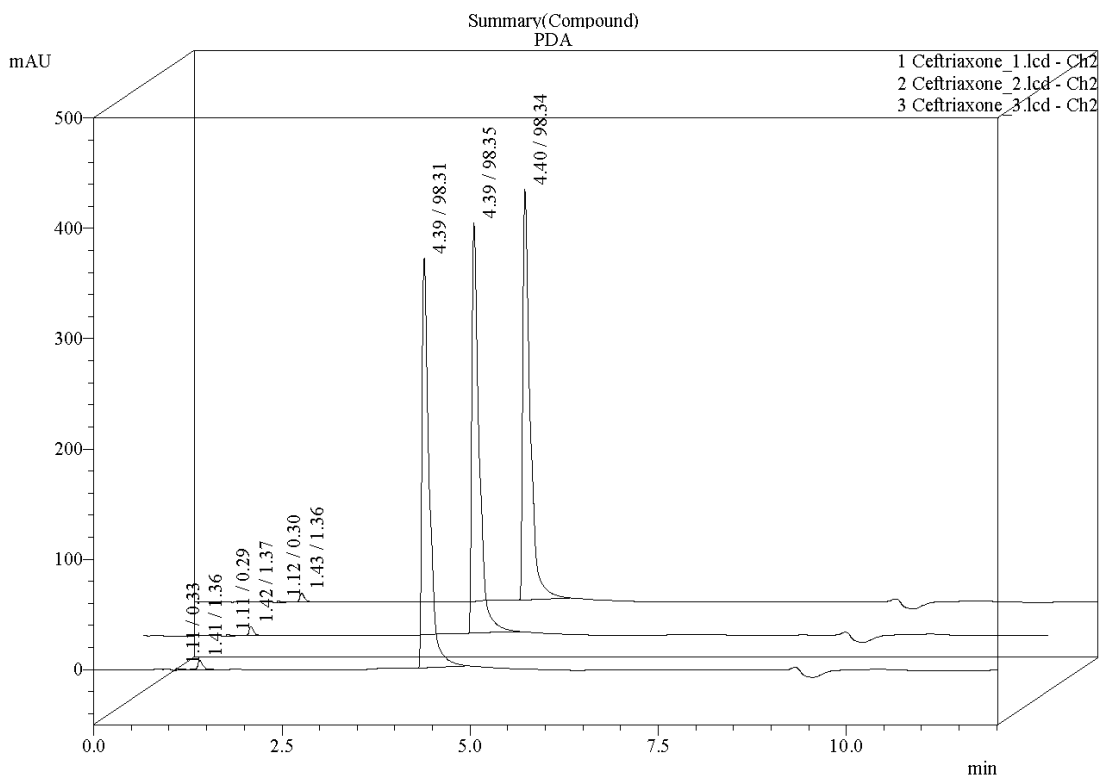


Figure 59: MS spectrum of octalysine

APPENDIX C: HPLC/PDA CHROMATOGRAMS





<Peak Table>

PDA Ch2 240nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.12	7718	0.30	1.00000	2.60	206/658/245/273/472
2	1.43	34861	1.36	0.62695	12.41	279/235/649/425
3	4.40	2519253	98.34	1.00000	568.93	241/270/487.615/451
Total		2561832	100.00			

<Peak Table>

PDA Ch2 240nm

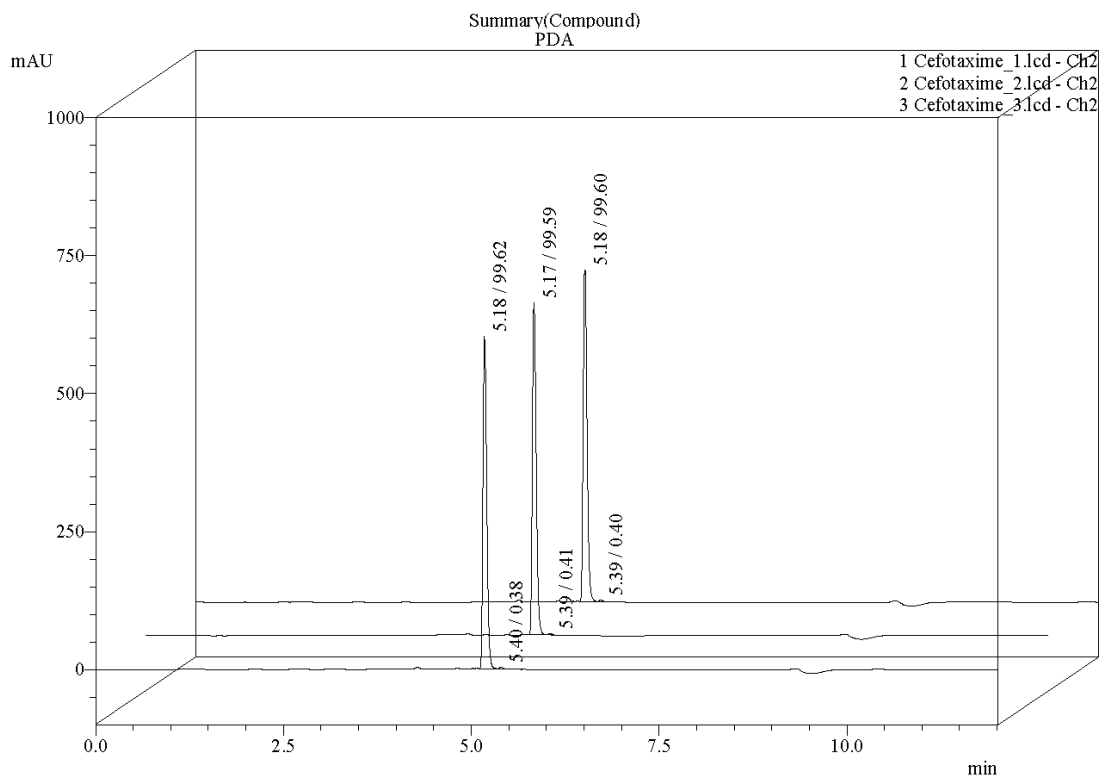
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.11	7355	0.29	0.99999	2.64	207/615/737/484/646
2	1.42	34861	1.37	0.65893	11.66	279/235
3	4.39	2511650	98.35	1.00000	546.38	241/270/484/452/638
Total		2553665	100.00			

<Peak Table>

PDA Ch2 240nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.11	8490	0.33	1.00000	2.84	207/615/741/483/327
2	1.41	34929	1.36	1.00000	12.42	279/235/485.643/457
3	4.39	2527931	98.31	1.00000	563.08	241/270.615/484/421
Total		2571350	100.00			

Figure 60: HPLC/PDA chromatogram of ceftriaxone

**<Peak Table>**

PDA.Ch2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	5.18	2125761	99.60	1.00000	631.07	235/683.615/435/694
2	5.39	8541	0.40	0.99999	3.04	245/634/369/435/688
Total		2134301	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 235nm

