INTRA-ARTIKULÁRIS ALKALMAZÁSÚ NÁTRIUM-HIALURONÁT GÉL SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA

Doktori tézisek

Krüger-Szabó Andrea

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Antal István, Ph.D.
Dr. Zelkó Romána, D.Sc.

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fürst Zsuzsanna, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D.
Dr. Tóthfalusi László, Ph.D.

Budapest
2015

Bevezetés

Az európai népesség egyharmada szenved legalább egyszer élete során reumás megbetegedésben, illetve minden ötödik lakos hosszabb ideig tartó ilyen kezelés alatt áll. Ezzel szemben viszont aránytalanul kevés a kezelésekre szánt intraartikuláris (i.a.) készítmények száma. A reumás megbetegedések több formája is ismert, azonban csak kevés esetben van lehetőség a betegség megelőzésére, illetve a teljes gyógyulásra. A sebészeti beavatkozások mellett jelenleg a gyógyszeres terápiára számos szisztémásan ható készítmény áll rendelkezésre, viszont nagyon kevés a lokálisan alkalmazható hatóanyagok ízületbe injektálható (intraartikuláris) formája. Intraartikuláris készítményekkel az ízületbe történő közvetlen hatóanyag bevitel érhető el, amellyel biztosítható a nagy lokális hatóanyag koncentráció és a csekély szisztémás hatás. A nem-invazív terápiás módszerek sokkal kellemesebb beviteli kapunak számítanak a betegek számára, de nem szabad elfelejtkeznünk az emésztőrendszerbeli vagy a renális mellékhatásokról. Tehát hosszú távon az intraartikuláris terápia kisebb egészségkárosodást okoz.

Az emberi ízület a természet egyik legkiválóbban működő egységét képezi. Szerepe a stabilitás megőrzése, a csontváz mozgatása. Rendkívüli teherbírása mellett is precízen funkcionál végig kísérve az ember életét, amelynek alapja a folyamatosan megújuló csont, porc és ízületi folyadék. Ahhoz, hogy ízületeink súrlódásmentesen funkcionáljanak, rendkívül sima felületre van szükség. Ezt a porc biztosítja, amely stabilan és elasztikusan fedi be a csontot. Az ízületi folyadék, mint egy kenőanyag gondoskodik a porc tápanyaggal és oxigénnel való ellátásáról. Az egészséges ízületben lévő szinoviális folyadék hozzávetőleg 0,5-2 ml, egyik legfontosabb komponense a hialuronsav (HA), amely alapvetően felelős a viszkoelasztikusságáért. A viszkoelaszticitás eredménye, hogy az ízület alacsony frekvenciájú mozgása esetén a viszkózus folyadék kenőanyagként működik, míg nagyobb mechanikai igénybevétel esetén rugalmasan képes tárolni a mechanikai energiát.

A reumás megbetegedések kezelésére szolgáló orális készítmények (pl.: glükokortikoidok, NSAR) nagy hátránya, hogy szedésük során kellemetlen szisztémás

mellékhatások léphetnek fel. További hatóanyagok (pl.: HA) pedig rossz biohasznosíthatóságuk miatt csak parenterális formában alkalmazhatók. Az intraartikuláris injekciókkal ezek a problémák elkerülhetők. Az ízületek természeti adottságainak köszönhetően tehát igen optimális beviteli kapunak számít az intraartikuláris forma. Legtöbbször a kéz-, térd- és lábízületeket érinti a reuma, jó hozzáférhetőségük is az intraartikuláris alkalmazásnak kedvez. A szinoviális folyadékból csak nagyon kevés hatóanyag jut be a vérkeringésbe, így a szisztémás mellékhatások elhanyagolhatók. Az i.a. alkalmazások hátránya a rendkívül nagy fertőzésveszély, főképp, ha többszöri, egymást követő adagolásról van szó. A fertőzés kockázatát, az előírások betartása, steril készítmények használata, a beadás helyének alapos fertőtlenítése csökkenti.

