Alexandria University

Faculty of Pharmacy

Department of Industrial Pharmacy

Protein–Polysaccharide Hybrid Nano-carriers for tumor targeted combined drug delivery

Thesis

Submitted to the Department of Industrial Pharmacy

Faculty of Pharmacy, Alexandria University

In partial Fulfillment of the requirements for the degree of

Master of Science

In

Pharmaceutical sciences

(Industrial Pharmacy)

By

Dalia Mohammed Kabbary Abdulhamid

B.Pharm. Sci (2014), Alexandria University

2017

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.H
Serial No : 230
Classification : 615.19

في الوقت الحاضر، يسبب سرطان الرئة 23٪ من إجمالي الوفيات المرتبطة بالسرطان في جميع أنحاء العالم، متجاوزا نسبة الوفيات الناجمة عن (القولون والمستقيم والبنكرياس) وعلاوة على ذلك، فإنه من المسلم به أيضا أن سرطان الرئة لديه أكثر الوفيات شدة، مع الحد الأدنى من معدل البقاء على قيد الحياة. يتم تصنيف سرطان الرئة بشكل رئيسي إلى شكلين (ذو الخلايا الصغيرة او الغير صغيره). وفقا لمجتمع السرطان الأمريكي لعام 2017 فان سرطان الرئة يؤدى الى وفاه حاله من كل 4 حالات مصابه بالسرطان.

تشمل طرق علاج سرطان الرئة الجراحة، والعلاج الكيميائي، والعلاج الإشعاعي، و / أو العلاجات المستهدفة. تعتمد أهلية أي من هذه الطرق العلاجية للعلاج على نوع ومرحلة سرطان الرئة. ومع ذلك، عادة ما تعتبر الجراحة طريقة غير مؤهلة لان التشخيص في كثير من الأحيان من المرضى يكون في مرحلة متقدمة. وعلى الرغم من الجهود الضخمة لتطوير المؤشرات الحيوية الجديدة التي تساعد على التشخيص المبكر، فإن هذا الهدف لم يتحقق بعد. سواء كان ذلك بمفرده أو بالاشتراك مع طرائق العلاج الأخرى. يعتبر العلاج الكيميائي هو اللاعب الرئيسي في علاج سرطان الرئة.

العلاج الكيميائي التقليدي لسرطان الرئة بالرغم من فاعليته الشديدة ,له اثار جانبية متعددة مثل نقص المناعة و تزايد السمّيّة حيث انها تؤثر على الخلايا السرطانية و الخلايا الطبيعية على حد سواء مما يزيد من معاناة و آلام المرضى و لهذا يتعين علينا البحث عن علاج مناسب لسرطان الرئة ذا التأثير الطبي عالي مع التقليل من الآثار الجانبية بقدر الامكان والذى تكفله تقنيه جزيئات النانو حيث ان الموصلات النانومتريه تعد من الأنظمة الذكية التي يكمن ان تحمل كمية اكبر من العلاج و حمايته من التكسير داخل الجسم و تستهدف مواقع الورم دون الخلايا السليمة.

الجسيمات النانوية الدهنية الصلبة هو نظام جذب اهتماما متزايدا على مدى السنوات الماضية كحامل للأدوية. الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة هي الحاملات الغروية للعقاقيرالتي أدخلت في عام 1991 وتمثل نظام الناقل البديل إلى النواقل الغروية التقليدية وذلك يرجع الى مميزاتها عن باقي الأنظمة الاخرى. فأنها سهله التحضير وتجنب استخدام المذيبات العضوية، وكذلك تتيح الفرصة لإدراج كميه كبيره من العقاقير وتسمح للتحكم بمعدل انطلاق العقار. كما يمكن تحميلها بالعقاقير المحبة للماء والمركبات الكارهة للماء على حد سواء. كما انها غير سامة بيولوجيا. كما انها ايضا تتميز بحجم صغير يصل ال (100-50) نانومتري فهذا يتيح الاستهداف السلبي لتلك الجسيمات. علاوة على ذلك فان تلك الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة تسمح بالتفاعل الالكتروستاتيكي وتكوين طبقه تلو طبقه من عديد السكر والبروتينات للاستهداف النشط للأورام.

