صياغة عقار الأولانزابين فى صورة حويصلات ممتدة المفعول

رسالة مقدمة من

الصيدلانية/ مايسه عبدالهادى محمد
بكالوريوس فى العلوم الصيدلية
كليه الصيدلة – جامعة مصر الدوليه

للحصول على درجة الماجستير في العلوم الصيدلية (صيدلانيات)

كليه الصيدلة – جامعة عين شمس

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور/ حامد عبدالعزيز سلامة
أستاذ التكنولوجيا الصيدلية
المركز القومى للبحوث

الدكتور/ جيهان عبدالسميع عوض
أستاذ مساعد الصيدلانيات
وقائم بأعمال رئيس قسم الصيدلانيات
كلية الصيدلة – جامعة عين شمس

الدكتور/ أمانى اسامه كامل
مدرس الصيدلانيات
كليه الصيدلة – جامعه عين شمس

٢٠١١

الملخص العربي

يعد الأولانزابين أحد عقاقير الجيل الثالث الغير تقليدية لعلاج بعض الأمراض النفسية مثل انفصام الشخصية ، الهذيان و الإكتئاب، كما يستخدم لتقليل جرعات المركبات الأفيونية لمرضى السرطان، و كبديل لمركبات البيوتيروفينون و الفينوثيازين التي تستعمل كمضادات للقيء بعد العلاج الكيميائي لهؤلاء المرضى. و قد أعتمد هذا العقار من هيئة الغذاء و الدواء عام ١٩٩٦. يوجد عقار الأولانزابين في الأسواق على هيئة أقراص تفقد نسبة كبيرة من جرعتها العلاجية في الجهاز الهضمي قبل وصولها للدورة الدموية.

تهدف هذه الدراسة إلى استحداث صياغة لعقار الأولانزابين تستعمل عن طريق الأنف و ذلك باستخدام الكيوبوزومات و الترانسفيرزومات كحويصلات حاملة و موصلة للعقاقير ذات تأثير ممتد تضمن توصيل عقار الأولانزابين إلى المخ بجرعات كافية مما يؤدى إلى تلافى الآثار الجانبية لهذا العقار.

تنقسم هذه الدراسة إلى ثلاثة أجزاء:

الجزء الأول: تحضير و توصيف حويصلات كيوبوزومية للأولانزابين.

و قد تم في هذا الجزء تحضير حويصلات كيوبوزومية للأولانزابين باستخدام مادة ل – α – فوسفاتيديل كولين و كل من بولوكزامر٤٠٧ (Poloxamer 407) وبولوكزامر ١٨٨ (Poloxamer 188) بنسب جزيئية مختلفة بتقنية تبخير الطبقة الرقيقة. و قد دُرس تأثير نوع البولوكزامر المستخدم ، والنسبة الجزيئية لمكونات الحويصلات على كل من الشكل الخارجي للحويصلات، حجمها ، كفاءة احتوائها للعقار، مرونة غشائها و انطلاق الدواء منها.

ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها على النحو التالي :

١. أمكن تحضير كيوبوزومات الأولانزابين باستخدام ماده ل – α – فوسفاتيديل كولين و كل من مادة البولوكزامر ٤٠٧ ومادة البولوكزامر ١٨٨ بالنسب الجزيئية ١:١٠٠، ١:٤٠، ١:٢٠ و ١:١٠ بتقنية تبخير الطبقة الرقيقة.