A parenterális készítményekkel, többek között az intraartikulárisakkal szemben is, számos követelményt támasztanak. Az i.a. készítmények esetében a sterilitás elengedhetetlen. Az oldatos készítmények sterilitása nedves és száraz hővel érhető el, amennyiben az összes hatóanyag és segédanyag a folyamat során stabil marad. A többi intraartikuláris gyógyszerforma sterilitását, így a HA esetében is, az anyagok megfelelő előkészítésével és az aszeptikus körülmények maradéktalan betartásával lehet elérni. A HA injekciók sterilitását az oldat steril szűrésével, gamma sugárzással (5 – 10 kGy) vagy gázzal lehet biztosítani. Termikus behatás, nyomás, ultrahangos kezelés, szűrés, keverés vagy maga a fecskendő tönkreteheti a HA láncokat. A lánchasadás a moláris tömeg és ebből kifolyólag a viszkozitás csökkenését okozza.

A fagyasztva szárítás (liofilizálás) olyan eljárás, amely az érzékeny anyagokat képes stabilizálni. További előnyt jelent, hogy az eljárás során az igen alacsony hőmérséklet miatt a készítményben lévő baktériumok száma is csökken.

Korábbi adatok azt mutatják, hogy a liofilizálás hátrányos hatással van a hialuronsav fizikai tulajdonságaira, amely nátrium hialuronát (NaHA) esetében nem volt tapasztalható. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a közepes molekulatömegű hialuronát molekula szabad sav formája a liofilizálás során tömegváltozást szenved, míg a nátrium hialuronát molekulatömege közel változatlan marad.

Munkám során a NaHA mikro- és makroszerkezetbeli változásait tanulmányoztam különböző vizsgálatokkal autoklávozás és fagyasztva szárítás után. Az így kezelt NaHA esetében egyedülállóan került alkalmazásra a pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS), mely fontos információt ad a polimer szerkezetéről. Ez egy olyan módszer, melyet rendkívül jól lehet amorf anyagok vizsgálatára használni.

Célkitűzések

Munkám célkitűzései az alábbiak voltak:

(i) NaHA hidrogélek formulálása a fiziológiás követelményeknek megfelelően;

(ii) NaHA hidrogélek nedves hővel való sterilezése és a bekövetkező szerkezetbeli változások vizsgálata;

(iii) NaHA hidrogélek fagyasztva szárítása és a bekövetkező szerkezetbeli változások vizsgálata.

Módszerek

NaHA gélek előállítása

5,0, 7,5 és 10,0 mg/ml-es NaHA hidrogélek kerültek előállításra. A polimert nátrium-foszfát puffer hozzáadásával homogenizáltam szobahőmérsékleten, majd fóliával lefedve 24 órát hagytam hűtőben duzzadni. 24 óra eltelte után az elpárolgott vizet pótoltam és újra homogenizáltam. A pH és az ozmolaritás értékeket a fiziológiás követelményeknek megfelelően állítottam be.

A hősterilezés hatásának vizsgálata

Az első vizsgálatok arra összpontosultak, hogy megvizsgáljam a hidrogél nedves hővel való sterilezésének hatását a NaHA mikro- és makroszerkezetére, illetve a változások koncentráció-függését. A különböző koncentrációjú NaHA hidrogéleket nedves hővel sterileztem. A mintákat kezelés (sterilezés) nélkül, két órával, illetve egy héttel az autoklávozás (121 °C, 20 perc, 103,4 kPa) után vizsgáltam (Boxer autokláv 30075LR, Boxer Laboratory Equipment Kft., Nagy-Britannia). A kezeletlen és a kezelt géleket 22 ± 0,5 °C-on tároltam 55 ± 2 % relatív páratartalommal.