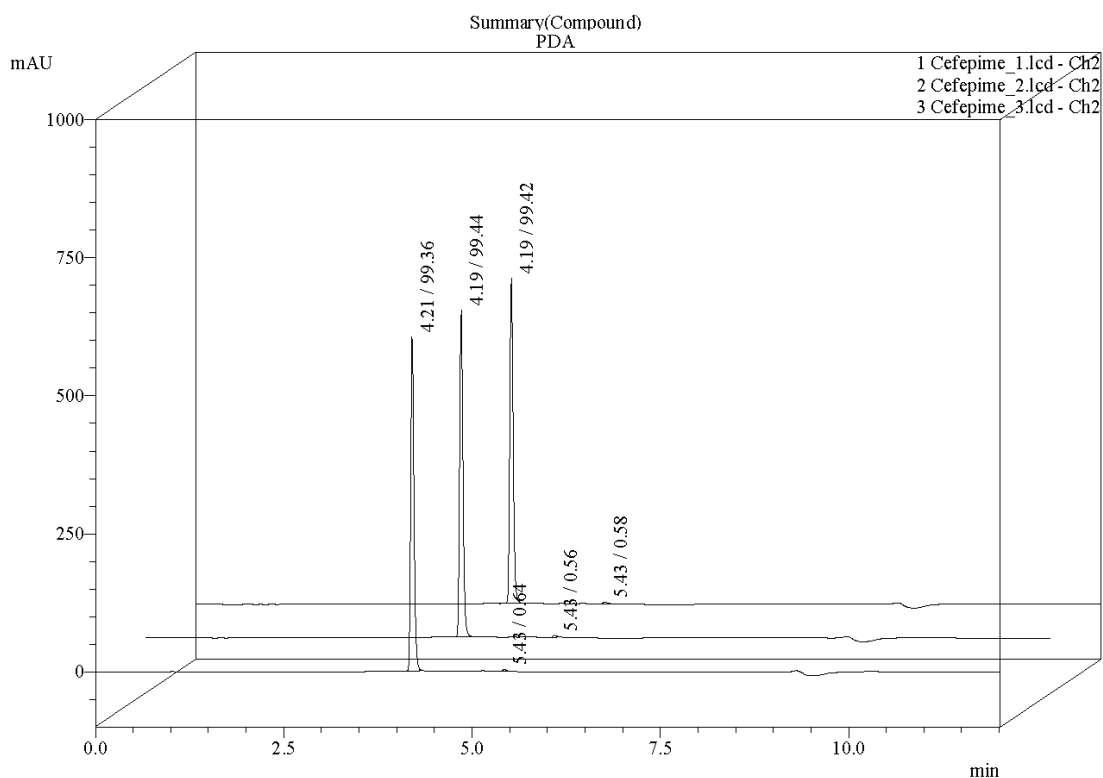
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	5.17	2123996	99.59	1.00000	659.96	235/615/489/633/682
2	5.39	8765	0.41	1.00000	3.25	241/484/637/651/682
Total		2132762	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	5.18	2125805	99.62	1.00000	615.02	235/411/615/677
2	5.40	8179	0.38	1.00000	2.93	240/485/421/457/615
Total		2133984	100.00			

Figure 61: HPLC/PDA chromatogram of cefotaxime



<Peak Table>

PDA Ch2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.19	1816753	99.42	1.00000	714.66	236/256/484/665/638
2	5.43	10538	0.58	0.99999	3.90	240/484/655/411/684
Total		1827290	100.00			

<Peak Table>

PDA Ch2 235nm

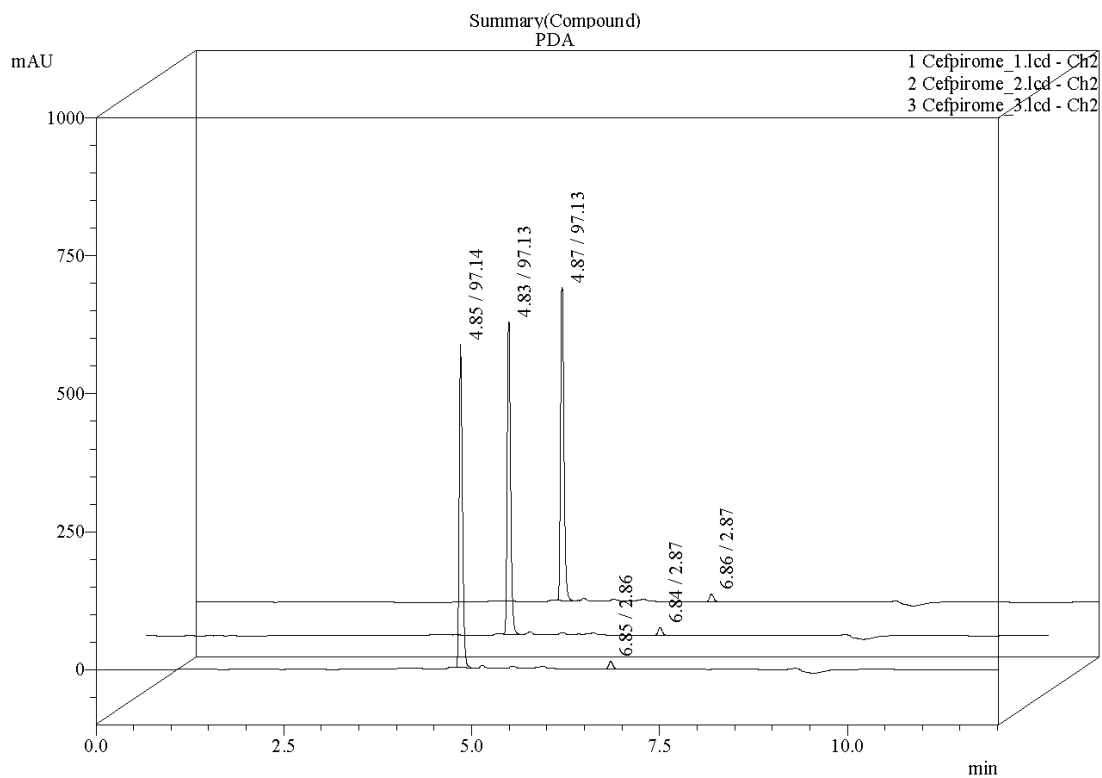
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.19	1815386	99.44	1.00000	754.54	236/256/655/471/615
2	5.43	10261	0.56	0.99998	3.96	239/485/462/421/593
Total		1825647	100.00			

<Peak Table>

PDA Ch2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.21	1820714	99.36	1.00000	729.88	236/256/615/604/435
2	5.43	11642	0.64	1.00000	4.02	244/636/596/469/435
Total		1832356	100.00			