٢. أظهرت الصور الفوتوغرافية للميكروسكوب الإلكتروني النافذ الشكل المكعب لكيوبوزومات الأولانزابين.
٣. كانت كيوبوزومات الأولانزابين المحضرة باستخدام البولوكزامر ١٨٨ اصغر حجما من مثيلاتها المحضرة باستخدام البولوكزامر ٤٠٧.
٤. كانت كفاءة احتواء الكيوبوزومات المحضرة باستخدام البولوكزامر ٤٠٧ للعقار أعلى من مثيلاتها المحضرة باستخدام البولوكزامر ١٨٨.
٥. تميزت كيوبوزومات العقار المحضرة من مادتي الفوسفاتيديل كولين و البولوكزامر ١٨٨ بالنسب الجزيئية ٢٠:١ و ١٠:١ بمرونتها العالية.
٦. كانت كفاءة انطلاق عقار الأولانزابين من الكيوبوزومات المحضرة باستخدام البولوكزامر ٤٠٧ أعلى من تلك المحضرة – بنفس النسب الجزئية للمكونات – باستخدام البولوكزامر١٨٨.
٧. تميزت الحويصلات الكيوبوزومية المحتوية على الفوسفاتيديل كولين و البولوكزامر ١٨٨ بالنسبة الجزيئية ١٠:١ بأعلى مرونة غشائية و بقيم مناسبة لكل من حجم الحويصلات ، كفاءة احتوائها للعقار و كفاءة انطلاق العقار منها.
٨. أثبتت دراسات المسح الحراري التفاضلي (DSC) لكيوبوزومات الأولانزابين المحتوية على مادتي الفوسفاتيديل كولين و البولوكزامر ١٨٨ بالنسبة الجزيئية ١٠:١ ذوبان العقار داخل الأغشية الدهنية مزدوجة الطبقة لهذه الكيوبوزومات.

وعلى أساس النتائج السابقة فقد تم اختيار كيوبوزومات الأولانزابين المحتوية على مادتي الفوسفاتيديل كولين و البولوكزامر ١٨٨ بالنسبة الجزيئية ١٠:١ للدراسات البيولوجية.

الجزء الثاني : تحضير و توصيف حويصلات ترانسفيرزومية و ليبوزومية للأولانزابين.

تم تحضير ترانسفيرزومات الأولانزابين باستخدام مادة ل – α – فوسفاتيديل كولين و منشطات حواف مختلفة (Edge activators) مثل دى أوكسيكولات الصوديوم ، سبان ٦٠ ، كريموفور ى ل ، بريج ٥٨ وبريج ٧٢ بنسب جزئية مختلفة بتقنية تبخير الطبقة الرقيقة ، كما تم تحضير حويصلات ليبوزومية للعقار باستخدام الفوسفاتيديل كولين بنفس التقنية. و قد دُرس تأثير نوع منشط الحواف، و النسبة الجزيئية لمكونات الحويصلات على كل من الشكل الخارجي للحويصلات ، حجمها ، كفاءة احتوائها للعقار ، مرونة غشائها و انطلاق الدواء منها.

ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها على النحو التالي :

١. أمكن تحضير حويصلات للأولانزابين باستخدام ماده ل – α – فوسفاتيديل كولين و كل من منشطات الحواف دى أوكسيكولات الصوديوم ، سبان ٦٠ ، كريموفور و بريج ٧٢ بالنسب الجزيئية ١:١٠٠، ١:٤٠، ١:٢٠، ١:١٠ و ١:٥ و بريج ٥٨ بالنسبة الجزيئية ١:٥ بتقنية تبخير الطبقة الرقيقة.
٢. أظهرت صور الميكروسكوب الإلكتروني النافذ الشكل الكروي للحويصلات المحضرة ماعدا تلك المحتوية على فوسفاتيديل كولين و بريج ٥٨ بالنسب الجزيئية ١:١٠٠، ١:٢٠ و ١:١٠ فقد كانت شجرية الشكل.
٣. تراوحت أقطار حويصلات الأولانزابين ما بين ٣١٠ و ٨٨٥ نانو متر و قد اختلفت هذة الاقطار باختلاف نوع منشط الحواف المستخدم كالآتي: كيريموفور > بريج ٧٢ > دى أوكسيكولات الصوديوم > سبان ٦٠.
٤. تراوحت كفاءة احتواء الحويصلات المحضرة للعقار من ١٧. ٥٥ إلى ٥٩. ٧٥ % ، و قد اختلفت كمية العقار المحتواه تبعا لنوع منشط الحواف و تركيزه فى الحويصلات.
٥. أمكن تحضير ترانسفيرزومات ذات مرونة عالية لعقار الأولانزابين باستخدام الفوسفاتيديل كولين مع دى أوكسيكولات الصوديوم بالنسب الجزيئية ١:٤٠، ١:٢٠ و١:١٠ و مع سبان ٦٠ بالنسب الجزيئية ١:١٠ و ١:٥.
٦. تميزت حويصلات الأولانزابين الترانسفيرزومية المحضرة باستخدام الفوسفاتيديل كولين و دى أوكسيكولات الصوديوم أو الكيريموفور بالنسب الجزيئية ١:١٠ و ١:٥ و تلك المحضرة باستخدام الفوسفاتيديل كولين و سبان ٦٠ بالنسبة الجزيئية ١:٥ بأعلى قيم لكفاءة انطلاق العقار منها.
٧. تميزت حويصلات الأولانزابين الترانسفيروزومية المحضرة باستخدام الفوسفاتيديل كولين وكل من دى أوكسيكولات الصوديوم و سبان ٦٠ بالنسبة الجزيئية ١:١٠ بأعلى مرونة غشائية كما تميزت بقيم مناسبة لكل من حجم الحويصلات ، كفاءة احتوائها للعقار و كفاءة انطلاق العقار منها.
٨. أثبتت دراسات المسح الحرارى التفاضلى لحويصلات الأولانزابين الترانسفيرزومية المحضرة باستخدام الفوسفاتيديل كولين وكل من دى أوكسيكولات الصوديوم و سبان ٦٠ بالنسبة الجزيئية

