

**PHARMAKODYNAMISCHE UND PHARMAKOKINETISCHE
UNTERSUCHUNGEN VON GLUCOCORTICOIDEN UND
CHARAKTERISIERUNG NANOPARTIKULÄRER
TRÄGERSYSTEME**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Braem

aus Braunlage

August 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Schäfer-Korting

2. Gutachter: Prof. Dr. R. H. Müller

Datum der Disputation: 12.10.2007

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für meine Familie
und
Anja

Frau Professor Dr. M. Schäfer-Korting danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die wissenschaftlichen Anregungen sowie die stete Gesprächsbereitschaft und ihre Motivationsfähigkeit.

Herrn Professor Dr. R. H. Müller danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens sowie für die Aufnahme in seine Laborräumlichkeiten mit allen notwendigen Geräten zur Herstellung und Charakterisierung von nanopartikulären Zubereitungen. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Mehnert und Herrn Dr. W. Herrmann für Ihre großartige wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung. Ihre wertvollen Ideen haben entscheidend zu der erfolgreichen Durchführung des Dissertationsvorhabens beigetragen. Herrn Professor Dr. B. Kleuser möchte ich für seine wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge besonders danken.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. K. D. Kramer, Institut für Experimentalphysik, FU Berlin, für seine Anregungen und ständige Gesprächsbereitschaft in physikalischen Fragen bedanken. Bei Herrn Dr. T. Blaschke, Institut für Physik, HU Berlin, möchte ich mich für die Durchführung der Messungen mittels der PS bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Bittl und Frau Dr. Panek-Minkin, Institut für Experimentalphysik, FU Berlin, für die Durchführung der ESR Messungen und die stets guten Anregungen. Herrn Paepenmüller, Institut für Pharmazie, TU Braunschweig, gilt mein Dank für die Erstellung TEM Bilder. Herrn Dr. R. Zimmermann, Institut für Chemie, FU Berlin, möchte ich für die großartige Unterstützung bei der Etablierung der Synthesen danken.

Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch, Herrn Dr. Schildknecht sowie dem Ärzteteam des St. Josephs Krankenhaus möchte ich für das Gewebematerial zur Zellgewinnung danken. Frau Dr. I. Fichtner, Max-Delbrück-Centrum, Berlin Buch, danke ich für die Überlassung der Zelllinie A549.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Professor Dr. Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Kleuser danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Unternehmungen. Frau Peggy Schlupp gilt mein Dank für die Hilfe bei der Partikelherstellung sowie Frau Hannelore Gonska für die Isolierung und Kultivierung der Zellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien (NaFöG), ohne deren Förderung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die mit dieser Förderung verbundenen Arbeitsberichte erleichterten die Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift.

Originalarbeiten

Braem C, Blaschke T, Panek-Minkin G, Herrmann W, Schlupp P, Paepenmüller T, Müller-Goymann C, Mehnert W, Bittl R, Schäfer-Korting M and Kramer KD (2007) Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by piezoelectric spectroscopy and electron spin resonance, *J Control Release* 119(1):128-135

Poster

Nakamura C, Braem C, Sivaramakrishnan R, Kramer KD, Schäfer-Korting M and Mehnert W
Solid Lipid Nanoparticles for topical glucocorticoid treatment of skin diseases, DPhG –
Tagung, Berlin 2005

Braem C, Herrmann W, Mehnert W, Blaschke T, Kramer KD and Schäfer-Korting M
Interaction of different lipid nanodispersions with spinlabelled cholestane, DPhG – Tagung,
Marburg 2006

Vortrag

Potteck H, Braem C, Schäfer-Korting M and Kleuser B
Phosphorylation of the immunomodulator FTY720 protects fibroblasts from apoptosis via the
S1P₃ receptor subtype, DGPT – Tagung, Mainz 2007

Stipendium

NaföG-Promotionsstipendium durch das Land Berlin (Juli 2004 - Dezember 2006)