Figure 62: HPLC/PDA chromatogram of cefepime



<Peak Table>

PDA.Ch2.265nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.87	1754402	97.13	1.00000	553.31	266/235/224/659/641
2	6.86	51824	2.87	1.00000	14.05	271/485/567/630/681
Total		1806226	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2.265nm

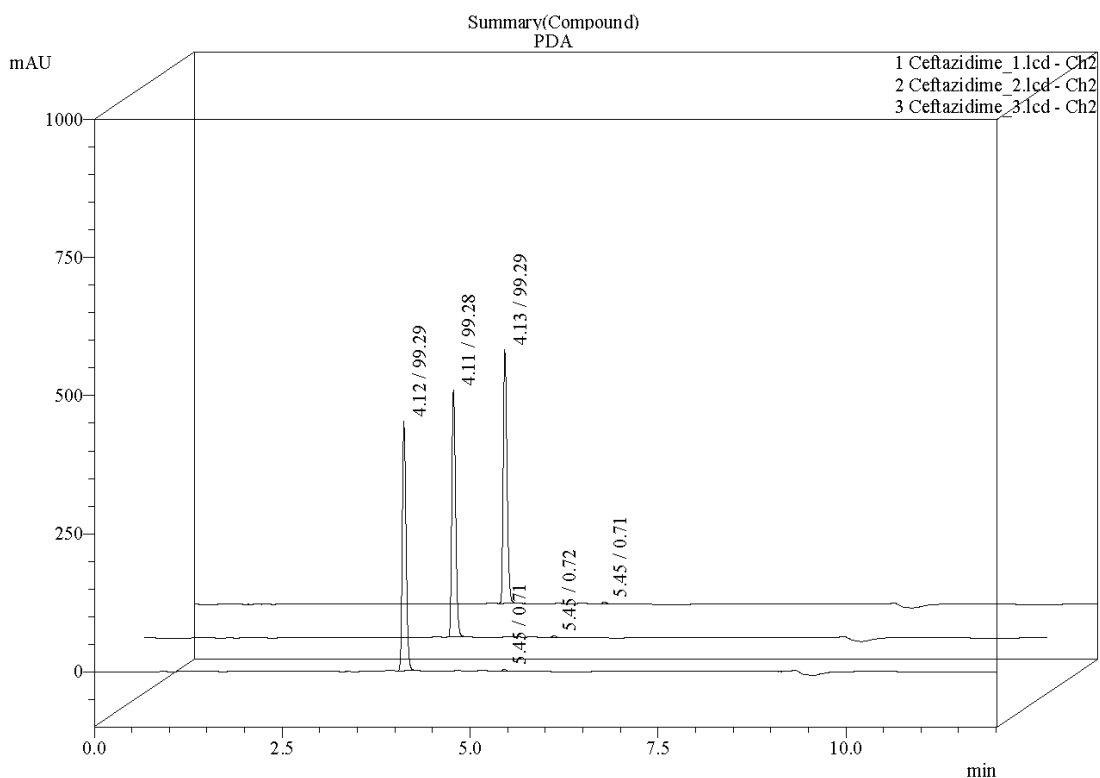
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.83	1750026	97.13	1.00000	509.06	266/235/224/489/681
2	6.84	51769	2.87	1.00000	12.92	271/485/567/630/681
Total		1801795	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2.265nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.85	1744371	97.14	1.00000	570.10	266/235/224/484/420
2	6.85	51364	2.86	1.00000	13.89	271/485/420/463/592
Total		1795735	100.00			

Figure 63: HPLC/PDA chromatogram of cefpirome



<Peak Table>

PDA Ch2 255nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.13	1590618	99.29	1.00000	669.00	255/484/635/471/668
2	5.45	11426	0.71	0.99999	5.49	247/255/485/421/397
Total		1602044	100.00			

<Peak Table>

PDA Ch2 255nm

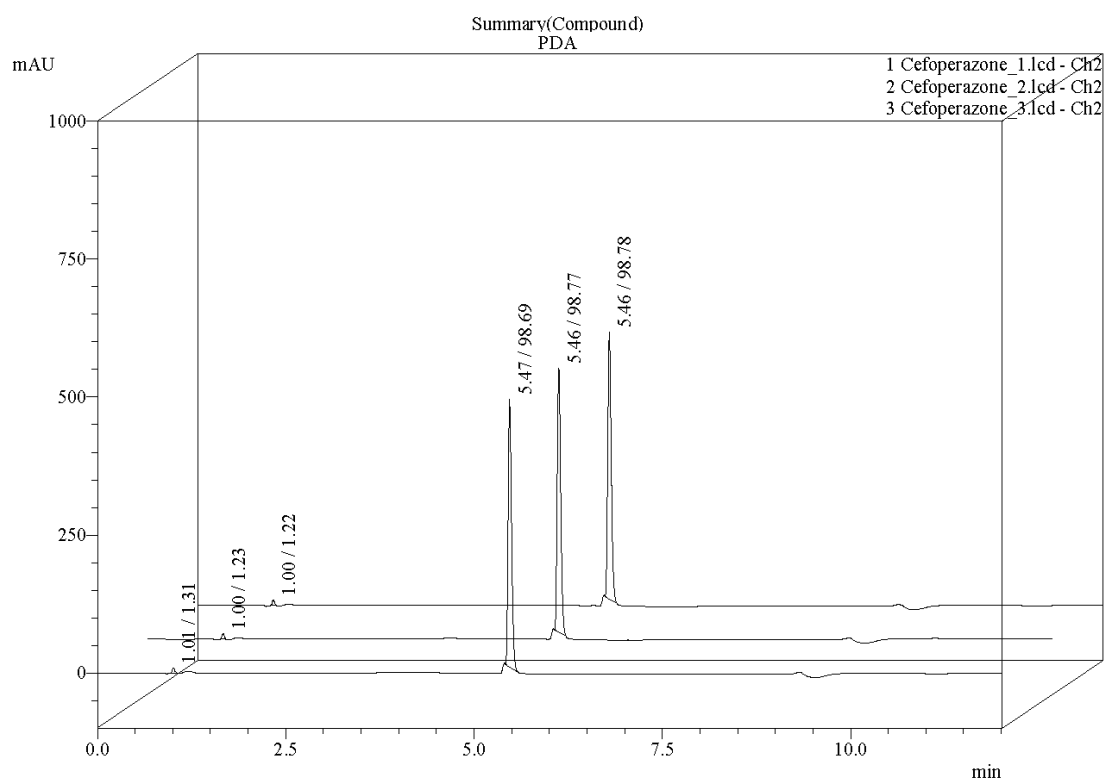
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.11	1586094	99.28	1.00000	609.50	255/484/635/471/668
2	5.45	11578	0.72	0.99999	5.16	254/484/386/564/635
Total		1597672	100.00			