وتُلقى هذه الدراسة الضوء على استحداث نظام توصيل من الجسميات النانومتر يه الدهنية الصلبة المحملة بعقاقيري البربرين والراباميسين واستعمالها في علاج سرطان الرئة. فعلى الرغم من فعاليتهما في علاج أنواع مختلفة من السرطان الا ان هناك عقبات تعرقل توصيل هذه الادوية بشكل مثالي وهذا ما تتناوله هذه الدراسة.

وتشتمل الدراسة الحالية على جزئيين:

الجزء الأول: جسيمات دهنية نانومترية مغلفة باللاكتوفرين والهيالويرونيك لاستهداف سرطان الرئة والتوصيل المشترك لعقاري البربرين والراباميسين.

الفصل الأول: الجسيمات الدهنية النانومترية الصلبة المغلفة بطبقات متتالية باللاكتوفرين والهيالويرونيك لاستهداف سرطان الرئة والتوصيل المشترك لعقاري البربرين والراباميسين.

في هذا الفصل تم تحضير الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة عن طريق المزج الساخن وذلك للتوصيل المشترك لعقاري البربرين والراباميسين لاستهداف خلايا سرطان الرئة. وجدت طريقة فعالة للفصل بين العقارين وقياس عقاري البربرين و الراباميسين في نفس الوقت عن طريق جهاز كروماتوغرافيا الضغط العالي. البربرين عقار محب للماء لذا فانه من الصعوبة تحقيق معدل انحباس عالي بداخل الجسيمات الدهية الصلبة. لذلك تم استغلال مجموعة الأمونيوم الرباعية في البربرين لتشكيل مركب ايونى غير محب للماء مع كبريتات لوريل الصوديوم وديوكسيكولات الصوديوم بواسطة تجفيف التجميد ووجد أن هذا المركب الايونى الغير محب للماء يمكن أن يغير قيمة (Log P). من أجل دراسة دور هذا المركب الايونى الغير محب للماء، تم إجراء اختبار كفاءة التقسيم المشترك بواسطة طريقة القارورة المهتزة، ووجد ان قيمة (Log P) ل BER/SLS ، BER/SDCهي 0.278 و 1.313 على التوالي بالمقارنة مع البربربيرن -1.54 .
وقد أشارت نتائج معدل الانطلاق أن المركب الأيوني الغير محب للماء لا يؤدي فقط لتحسين معدل الانحباس في الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة، ولكنه أيضا يسمح بالتحكم في معدل الانطلاق لعقار البربرين ذو الذوبانية الفائقة. كان الافراج عن راباميسين من الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة بطيئة جدا، حيث تم الافراج عن 5.6٪ فقط خلال 24 ساعة الأولى. واستمرت كمية الدواء المفرج عنه في الزيادة وبلغت 18.4٪ بعد 5 أيام.

لإعداد نظام نانومتري قادر على استهداف الورم، أعدت الصيغ الغير مطعمة ب (بروتين اللاكتوفيرين) وعديد السكر (الهيالورونيك) كمثال للصياغات ذات التوجيه السلبي بينما تم تطوير الصيغ الاخري للاستهداف النشط للورم عن طريق تغليف الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة اعتمادا على التفاعل الالكتروستاتى بطبقه من (بروتين اللاكتوفيرين) تليها طبقه ثانيه من عديد السكر (الهيالورونيك) لاستهداف مستقبلات (CD44) . وقد تم اختيار الصيغ المثلى اعتمادا على سمات جودتها من حيث حجم البلورات السائله النانومتريه ومعدل جهد زيتا الكهربي وكفاءة التغليف.

وأشارت النتائج السمية للخلايا في المختبر إلى تأثير التآزر لآلية العمل البربرين والراباميسين التي زادت من التأثير المضاد للورم ضد الخلايا A549 من كل دواء على حدة. وأظهرت الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة المغلفة بطبقات متعددة من اللاكتوفرين والهيالويرونيك أعلى إمكانات السامة للخلايا. ويمكن أن يكون السمية الخلوية المعززة التي اظهرتها الأخيرة بسبب وجود حمض الهيالويرونيك كطبقة خارجية على سطح الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة المغلفة مما تسهل عملية الاستهداف النشطة بوساطة التفاعل معCD44-receptor مما أدى إلى زيادة التركيز داخل الخلايا.