Abkürzungsverzeichnis

Act	Actinomycin D
AP-1	Aktivatorprotein-1
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BD	Budesonid
BM	Betamethason
BMDP	Betamethason-17,21-propionat
BMV	Betamethason-17-valerat
BPE	Bovine Pituitary Extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovines Serum Albumin
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CLP	Clobetasol-17-propionat
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DEX	Dexamethason
DMAP	Dimethylaminophenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
hEGF	Epidermal Growth Factor, human
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FBM	Fibroblastenbasalmedium
FGM	Fibroblastenwachstumsmedium
FKS	Fetales Kälberserum
FLP	Fluticason-17-propionat
GC	Glucocorticoid(e)
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid-Response-Element
IL	Interleukin
KBM	Keratinozytenbasalmedium
KGM	Keratinozytenwachstumsmedium
MOF	Mometason-17-fuorat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NE	Nanoemulsion
NF κ B	Nuklearer Faktor κ B
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
nGRE	negatives Glucocorticoid-Response-Element
NLC	Nanostructured Lipid Carriers
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4
PC	Prednisolon-17-ethylcarbonat-21-propionat
PD	Prednisolon
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PS	Parelektrische Spektroskopie
RB	Rezeptorbindung
rpm	rounds per minute
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1P ₂	Sphingosin-1-phosphat Rezeptorsubtyp 2
S1P ₃	Sphingosin-1-phosphat Rezeptorsubtyp 3
SEGRA	Selektiver Glucocorticoidrezeptoragonist
SERM	Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SPHK	Sphingosinkinase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
THF	Tetrahydrofuran

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	2
1.1	Aufbau der Haut	2
1.2	Glucocorticoide zur Therapie des atopischen Ekzems und des Bronchialasthmas	4
1.2.1	Wirkweise der Glucocorticoide	5
1.2.2	Glucocorticoidtherapie des atopischen Ekzems und des Bronchialasthmas	5
1.2.3	Strukturoptimierung von Glucocorticoiden	6
1.2.4	Nutzen-Risiko-Relation	8
1.3	Nanopartikuläre Trägersysteme zur topischen Anwendung	9
1.3.1	Solid Lipid Nanoparticles (SLN)	10
1.3.2	Nanostructured Lipid Carriers (NLC)	11
1.3.3	Targetingeffekte durch Nanopartikuläre Trägersysteme	12
1.3.4	Modellvorstellungen für Nanopartikuläre Trägersysteme	13
1.4	Beeinflussung der Apoptose durch Glucocorticoide und Sphingosin-1-phosphat	15
1.5	Zielsetzung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	19
2.1.3	Nährmedien und Lösungen	21
2.2	Zellbiologische Methoden	24
2.2.1	Zellisolierung und -kultivierung	24
2.2.2	Viabilitätsbestimmung	25
2.2.3	Proliferationsassay	26
2.2.4	Durchflußzytometrie	26
2.2.5	Transfektion	28
2.3	Synthese spingelabelter Glucocorticoide	28
2.4	Partikuläre Arzneistoffträger: Herstellung und Charakterisierung	30
2.4.1	Nanopartikuläre Arzneistoffträger	30
2.4.2	Charakterisierung von Modell- und Arzneistoffinteraktionen mit dem Träger mittels Parelektischer- und Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie	31
2.5	Statistik	39
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Viabilitätsbestimmung	41
3.2	Proliferationsassay	44
3.3	Antiapoptotische Wirkung von Glucocorticoiden und FTY720P bei Fibroblasten	50
3.4	Synthese spingelabelter Glucocorticoide	57

3.5	Charakterisierung nanopartikulärer Trägersysteme mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	61
3.6	Charakterisierung der Trägersysteme mittels Raman-Spektroskopie	62
3.7	Charakterisierung der Substanz-Träger Interaktion mittels der Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie	65
4	DISKUSSION	71
4.1	Nutzen-Risiko-Relation für die topische Therapie mit Glucocorticoiden, Wirkung von Glucocorticoiden	71
4.2	Synthese spingelabelter Glucocorticoide	74
4.3	Charakterisierung Nanopartikulärer Trägersysteme	75
4.4	Ausblick	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	LITERATURVERZEICHNIS	88