<Peak Table>

PDA Ch2 255nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.12	1587521	99.29	1.00000	665.81	255/484/632/411/668
2	5.45	11424	0.71	1.00000	5.62	239/255/485/421/397
Total		1598945	100.00			

Figure 64: HPLC/PDA chromatogram of ceftazidime

**<Peak Table>**

PDACh2 230nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.00	18884	1.22	0.97801	9.16	616/787/774/674/721
2	5.46	1531144	98.78	1.00000	438.49	229/266/632/615/565
Total		1550027	100.00			

<Peak Table>

PDACh2 230nm

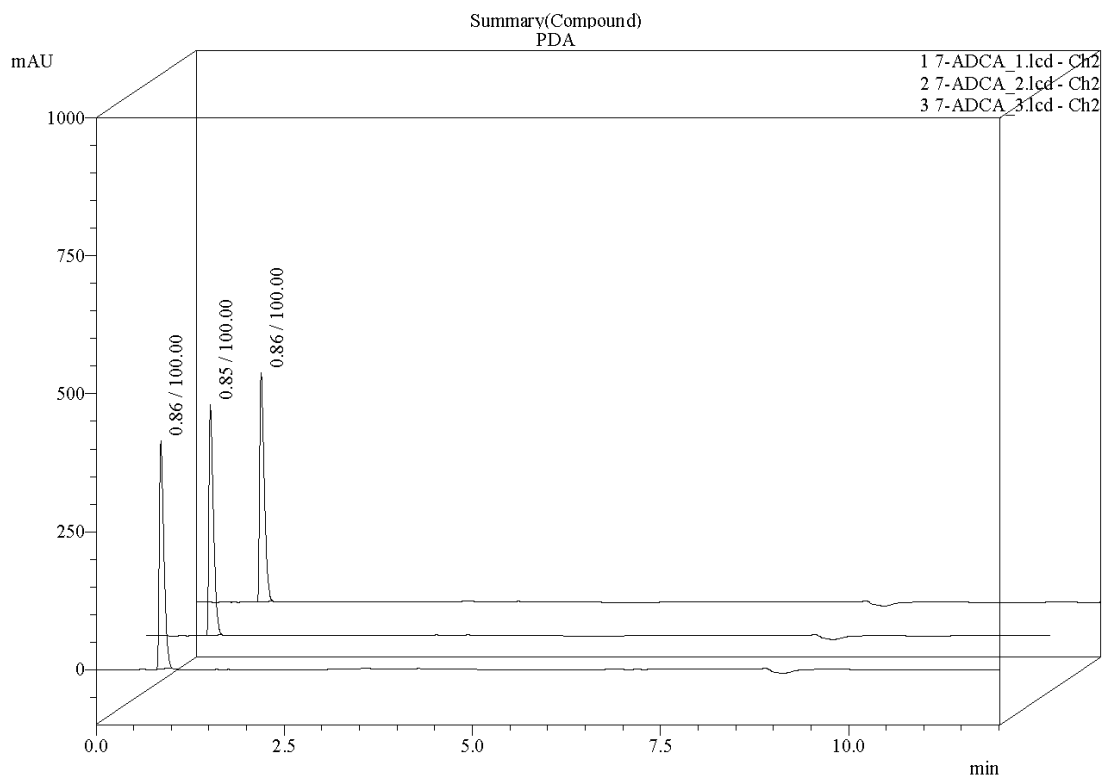
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.00	19009	1.23	0.98697	8.63	616/594/774/674/709
2	5.46	1523200	98.77	1.00000	419.34	229/266/655/495/412
Total		1542209	100.00			

<Peak Table>

PDACh2 230nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.01	20400	1.31	0.99461	10.22	616/668/720/531/496
2	5.47	1538525	98.69	1.00000	510.53	229/266/658/583/435
Total		1558925	100.00			

Figure 65: HPLC/PDA chromatogram of cefoperazone

**<Peak Table>**

PDACh2 265nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.86	1762555	100.00	1.00000	518.29	264/631
Total		1762555	100.00			

<Peak Table>

PDACh2 265nm

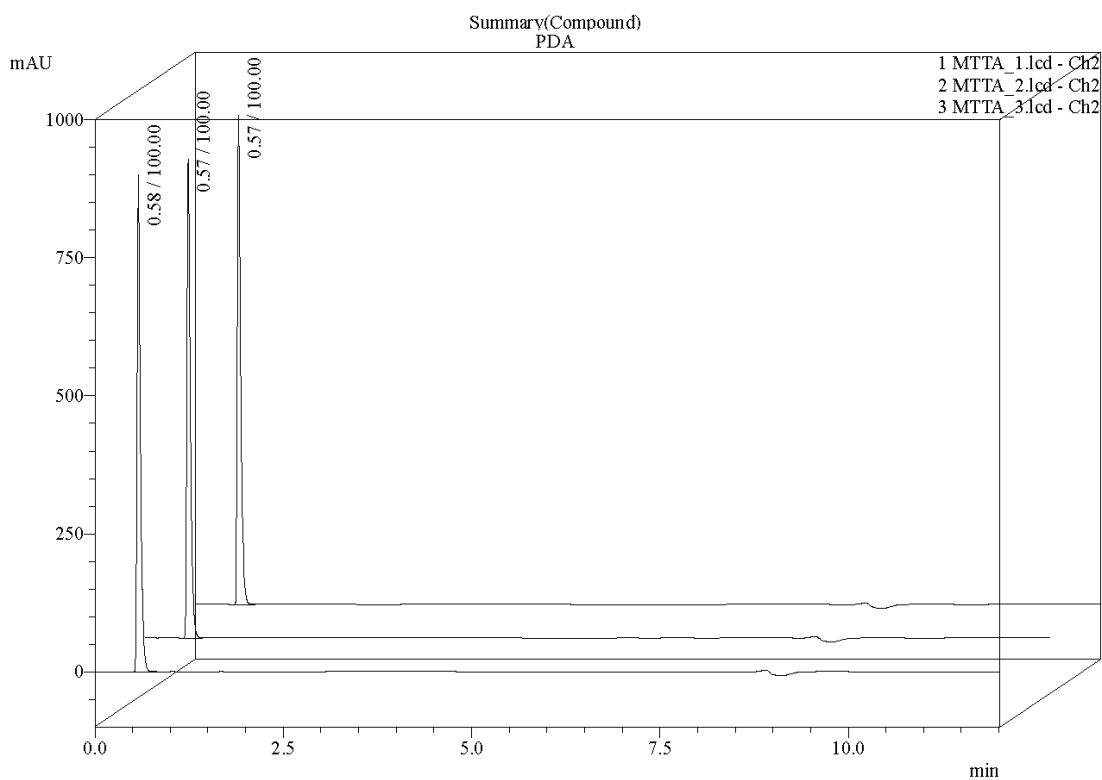
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.85	1756325	100.00	1.00000	538.88	264/320,660
Total		1756325	100.00			