١:١٠ وكذلك لحويصلات العقار الليبوزومية ذوبان العقار داخل الأغشية الدهنية مزدوجة الطبقة لهذه الحويصلات.

وعلى أساس النتائج السابقة فقد تم اختيار حويصلات الأولانزابين الترانسفيرزومية المحضرة باستخدام ل – α – فوسفاتيديل كولين وكل من دى أوكسيكولات الصوديوم و سبان ٦٠ بالنسبة الجزيئية ١:١٠ و كذلك حويصلات العقار الليبوزومية للدراسات البيولوجية.

الجزء الثالث : دراسات بيولوجية على حويصلات الأولانزابين.

إحتوى هذا الجزء على أبحاث بيولوجية – على فئران التجارب البيضاء – شملت دراسة حركية الدواء ، كفاءة وصوله للمخ و فحوص تحليل الأنسجة لحويصلات الأولانزابين المختارة.

وقد أدت هذه الدراسات إلى النتائج الآتية:

١. إختلف أقصى تركيز للأولانزابين في بلازما الفئران على النحو التالي: محلول الحقن الوريدي للعقار > الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم > الكيوبوزومات > الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام سبان ٦٠ > الليبوزومات.
٢. وصل أقصى تركيز للعقار فى بلازما الفئران بعد عشر دقائق من تعاطيها محلول الحقن الوريدى، الكيوبوزومات و الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم ، و بعد ثلاثين دقيقه، و خمس دقائق من تعاطيها الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام سبان ٦٠ و الليبوزومات على التوالى.
٣. كان أقصى تركيز للعقار في مخ الفئران على النحو التالي : محلول الحقن الوريدي للعقار > الترانسفيروزومات المحضرة باستخدام سبان ٦٠ > الكيوبوزومات > الترانسفيروزومات المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم > الليبوزومات.
٤. وصل أقصى تركيز للعقار فى مخ الفئران بعد ثلاثين دقيقة من تعاطيها محلول الحقن الوريدى أو الترانسفيرزومات، أما بالنسبة للكيوبوزومات و الليبوزومات فقد وصل أقصى تركيز للعقار بعد ستين دقيقه و عشر دقائق على التوالي.
٥. اختلفت مساحة منحنى تركيز العقار في البلازما مع الزمن عن مده ست ساعات على النحو الآتي: محلول الحقن الوريدي للعقار > الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام سبان ٦٠ >

الكيوبوزومات > الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم > الليبوزومات.

٥.١. تميزت حويصلات عقار الأولانزابين الكيوبوزومية و الترانسفيرزومية بإتاحة حيوية مطلقة $\left[{AUC_{0-360\min}(IN)} \big/ {AUC_{0-360\min}(IV)} \right] x100$ عالية في بلازما الفئران مقارنة بالليبوزومات.