A fagyasztva szárítás hatásának vizsgálata

A vizes NaHA géleket (5,0, 7,5 and 10,0 mg/ml) nátrium-foszfát puffer segítségével állítottam elő (ahogy a fentiekben már említésre került) és a kapott mintákat fagyasztva szárítottam. A liofilezés Scanvac CoolSafe 100-9 Pro típusú készülékkel történt (LaboGene ApS, Lynge, Dánia), amely három polcos szárító kamrába besüllyesztett mintatartó egységgel volt felszerelve. Egy számítógépes program (Scanlaf CTS16a02) vezérelte a folyamatot, ami a hőmérsékletet és a nyomást folyamatosan regisztrálta.

Újragélesedés (rekonstitúció) vizsgálata

5-5 g fagyasztva szárított mintához 5 ml injekció készítésre alkalmas vizet adtam és mértem a feloldódáshoz/gélesedéshez szükséges időt, és az idő előrehaladtával figyeltem a gél kialakulását.

Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia

A polimer gélek mikroszerkezetét PALS-sal vizsgáltam, amely az o-Ps élettartam-eloszlásán alapszik. A forrás lefedésére egy nagyon vékony alumínium fólia szolgált. A sugárzás exponenciális penetrációjának köszönhetően, az o-Ps élettartam nagyobb intenzitását és kisebb variációját lehetett elérni, mint a szokványos 20-25 µm-es fólia esetében. Mintegy 150 µl (2-3 csepp) került a polimer gélből a fóliára. Az oldószer elpárolgását egy hengeres fémborítás akadályozta meg. A pozitron élettartam vizsgálatokhoz pozitron forrásként a 22-es tömegszámú nátriumot használtam, amely ^{22}NaCl só formában került alkalmazásra. Az aktivitása körülbelül 10^6 Bq volt és az

aktív anyagot két nagyon vékony fólia közzé zártam. A méréseket egy gyors-gyors koincidencia körön alapuló élettartam spektrométerrel végeztem, BaF_2/XP2020Q detektorral és Ortec® mérőelektronikával. A spektrumokat egy sokcsatornás analizátor kártya 4096 csatornájába gyűjtöttem 9000 s-on keresztül, és minden spektrumhoz 10^6 eseményt regisztráltam. A koincidencia beütések száma némileg alacsonyabb volt, mint normális esetben. Ennek oka a két detektor megnövekedett távolsága volt. Ebben a kísérletben a detektorok egymáshoz képest függőlegesen helyezkedtek el. Egy alumínium lemez került az alsó detektorra. Habár ebben az elrendezésben elég sok pozitron elveszett, a jel jelentős része érintetlen maradt. Mivel az alumínium nem termel o-Ps komponenst, így minden jel ugyanabban az életidő tartományban kizárólag a gélből jött. A méréseket 22 ± 0,5 °C-on végeztem. A megbízhatóság növelése szempontjából minden koncentrációhoz három párhuzamos spektrum készült. A párhuzamosok összegzése után a spektrumokat RESOLUTION programmal értékeltem ki. A MELT program a spektrumból való életidő-eloszlás kifejezésére szolgált. Ezek az eredmények a mintákra jellemző szabad térfogat méreteloszlást írják le.

Reológiai vizsgálatok

A reológiai vizsgálatokat Kinexus Pro reométerrel végeztem (Malvern Instruments Kft., Nagy-Britannia). A kapott adatok rSpace for Kinexus Pro 1.3 software-rel kerültek kiértékelésre. Egy kúp és lemez geometriát alkalmaztam, melyek között a rés 0,03 mm volt. A kúp átmérője 50 mm volt. A minta mennyisége 0,57 ml-t tett ki. A minták hőmérsékletét egy Peltier rendszer folyamatosan vezérelte (37 ± 0.1 °C).

Röntgendiffrakciós vizsgálat

Mind a szilárd NaHA por, mind a fagyasztva szárított gélminták szerkezetét röntgen-pordiffraktométerrel (XRPD) tanulmányoztam. Az XRPD spektrumok Bruker D8 Advance röntgen-pordiffraktométerrel Cu Kλl sugárzással (λ = 1.5406 Å) és 3° - 40° (2θ) intervallumon kerültek rögzítésre (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország). A mérési körülmények a következők voltak: cél, Cu; szűrő, Ni; feszültség; 40 kV; áram, 40 mA; időállandó, 0,1 s; szögtávolság 0,007°. A fagyasztva szárítás után a NaHA hidrogélekben nem figyelhető meg amorf kristályos átmenet.