<Peak Table>

PDACh2 265nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.86	1748962	100.00	1.00000	503.50	264/382,440
Total		1748962	100.00			

Figure 66: HPLC/PDA chromatogram of 7-ADCA

**<Peak Table>**

PDA.Ch2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.57	2766212	100.00	1.00000	1323.18	235/206
Total		2766212	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 235nm

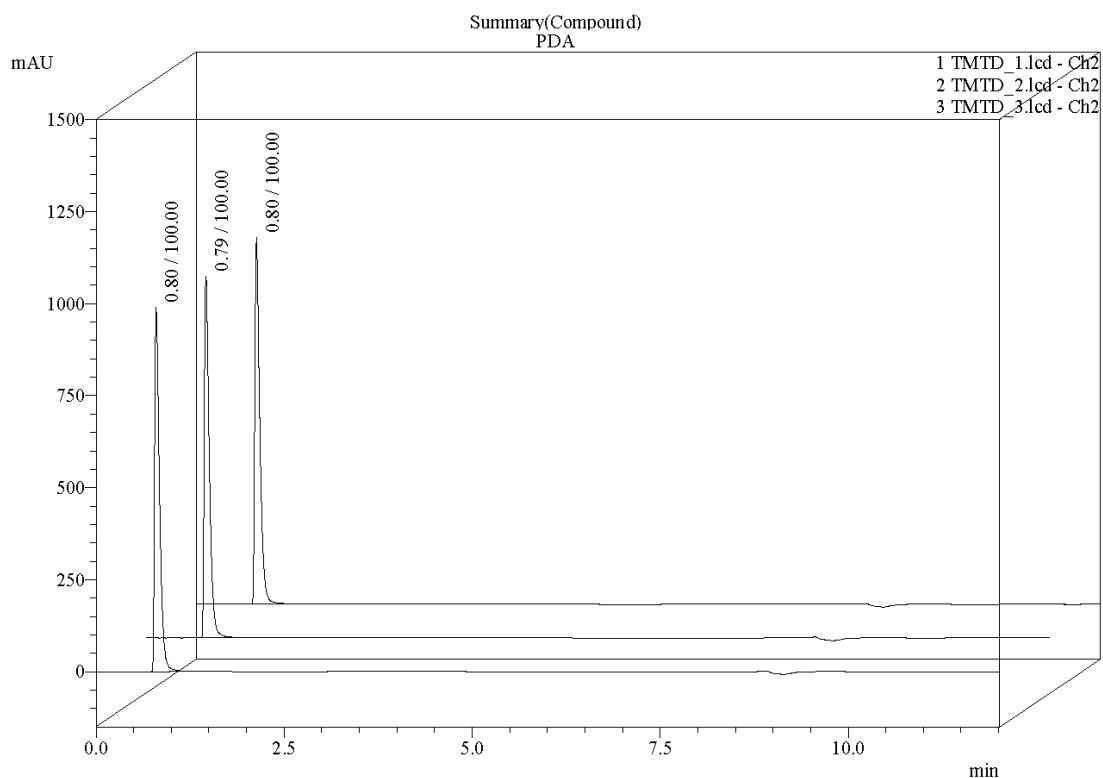
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.57	2758729	100.00	1.00000	1385.79	235/206/640
Total		2758729	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.58	2761936	100.00	1.00000	1402.83	235/206/394/624
Total		2761936	100.00			

Figure 67: HPLC/PDA chromatogram of MTTA

**<Peak Table>**

PDA.Ch2 278nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.80	4588877	100.00	1.00000	1609.32	278/235
Total		4588877	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 278nm

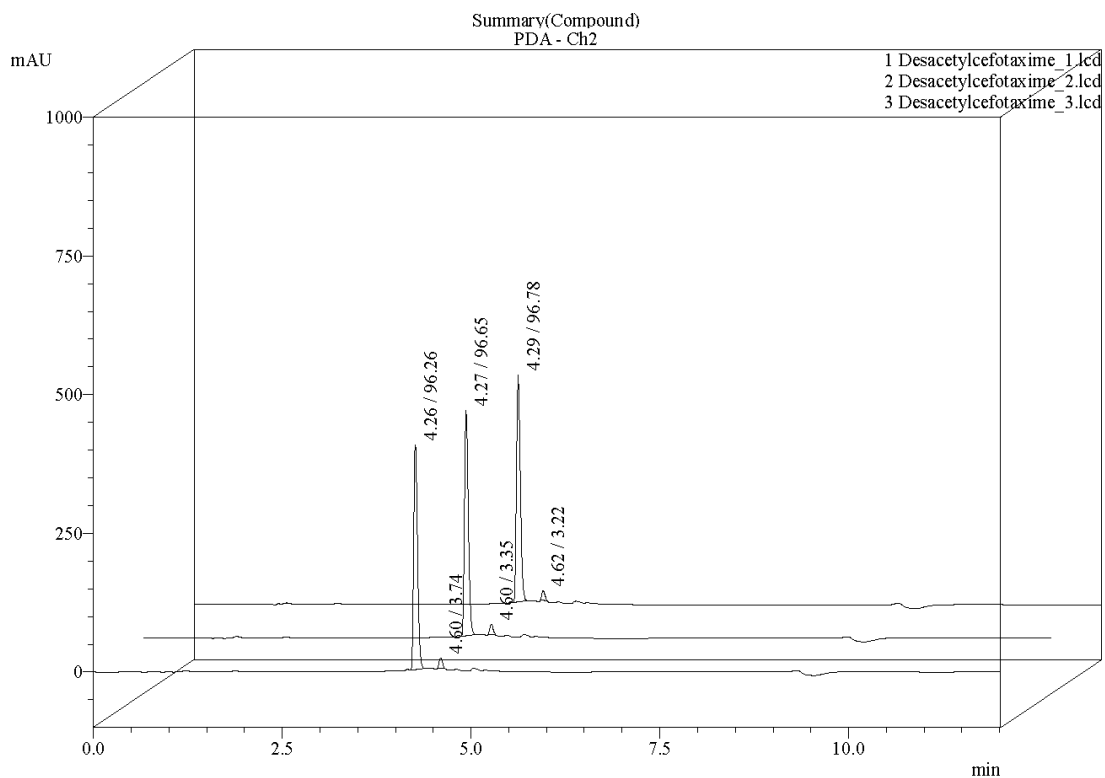
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.79	4585085	100.00	1.00000	1564.04	278/235
Total		4585085	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 278nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	0.80	4528445	100.00	1.00000	1585.34	278/235/650
Total		4528445	100.00			