٥.٢. إختلفت الإتاحة الحيوية النسبية $[AUC_{0-360\min}(cubosome\ or\ transfersome)/\mathrm{AUC}_{0\text{-}360\min}(liposome)]x100$ للأولانزابين في بلازما الفئران على النحو التالي : الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام سبان ٦٠ > الكيوبوزومات > الترانسفيرزومات المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم.

٦. تميزت كيوبوزومات العقار و كذلك الترنسفيرزومات المحتوية على سبان ٦٠ بأعلى قيم لمساحة منحنى تركيز العقار فى المخ مع الزمن عن مدة ست ساعات بينما اختصت الليبوزومات بأقل قيمة لهذه المساحة.

٧. تميزت ترانسفيرزومات الأولانزابين المحضرة باستخدام سبان ٦٠ بقيم عالية لكل من الزمن اللازم لوجود العقار بنصف أقصى تركيز له في البلازما ($t_{1/2}$) و متوسط زمن بقاء العقار في البلازما (MRT).

٨. كان متوسط زمن بقاء العقار في مخ الفئران بعد حقنها بمحلول العقار و كذلك بعد إعطائها حويصلات الأولانزابين الكيوبوزومية و الترانسفيرزومية عن طريق الأنف أعلى منه بعد إعطائها حويلات العقار الليبوزومية.

٩. تميزت حويصلات العقار الكيوبوزومية و الحويصلات الترانسفيرزومية المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم بأعلى كفاءة لتوصيل العقار لمخ الفئران.

١٠. كان انتقال الدواء لمخ فئران التجارب بعد إعطائها – عن طريق الأنف – الحويصلات الكيوبوزومية والحويصلات الترانسفيرزومية المحضرة باستخدام دى أوكسيكولات الصوديوم عن طريق الدورة الدموية ، أما بالنسبة للحويصلات الترانسفيرزومية المحضرة باستخدام سبان ٦٠ و الحويصلات الليبوزومية فكان انتقال الدواء عن طريق الدورة الدموية و منطقه العصب الشّمى معاً.

١١. تبين من الفحص الميكروسكوبى لأنسجة فئران التجارب الأنفيه المعالجة بحويصلات الأولانزابين المحضرة مأمونية إستعمال هذة الحويصلات عن طريق الأنف.

يتبين من هذه الدارسة جدوى استعمال الحويصلات الكيوبوزومية و الترانسفيرزومية كحاملات موصلة لعقار الأولانزابين للمخ عن طريق الأنف حيث تتميز هذه الحويصلات بقدرة كبيرة على توصيل الدواء للمخ بتركيزات كافية مما يؤدى إلى تقليل أعراضه الجانبية.

Mayssa Abdel Hady Mohamed

Abstract

Vesicular Formulation for Controlled Release Olanzapine

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy,
Ain Shams University

This thesis focuses on the development of an intranasal vesicular formulation for olanzapine. Since the target site of olanzapine is the brain, a strategy is thereby desirable, which not only improves the bioavailability by preventing extensive first-pass metabolism, but also provides targeting to the receptor site and bypasses the blood brain barrier (BBB) so as to achieve the desired drug concentration at the site of action. This would prevent availability of the drug at non-targeting sites and reduce its side effects. Drug delivery to the brain is a challenge even though there is relatively high blood flow.

Intranasal administration offers a practical, non-invasive and an alternative route of administration for rapid drug delivery to the brain. It also offers the advantages of the drugs being administered simply, cost-effectively and conveniently. Direct transport of drugs to the brain circumventing the brain barriers following intranasal administration provides a unique feature and better option to target drugs to the brain. However, few formulation factors need to be addressed while designing drug delivery systems for intranasal administration. The formulation should be designed for targeting of drug to the olfactory region of nasal

cavity so as to provide its rapid transport across nasal mucosa, and mucoadhesion phenomenon further helps in drug permeation in the olfactory region along with longer residence time in the posterior nasal cavity by overcoming the nasal mucociliary clearance.

Vesicular systems play an important role in nasal drug delivery to the systemic circulation by overcoming limitations of the nasal route such as ciliary clearance and breakdown by nasal peptidase enzyme. They showed promising results not only with small molecules, but also with large molecules. Liposomes are one of the vesicular systems which have been widely used to deliver a wide variety of medications *via* the nasal route and offer advantages such as better absorption and better drug retention in nasal mucosa.