Termoanalitikai vizsgálat

A NaHA termogravimetriás (TG) analízisét METTLER Toledo TGA/DSC 1 (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Svájc) készülékkel végeztem, nitrogénes atmoszférában, 50 ml/perces áramlási sebességgel, 10 °C/perces fűtési sebességgel, 25-300 °C-os hőmérséklet tartományban, 8-15 mg-os mintatömeggel alumínium kapszulában (mint mintatartóban).

A *differenciál pásztázó kalorimetriás (DSC)* vizsgálatokat METTLER Toledo 821e DSC rendszerrel végeztem (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Svájc). Ar atmoszférában, 100 ml/perces áramlási sebességgel, 3-5 mg-os mintákkal, 10 °C/perces fűtési sebességgel, 25-300 °C hőmérséklet tartományban szintén alumínium kapszulában (mint mintatartóban) történtek a vizsgálatok. STAR^{e} software értékelte ki a kapott adatokat.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat (SEM)

A szilárd és a fagyasztva szárított NaHA minták felületi morfológiai felvételeit pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltam (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Kft., Japán). A szórásos bevonó berendezést (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Uckfield, Nagy-Britannia) a minták felületén keletkező elektromos vezetőképesség indukálására alkalmazzák. A levegő nyomása 1,3-13,0 mPa volt. A minták egy arany-palládium bevonatot kapnak argon atmoszférában, egy arany szórásos modul segítségével, magas vákuum bepárlóval (0,1 Pa). A minták vizsgálata során a feszültség 10 kV (áram 10 µA) volt.

Víztartalom meghatározása

A víztartalmat Karl Fischer titrátor alkalmazásával határoztam meg (787 KF Titrino type, Metrohm AG, Herisau, Svájc). A minták titrálása előtt a Hydranal víz ekvivalencia faktorát határoztam meg nátrium-tartarát segítségével (Hydranal víz standard, Sigma-Aldrich Chemie Kft., Taufkirchen, Németország). A víz ekvivalencia faktorát hat párhuzamos mérés átlagából határoztam meg. Az oldószer extra száraz metanol volt, melyet az elektrometriás végpontig titráltunk Karl Fischer reagenssel a mérés előtt (Hydranal-composite 5, Sigma-Aldrich Chemie Kft., Taufkirchen, Németország).

Pontosan 100 mg mintát mértem be a titráló edénybe. Miután diszpergáltam a mintát (1 perc 1500 rpm-en), a Karl Fischer reagenssel végpontig titráltam, három párhuzamos mérést végezve.

Eredmények

Különböző koncentrációjú NaHA hidrogéleket állítottam elő, a fiziológiás körülményeket foszfát pufferrel és injekciókészítésre alkalmas vízzel biztosítottam.
Az előállított minták szupramolekuláris szerkezetét hősterilezés előtt és után vizsgáltam. Az autoklávozás a polimer koncentrációjától függően részben irreverzibilis szerkezeti változást okozott. A polimer szabadtérfogatának és térfogateloszlásának mérésére alkalmazott pozitron élettartam spektroszkópia, valamint a reológiai mérések alapján a hősterilezést a vizsgált teljes koncentráció-tartományban nem szükséges elvetni.
A fagyasztva szárítás során a gél összetételétől függően eltérő mikroszerkezet-változás következett be. A foszfát sókat tartalmazó gélek rendezett, porózus makroszerkezettel voltak jellemezhetőek, amelyek vízzel gyors újra gélesedést mutattak.
A foszfát sók jelenlétében tapasztalt jelenséget nem kísérte a NaHA kristályos-amorf fázisátalakulása. A szupramolekuláris rendezettség nem okozott a funkcióval összefüggő változást, a rekonstitúció után a hidrogélek megőrizték viszkoelasztikus tulajdonságukat.