Figure 68: HPLC/PDA chromatogram of TMTD

**<Peak Table>**

PDA.Ch2.235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.29	1430094	96.78	1.00000	404.16	234/583/668/750
2	4.62	47561	3.22	1.00000	17.54	238/694/469/753
Total		1477654	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2.235nm

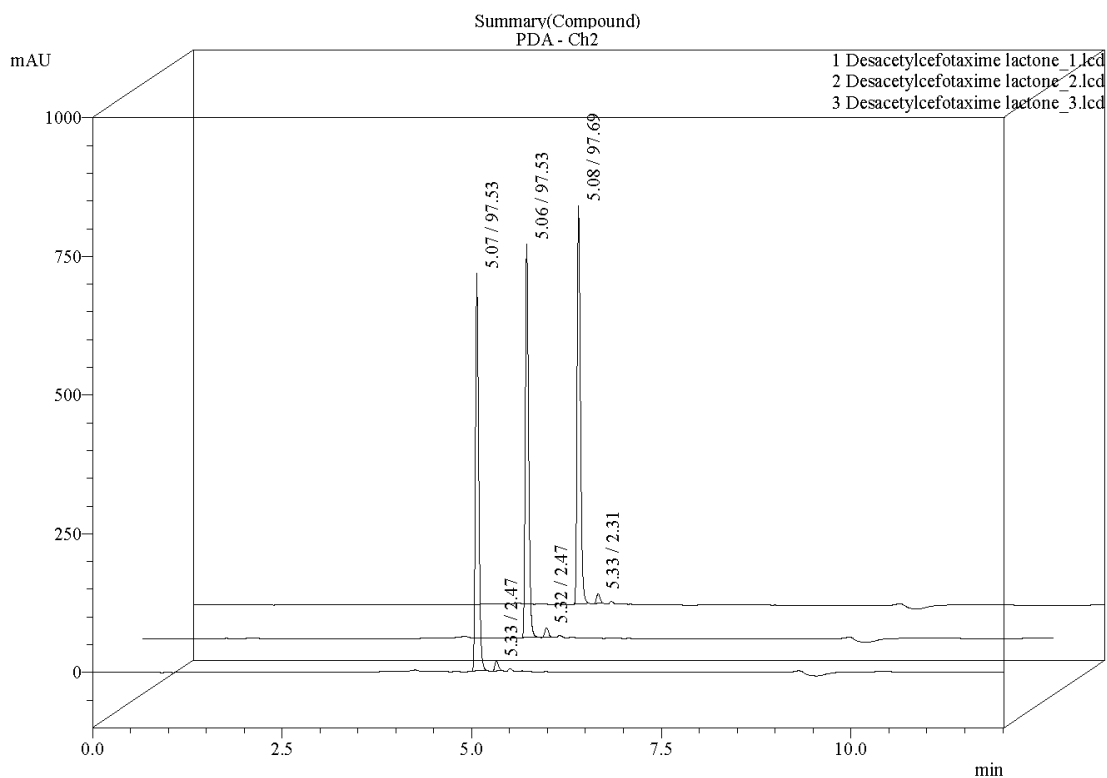
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.27	1429324	96.65	1.00000	362.90	234/630/482/679
2	4.60	49478	3.35	1.00000	15.90	237/658/487/679
Total		1478802	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2.235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	4.26	1434370	96.26	1.00000	382.95	234/484/403/668/692
2	4.60	55798	3.74	1.00000	18.36	237/655/403/615
Total		1490168	100.00			

Figure 69: HPLC/PDA chromatogram of desacetylcefotaxime



<Peak Table>

PDACh2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	5.08	2150010	97.69	1.00000	675.90	235/292.658/683/435
2	5.33	50836	2.31	1.00000	15.96	249/583/889/442/752
Total		2200846	100.00			

<Peak Table>

PDACh2 235nm

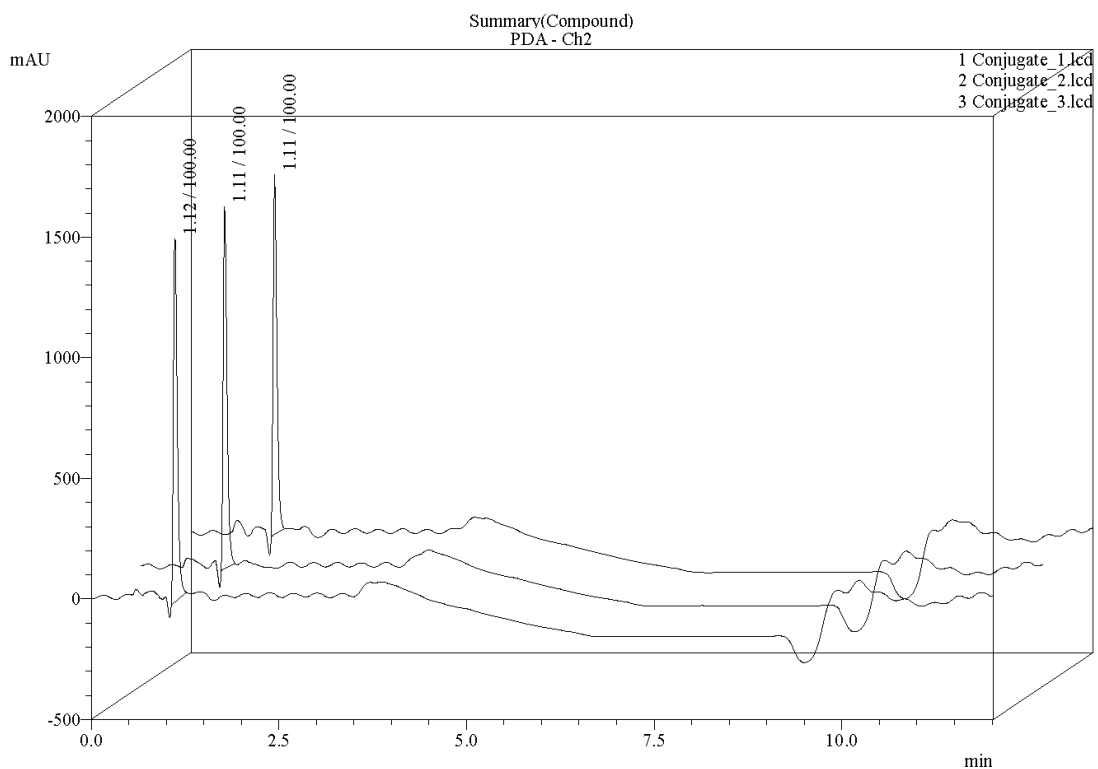
Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	5.06	2141465	97.53	1.00000	650.08	235/292.483/639/685
2	5.32	54289	2.47	1.00000	15.71	242/484/638/680
Total		2195744	100.00			

<Peak Table>

PDACh2 235nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	5.07	2136735	97.53	1.00000	679.01	235/292/427/615
2	5.33	54111	2.47	1.00000	16.18	239/484/433/404/615
Total		2190846	100.00			