The objective of the present study was to utilize cubosomal and transfersomal vesicles as drug carrier systems to develop a novel intranasal formulation for olanzapine capable of targeting the drug to brain.

In the first chapter olanzapine cubosomes were prepared by the use of L–α–phosphatidylcholine and each of poloxamer 407 (Plx 407) and poloxamer 188 (Plx 188) at phospholipid : Plx molar ratios of 100:1, 40:1, 20:1 and 10:1 adopting thin layer evaporation technique. The influence of poloxamer type and phosphatidylcholine : Plx molar ratio on cubosomal morphology, vesicle size, drug entrapment, vesicle membrane elasticity and *in-vitro* drug release was studied. The prepared cubosomal vesicles showed a typical cubic shape with an average diameter ranging from 363 to 645 nm. The prepared cubosomes had drug entrapment efficiency-values in the range of 64.92 to 76.10 %. Olanzapine cubosomes containing

phospholipid : Plx 188 in molar ratios of 20:1 and 10:1 were characterized by having a high vesicle membrane elasticity. Cubosomes prepared by the use of Plx 407 and Plx 188 showed similar values for drug release efficiency. The cubosomal formulation containing phospholipid : Plx 188 in a molar ratio of 10:1 was characterized by having the highest vesicle membrane elasticity in addition to having reasonable values for vesicle size, drug entrapment efficiency and drug release efficiency and was, thus, selected for the biological studies. DSC studies for this formulation confirmed incorporation of olanzapine inside the lipid matrix of the vesicles.

In the second chapter olanzapine vesicles were prepared by the use of L–α–phosphatidylcholine and each of the edge activators Na deoxycholate (SDC), Span® 60, Cremophor® EL, Brij® 58 and Brij® 72 at phospholipid : edge activator molar ratios of 100:1, 40:1, 20:1, 10:1 and 5:1 adopting thin layer evaporation technique. Olanzapine liposomes were also prepared using L–α–phosphatidylcholine adopting the same technique. The influence of the type of edge activator and phosphatidylcholine : edge activator molar ratio on transfersomal morphology, vesicle size, drug entrapment efficiency, vesicle membrane elasticity and *in-vitro* drug release was studied. TEM photographs for olanzapine vesicles showed a predominant spherical shape; vesicles containing phospholipid : Brij® 58 in molar ratios of 100:1, 20:1 and 10 :1 had a dendritic shape. The diameter of olanzapine vesicles ranged from 310 to 885 nm. Olanzapine entrapment efficiency for the prepared vesicles ranged from 55.17 to 75.59 %. L–α–phosphatidylcholine together with SDC or Span® 60 were capable to form olanzapine transfersomal vesicles with high deformability at phospholipid : edge activator molar ratios of 40:1, 20:1

and 10:1 for SDC and of 10:1 and 5:1 for Span® 60. Olanzapine transfersomal vesicles prepared by the use of SDC or Cremophor® EL at a phospholipid: edge activator molar ratios of 10:1 and 5:1 as well as those prepared using Span® 60 at a molar ratio of 5:1 were characterized by having the highest values for drug release efficiency. Olanzapine transfersomal vesicles containing L–α–phosphatidylcholine and SDC or Span® 60 at a phospholipid : edge activator molar ratio of 10:1 were characterized by having the highest elasticity in addition to having reasonable values for vesicle size, drug entrapment efficiency, and drug release efficiency and were, thus, selected together with the liposomal vesicles for the biological studies. DSC studies for both transfersomal and liposomal vesicles confirmed incorporation of olanzapine inside the lipid bilayers of these vesicles.

In the third chapter, biological investigations including pharmacokinetic studies (plasma, brain), brain drug targeting efficiency-determinations and histopathological examinations were performed, on Wister albino rats, for the following selected intranasal olanzapine vesicular formulations:

1. Olanzapine cubosomal vesicles containing L–α–phosphatidylcholine : Plx 188 in a molar ratio of 10:1.
2. Olanzapine transfersomal vesicles containing L–α–phosphatidylcholine : SDC in a molar ratio of 10:1.
3. Olanzapine transfersomal vesicles containing L–α–phosphatidylcholine : Span® 60 in a molar ratio of 10:1.
4. Olanzapine liposomal vesicles.