أظهرت النتائج ان عمليه التجفيف بالتجميد على التحضيرات المختلفة لا تؤثر على حجم الجزيئات النانومترية عن طريق حساب النسبة بين حجم الجزيئات النانومتريه قبل وبعد عمليه التجفيف بالتجميد والمسمى ب (redispersibility index).
كما تم فحص تأثير التحضيرات المختلفة على تحلل كرات الدم الحمراء عن طريق قياس نسبه تحلل كرات الدم الحمراء عند الطول الموجي 545 نانومتر وتم اثبات ان تلك المستحضرات آمنه وان نسبه التحلل في خلايا الدم الناتجة عن هذه المستحضرات هي في المعدل المقبول (تحت 5%) وامنة الاستخدام.

وأظهرت الدراسات الخلوية على خلايا A549 ان معدل امتصاص او دخول الجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة قد زاد بصورة واضحة بعد تغليفها بطبقات متتالية من اللاكتوفرين والهيالويرونيك مقارنة بتلك الغير مغلفة مما يعزز دول أهمية دور الاستهداف النشط لعلاج سرطان الرئة.

<u>الفصل الثاني:</u> اعداد وتوصيف مركب الراباميسين فوسفوليبد المغلف للجسيمات النانومترية الدهنية الصلبة لاستهداف والتوصيل المشترك لعقاري البربرين والراباميسين

تم تحضير مركب راباميسن فوسفوليبد بنسبه 1: 2 بتكوين طبقة رقيقة من الراباميسن فوسفوليبد عن طريق تبخير المذيبات العضوية في المبخر الدوار عند 40 درجة مئوية و50 دورة في الدقيقة. أبقيت القارورة تحت فراغ لمدة 1 ساعة لضمان إزالة كاملة من المذيبات المتبقية. تم ترطيب طبقة الفيلم الرقيقة المكونة وذلك باستعمال الجسيمات النانو مترية الصلبة المحملة بعقار البربرين المعدة على النحو الموصوف سابقا. وقد تم تكوين مركب راباميسن فوسفوليبد ليغلف المركبات النانو مترية الدهنية الصلبة لمحاولة زيادة معدل انطلاق الراباميسين حيث انه سبق واظهر معدل انطلاق بطيء جدا من الجسيمات النانو مترية الدهنية الصلبة. هذا وقد أظهرت نتائج معدل الانطلاق ان راباميسن فوسفوليبد يمكن ان يحسن معدل الانطلاق في المرحلة الأولى حيث ان 9.3% من عقار الراباميسين انطلق بعد 4 ساعات فقط في بالمقارنة فان المركبات الدهنية الصلبة لم تظهر معدل انطلاق في تلك الفترة.

<u>الجزء الثاني: مستنشق بودرة جافة من التركيبات النانو مترية للتوصيل الرئوى المشترك لعقاري البربرين والراباميسين.</u>

<u>الفصل الأول:</u> الاعداد والتوصيف الرئوي لمستنشق بودرة جافة من التركيبات النانو مترية للتوصيل الرئوي المشترك لعقاري البربرين والراباميسين

نادرا ما ينجح نظام الحقن الوريدي فقط وذلك لان كمية صغيرة جدا من الأدوية العلاج الكيميائي تستهدف مواقع ورم الرئة، حتى عندما تعطى بجرعة عالية. معظم أدوية العلاج الكيميائي تعمل على الخلايا الطبيعية، مما يثبط نموها مما يجعل المريض ضعيفا للغاية، ويمكن أن يؤدي إلى الموت لذلك، التسليم الدقيق للأدوية العلاج الكيميائي لموقع الورم هو الخطوة الأكثر أهمية لزيادة معدل البقاء على قيد الحياة من مرضى سرطان الرئة. ويمكن أن يمثل تسليم الرئوي بديلا مثيرا للاهتمام للطرق التقليدية للإدارة لعلاج سرطان الرئة.