Figure 70: HPLC/PDA chromatogram of desacetylcefotaxime lactone

**<Peak Table>**

PDA.Ch2 205nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.11	5270021	100.00	1.00000	63.22	204/260/660
Total		5270021	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 205nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.11	5369830	100.00	1.00000	64.64	204/259/617/660
Total		5369830	100.00			

<Peak Table>

PDA.Ch2 205nm

Peak#	RT	Area	Area%	Peak Purity Index	S/N	Lambda Max
1	1.12	5540577	100.00	1.00000	68.47	204/258/271/660
Total		5540577	100.00			

Figure 71: HPLC/PDA chromatogram of octalysine-ceftriaxone conjugate

APPENDIX D: CERTIFICATE OF APPROVAL





COA No. 630/2015

IRB No. 131/58

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4493

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : Relationship Between the Structure and Immunogenicity of Ceftriaxone

Study Code : -

Principal Investigator : Weena Arjharn, R.Ph.

Affiliation of PI : Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

Review Method : Full board

Continuing Report : At least once annually or submit the final report if finished.

Document Reviewed :

1. Research Protocol Version 2 / Date 27 August 2015
2. Protocol Synopsis Version 2 / Date 27 August 2015
3. Information sheet for research participant (For healthy volunteers) Version 2 / Date 27 August 2015
4. Informed Consent Form (For healthy volunteers) Version 2 / Date 27 August 2015
5. Form data recorded healthy volunteers Version 2 / Date 08 September 2015



6. CURRICULUM VITAE

7. GCP Training

Signature:  Signature: 
(Emeritus Professor Tada Sueblinvong MD) (Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)
Chairperson Member and Secretary
The Institutional Review Board Secretary The Institutional Review Board

Date of Approval : September 17, 2015

Approval Expire Date : September 16, 2016

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

All approved investigators must comply with the following conditions:

1. Strictly conduct the research as required by the protocol;
2. Use only the information sheet, consent form (and recruitment materials, if any), interview outlines and/or questionnaires bearing the Institutional Review Board's seal of approval ; and return one copy of such documents of the first subject recruited to the Institutional Review Board (IRB) for the record;
3. Report to the Institutional Review Board any serious adverse event or any changes in the research activity within five working days;
4. Provide reports to the Institutional Review Board concerning the progress of the research upon the specified period of time or when requested;
5. If the study cannot be finished within the expire date of the approval certificate, the investigator is obliged to reapply for approval at least one month before the date of expiration.
6. If the research project is completed, the researcher must be form the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

* A list of the Institutional Review Board members (names and positions) present at the meeting of Institutional Review Board on the date of approval of this study has been attached. All approved documents will be forwarded to the principal investigator.



COA No. 630/2015

IRB No. 131/58

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4493

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซฟไตรอะโซน

เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : เกสัชกรหญิงวิณา อาจหาญ

สังกัดหน่วยงาน : คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทบทวน : คณะกรรมการเต็มชุด

รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

เอกสารรับรอง :

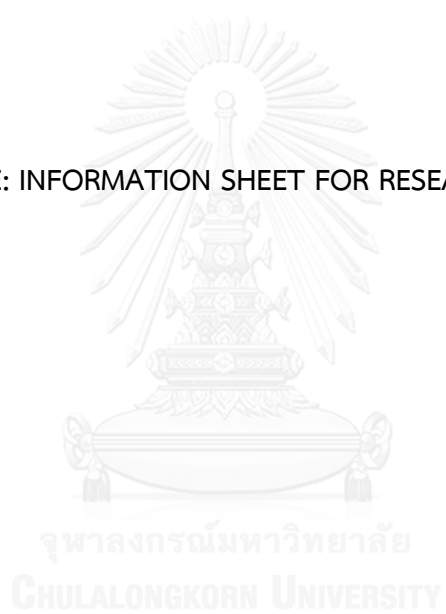
1. โครงร่างการวิจัย Version 2 / Date 27 August 2015
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ Version 2 / Date 27 August 2015
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี) Version 2 / Date 27 August 2015
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย (สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี) Version 2 / Date 27 August 2015
5. แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลอาสาสมัครสุขภาพดี Version 2 / Date 08 September 2015


นักวิจัยทุกท่านที่ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

1. ดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ในโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด
2. ใช้เอกสารแนะนำอาสาสมัคร ใบยินยอม (และเอกสารเชิญเข้าร่วมวิจัยหรือใบโฆษณาถ้ามี) แบบสัมภาษณ์ และหรือ แบบสอบถาม เฉพาะที่มีตราประทับของคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมเท่านั้น และส่งสำเนาเอกสารดังกล่าวให้กับผู้เข้าร่วมวิจัยจริงรายแรกมาที่ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน
3. รายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงที่เกิดขึ้นหรือการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมวิจัยใดๆ ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ภายใน 5 วันทำการ
4. ส่งรายงานความก้าวหน้าต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ตามเวลาที่กำหนดหรือเมื่อได้รับการร้องขอ
5. หากการวิจัยไม่สามารถดำเนินการเสร็จสิ้นภายในกำหนด ผู้วิจัยต้องยื่นขออนุมัติใหม่ก่อนอย่างน้อย 1 เดือน
6. หากการวิจัยเสร็จสมบูรณ์ผู้วิจัยต้องแจ้งปิดโครงการตามแบบฟอร์มของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* รายชื่อของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (ชื่อและตำแหน่ง) ที่อยู่ในที่ประชุมวันที่รับรองโครงการวิจัยได้แนบมาด้วย เอกสารที่รับรองทั้งหมดจะถูกส่งไปยังผู้วิจัยหลัก

APPENDIX E: INFORMATION SHEET FOR RESEARCH PARTICIPANT



 <p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี (Information sheet for research participant)</p>
---	---

ชื่อโครงการวิจัย : ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซฟไตรอะโซน

ผู้สนับสนุนการวิจัย : ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ : เภสัชกรหญิงวิมา อาจหาญ
ที่อยู่ : ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ : 092-4546165 (มือถือ)

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

ชื่อ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บดินทร์ ทิวสุวรรณ
ที่อยู่ : ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ : 02-2188310 (ที่ทำงาน), 094-2425456 (มือถือ)

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

ชื่อ : อาจารย์ เภสัชกร ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ
ที่อยู่ : ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ : 02-2188310 (ที่ทำงาน), 085-1733394 (มือถือ)

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 3


ชื่อ : รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจตชนง แก้วสงคราม
ที่อยู่ : ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ : 02-2564579 (ที่ทำงาน), 086-6177737 (มือถือ)

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 4

ชื่อ : นายภัทรวิจน์ ดันตวรสิทธิ์
ที่อยู่ : ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ : 02-2564579 (ที่ทำงาน), 081-3744407 (มือถือ)