The results indicated that the values of absolute drug bioavailability for the cubosomal and transfersomal vesicles were higher than that for the liposomal vesicles. The values of relative drug bioavailability $[AUC_{0-360min}(cubosomes\,or\,transfersomes)/\mathrm{AUC}_{0\text{-}360min}(liposomes)]x100$ varied in the order of transfersomes containing Span® 60 > cubosomes > transfersomes containing SDC. Both olanzapine cubosomes and the transfersomes containing Span® 60 possessed similar and high values for rat brain $AUC_{0-360min}$. Olanzapine cubosomal vesicles as well as the transfersomal vesicles containing SDC possessed the highest efficiency for targeting the drug to rat brain. The main drug transport pathway to rat brain for the cubosomes and the transfersomes containing SDC was the systemic circulation, while for the transfersomes containing Span® 60 or the liposomes, the drug transport was *via* both systemic and olfactory routes. Histopathological examinations revealed that none of the severe signs such as appearance of necrosis, sloughing of epithelial cells or haemorrhage was detected in any of the tested rats.

The present study revealed that both cubosomal and transfersomal vesicles can be considered as suitable drug carrier systems for nasal delivery of olanzapine. These systems provide brain drug targeting, thus more predictable brain drug levels with consequent reduction of olanzapine side effects would be achieved.

Keywords: Olanzapine, intranasal, vesicular systems, cubosomes, transfersomes, liposomes, pharmacokinetic studies, brain targeting efficiency, histopathological examinations.

Contents

	Page
General Introduction	1
Scope of Work	21
Chapter I: Preparation and Characterization of Olanzapine Cubosomal Vesicles	
Introduction	23
Experimental	28
Methods	
Assessment of calibration curves for olanzapine	29
Preparation of olanzapine cubosomal vesicles	29
Characterization of olanzapine cubosomal vesicles	
Transmission electron microscopy	30
Determination of cubosomal size	30
Determination of olanzapine entrapment efficiency	31
Determination of cubosomal vesicle membrane elasticity	31
In-vitro drug release studies	32
Differential scanning calorimetry	33
Statistical analysis	33
Results and Discussion	
Calibration curves for olanzapine	35
Characterization of olanzapine vesicles	
Morphology of olanzapine vesicles	40
Size of olanzapine vesicles	43
Olanzapine entrapment efficiency	45

Page

Membrane elasticity of olanzapine vesicles 50
In-vitro drug release studies 52
Differential scanning calorimetry 60
Conclusions 63
Chapter II: Preparation and Characterization of Olanzapine Transfersomal and Liposomal Vesicles
Introduction 64
Experimental 67
Methods
Preparation of olanzapine transfersomal vesicles 69
Preparation of olanzapine liposomal vesicles 69
Characterization of olanzapine vesicles
Transmission electron microscopy 69
Determination of vesicle size 69
Determination of olanzapine entrapment efficiency 71
Determination of vesicle membrane elasticity 71
In-vitro drug release studies 71
Differential scanning calorimetry 71
Statistical analysis 71
Results and Discussion
Characterization of olanzapine vesicles
Morphology of olanzapine vesicles 72
Size of olanzapine vesicles 79
Olanzapine entrapment efficiency 85

Page

Membrane elasticity of olanzapine vesicles 90
In-vitro drug release studies 94
Differential scanning calorimetry 108
Conclusions 115
Chapter III: Biological Studies on Olanzapine Vesicles
Introduction 117
Experimental 120
Methods
Assay of olanzapine in rat plasma and brain
Chromatographic conditions 121
Method validation 122
Calibration curves for olanzapine in rat plasma and brain 122
Recovery 122
Accuracy and precision 122
Pharmacokinetic studies and determination of rat brain targeting efficiency for olanzapine vesicles
Administration of olanzapine to rats 123
Preparation of samples for analysis 124
Data analysis 124
Histopathological studies 126
Results and Discussion
Method validation 127