Következtetések

A parenterálisan alkalmazható nátrium hialuronátot tartalmazó hidrogélek különböző kezelések hatására végbemenő szerkezetváltozásainak feltárásával foglalkoztam. Állati eredetű nátrium hialuronát géleket hővel sterileztem; illetve a makro- és mikroszerkezeti vizsgálatok eredménye alapján fagyasztva szárításos eljárással nátrium hialuronát tartalmú készítményt formuláltam parenterális célokra.

Az injekció formulálás körülményeinek meghatározásához különböző fizikai-kémiai vizsgálati módszerek kombinációját alkalmaztam.

Munkám eredményeként az alábbiak állapíthatóak meg:

- Különböző koncentrációjú intraartikuláris alkalmazásra szánt NaHA hidrogélek formulálhatóak mind hősterilezéssel, mind fagyasztva szárítással.
- A hidrogélek a hősterilezés hatására, koncentrációjuktól függően különböző mértékű, részben irreverzibilis szerkezetváltozást mutattak, amelyet mind a makro-, mind a mikroszerkezet-vizsgáló módszerek eredményei alátámasztottak. Következésképpen a hősterilezés lehetőségét nem szükséges minden esetben elvetni.
- A nátrium-foszfát sókat tartalmazó hidrogélek fagyasztva szárításával kapott minták rendezett, létraszerű makroporózus szerkezetük következtében gyorsabb újra gélesedést mutattak, mint a csak vízzel készültek. A gyors rekonstitúció makro- és mikroszerkezeti vizsgálatok alapján magyarázható.

A NaHA gélek hősterilezése és fagyasztva szárítása során végbemenő szerkezeti változások feltárása hozzájárulhat a megfelelő gyártástechnológia kialakításához annak érdekében, hogy a készítmény hatékonyságának (viszkoszupplementáció) alapjául szolgáló funkcionális tulajdonságát biztosítsuk.

Saját publikációk

A disszertáció alapját képező közlemények

1. Szabó A, Zelkó R, Antal I. (2011) Reumás megbetegedések kezelése intraartikuláris készítménnyel. Acta Pharm Hung, 81: 77-86.
2. Szabó A, Szabó B, Balogh E, Zelkó R, Antal I. (2012) Módosított hatóanyagleadású intraartikuláris készítmények. Acta Pharm Hung, 82: 69-74.
3. Szabó A, Szabó B, Balogh E, Zelkó R, Antal I. (2013) Structural elucidation of hyaloronic acid gels after heat sterilization. Polym Test, 32: 1322-1325.
4. Krüger-Szabó A, Aigner Z, Balogh E, Sebe I, Zelkó R, Antal I. (2015) Microstructural analysis of the fast gelling freeze-dried sodium hyaluronate. J Pharm Biomed Anal, 104: 12-16.

Egyéb közlemények

5. Szabó A. (2011) Magizzunk vagy ne magizzunk, avagy hogyan csinálják a németek?. Gyógyszerészet, 55: 606-610.

Disszertációhoz témájához kapcsolódó előadások

1. Szabó A, Szabó B, Balogh E, Zelkó R, Antal I.
   Intraartikuláris készítmények fejlesztési lehetőségei
   XVII. Gyógyszertechnológiai és IX. Gyógyszer az ezredfordulón Konferencia
   Siófok, Hungary, September 27-29, 2012

2. Szabó A, Zelkó R, Balogh E, Antal I.
   Development and physical characterization of intra-articular injection containing piroxicam and sodium hyaluronate
   8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey, March 19-22, 2012

3. Krüger-Szabó A, Szabó B, Zelkó R, Balogh E, Antal I.
   Structural elucidation of hyaluronic acid gels after heat sterilisation
   9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon, Portugal, March 31-April 3, 2014

4. Krüger-Szabó A, Aigner Z, Sebe I, Balogh E, Zelkó R, Antal I.
   Piroxikámot és nátrium-hialuronátot tartalmazó intraartikuláris injekciós készítmény formulálási vizsgálata
   XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, Hungary, April 10-12, 2014