تم تحضير مساحيق بودرة جافة قابلة للاستنشاق عن طريق تقنية التجفيف بالرش بواسطة المتراكبات النانو مترية المحملة بالعقارين عن طريق استخدام حامل مناسب للتجفيف. ببساطة، اضافة حامل/مزيج من حوامل

التجفيف على مستحلب من الجسيمات النانو مترية الدهنية الصلبة بنسب مختلفة. ويتم التجفيف باستخدام جهاز التجفيف بالرذاذ المعملي. كما تم اجراء فحص لخصائص المتراكبات النانو مترية المحضرة بطريقة الرش بالرذاذ وتقييم الأداء والخواص الرذاذي للمساحيق الجافة بواسطة الترسيب لتحديد السلوك الهوائي الحركي من حيث كمية الناتج والخصائص الهوائية الديناميكية للاستنشاق بتحديد الجزء القادر على الوصول إلى الرئة نظريا وجرعته المنبعثة ومتوسط القطر الهوائي الحركي. من خلال التجارب العملية تبين أن الجسيمات المجهرية الدقيقة المحضرة بواسطة mannitol: maltodextrin: leucine لها القدرة على توصيل أكثر كمية للرئة الداخلية بنسبه FPF تصل الى أكثر من 50%. وقد اظهر المجهر الإلكتروني ان هذه المساحيق المستنشقة لديها شكل كروي منتظم ذو سطح مجعد. هذا وقد تبين من نتائج المسح التفاضلي الكالوريمتري (DSC) قدرة ال maltodextrin على تثبيط معدل تبلور الmannitol .

<u>الفصل الثاني</u>: التقييمات البيونوجية لمقارنة فعالية الاستنشاق والحقن الوريدي للنواقل النانومترية مزدوجة التحميل والمغلفة بطبقات متعددة

تم اجراء فحص التأثير العلاجي للتحضيرات المختلفة على حيوانات التجارب المصابة بسرطان الرئة عن طريق تحفيز اصابتها بسرطان الرئة كيمائيا بمادة اليوريثان .تمت هذه الدراسة على عدد 36 من ذكور فئران التجارب بعد تحفيز اصابتها بسرطان الرئة عن طريق تحفيز اصابتها بسرطان الرئة كيمائيا بمادة اليوريثان وتم تقسيمها عشوائيا الي ستة مجموعات على ان تحوي كل مجموعه من5 او 6 فئران كما يلي مجموعه للفئران السليمة؛ مجموعه للفئران المصابة والتي لا تتلقي اي علاج ؛ ؛ مجموعه لكل من ماده الراباميسين و ماده البربرين في حالتها الحرة للاستنشاق ؛ مجموعه للجسيمات النانومتر يه الصلبة المحملة بالعقارين ؛ومجموعه للجسيمات النانومتر يه الصلبة السابقة المتناولة بالرذاذ ؛ مجموعه للجسيمات النانو متريه الصلبة المحملة بالعقارين والمغلفة بطبقات متعددة من بروتين اللاكتوفرين وحمض الهياليورونيك المتناولة بالاستنشاق على ان يراعى توحيد تركيزات المادة الفعالة واعطاء الجرعة المحسوبة يوم بعد يوم لمده اسبوعين بطريقة التناول المناسبة لجميع المجموعات وقد تم اثبات الفاعلية المطلقة للمستحضرات النانومتر يه فيما يلي:

قدره المستحضرات النانو متريه في تحفيز Caspase 3 مقارنه بالتي تتلقى المواد الفعالة في حالتها الحرة او المجموعة التي لا تتلقى اي علاج مما يدل على فاعليتها في توجيه الخلايا السرطانية نحو مرحله الموت الخلوي المبرمج المسمى ب (apoptosis) كما تم قياس دلالات الاورام المختلفة تشمل (**VEGF**) وتم أثبات فاعليه المستحضرات النانومتر يه المستنشقة في خفض معدلات هذه الدلالات مقارنه بالتي تتلقى المواد الفعالة في حالتها الحرة او المجموعة التي لا تتلقى اي علاج مما يثبت فاعليه استهدافه للخلايا السرطانية. وعلى هذا وبالتحليل الاحصائي لجميع النتائج تبين النجاح الباهر لهده النواقل النانومتر يه المحملة بمواد طبيعية مضادة للسرطان في التحكم وعلاج سرطان الرئة في فئران التجارب.