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 131 / 58	
Date of Approval 17 ก.ย. 2558	

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p style="text-align: center;">เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี (Information sheet for research participant)</p>
--	--

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้มีสุขภาพดีและไม่มีประวัติการแพ้ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทม (Beta-lactam antibiotics) ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวินิจฉัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวินิจฉัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆเพิ่มเติม กรุณาซักถามจากผู้ทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียกกลุ่มที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยาในกลุ่มบีต้าแลคแทมเป็นยาในกลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วยสมาชิกจำนวนมาก สามารถแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม กลุ่มที่สำคัญคือ เพนิซิลลิน (Penicillins) และเซฟาโลสปอริน (Cephalosporins) ปัจจุบันยาทั้งสองกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้รักษาอาการเจ็บป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย ทำให้มีโอกาสพบอุบัติการณ์การแพ้ยาสูง หากผู้ป่วยมีประวัติแพ้หรือสงสัยว่าแพ้ยาตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มบีต้าแลคแทม แพทย์หรือเภสัชกรอาจจะหลีกเลี่ยงการส่งจ่ายยาในกลุ่มบีต้าแลคแทมทั้งหมด ทำให้ผู้ป่วยถูกจำกัดทางเลือกทางการรักษาและสูญเสียโอกาสในการใช้ยาที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมกับอาการเจ็บป่วย ดังนั้นการตรวจเพื่อวินิจฉัยการแพ้ยาเพื่อยืนยันชนิดของยาที่แพ้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตัดสินใจเลือกใช้ยาของแพทย์หรือเภสัชกร ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีชุดทดสอบการแพ้ทางผิวหนังจำหน่ายในท้องตลาด แต่ชุดทดสอบดังกล่าวก็มีความเจาะจงต่อเฉพาะเพนิซิลลิน แต่ไม่เจาะจงต่อเซฟาโลสปอริน ทำให้ปัจจุบันยังขาดแคลนเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการแพ้ยาในกลุ่มเซฟาโลสปอริน การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินจึงมีความสำคัญ และจะทำให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ที่จะนำไปสู่การพัฒนาชุดทดสอบการแพ้ยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินต่อไปในอนาคต


เนื่องจากเซฟไตรอะโซนเป็นยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินที่มีปริมาณการใช้และมีรายงานการแพ้มากที่สุด จึงถูกเลือกมาเพื่อเป็นตัวแทนของยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินเพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของยาเซฟไตรอะโซน จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 10 คน



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 131 / 54	Page 2 of 5
Date of Approval..... 17 ก.ย. 2559	

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี (Information sheet for research participant)</p>
--	--

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้แล้ว ผู้วิจัยจะขอซักประวัติการแพ้ยา หากท่านไม่มีประวัติการแพ้ยา กลุ่มบีต้าแลคแทม ผู้วิจัยจะขอเจาะเลือดของท่านประมาณ 4 ซ้อนชา (20 มิลลิลิตร) เพื่อนำไปใช้เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของยาเซฟไตรอะโซน

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความร่วมมือจากท่านในการให้ข้อมูลประวัติการแพ้ยาตามความเป็นจริง

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการเจาะเลือดของท่าน 1 ครั้ง ประมาณ 4 ซ้อนชา (20 มิลลิลิตร) เพื่อนำไปใช้เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของยาเซฟไตรอะโซน ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก มีอาการช้ำจากการเจาะเลือดได้บ้าง อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน


ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆเกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆเกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอลงตัวออกจากโครงการวิจัย



<p>INSTITUTIONAL REVIEW BOARD</p> <p>Faculty of Medicine, Chulalongkorn University</p> <p>IRB No. 121 / 56</p> <p>Date of Approval 17 Nov. 2558</p>

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี (Information sheet for research participant)</p>
--	--

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การพัฒนาชุดทดสอบการตรวจเพื่อวินิจฉัยการแพ้ยาเซฟาโลสปอรินเพื่อยืนยันชนิดของยาที่แพ้ เพื่อให้แพทย์หรือเภสัชกรสามารถเลือกใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมในผู้ป่วยที่แพ้หรือสงสัยว่าแพ้ยาในกลุ่มนี้ได้ อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยแพ้ยากลุ่มบีต้าแลคแทมโดยรวมทุกคน

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที และท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ เภสัชกรหญิงวิภา อาจหาญ เบอร์โทรศัพท์ 092-4546165 (มือถือ) ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย แต่ท่านจะได้รับค่าเดินทางและเงินชดเชยการสูญเสียรายได้จำนวน 300 บาท

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา โดยไม่มีผลกระทบใดๆทั้งสิ้น


การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่สามารถนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่าน ผู้ทำวิจัยและผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลจากการซักประวัติการแพ้ยาของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ เภสัชกรหญิงวิภา อาจหาญ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No. 104/56	
Date of Approval 17 ก.ย. 2558	

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-04/4.0</p> <p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี (Information sheet for research participant)</p>
--	--

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย

การจัดการกับตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ

ตัวอย่างชีวภาพที่ได้จากอาสาสมัคร ผู้วิจัยจะทำลายตามวิธียาตามมาตรฐานทันทีที่เสร็จสิ้นการวิจัย

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่เกิดโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ 3 ชั้น โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4493 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ


ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.....	131 / 58
Date of Approval.....	17 Oct. 2558

APPENDIX F: CONSENT FORM



	<p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: right;">AF 10-05/4.0</p> <p style="text-align: center;">เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย (สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี)</p>
---	---	---

การวิจัยเรื่อง **ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซฟไตรอะโซน**

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....

และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้ต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้


ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.	131 / 58
Date of Approval.....	17 ก.ย. 2558

	<p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>AF 10-05/4.0 เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย (สำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี)</p>
---	--	--

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพ

- ไม่มีตัวอย่างชีวภาพ
 มีแต่ไม่มีการขอเก็บ
 มีและขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า ยินยอม
 ไม่ยินยอม

ให้เก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD	
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	
IRB No.	131 / 54
Date of Approval	17 ก.ย. 2558

VITA

NAME OF AUTHOR: Weena Arjharn

DATE AND PLACE OF BIRTH: September 26, 1984, Chanthaburi, THAILAND

EDUCATION: Bachelor of Science in Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

WORK EXPERIENCE:

Bioanalyst at Medica Innova Co., Ltd. (2007-2011) - Develop and validate bioanalytical method to analyze drug in biological samples.

PUBLICATION:

Arjharn W, Vongsutilers V, Thantiworasit P, Suthumchai N, Klaewsongkram J, Tuesuwan B. Relationship between the structure and immunogenicity of ceftriaxone. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016;40(Special Issue):5-8.