

**CYPROTERONACETAT ZUR TOPISCHEN THERAPIE
ANDROGENABHÄNGIGER ERKRANKUNGEN:
IN VITRO UNTERSUCHUNGEN AN NANOSTRUKTURIERTEN
WIRKSTOFFTRÄGERN**

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

Jana Štecová

aus Krupka

Berlin 2006

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

2. Gutachter: Prof. Dr. K.D. Kramer

Disputation am: 29.9.2006

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.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Anregungen und ihre fördernde Unterstützung. Mit ihrem stets frohen Gemüt und guter Laune hat sie immer für ein gutes Arbeitsklima und optimale Arbeitsbedingungen gesorgt.

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Herrn Prof. Klaus D. Kramer, Institut für Experimentalphysik, FU Berlin, für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie für seine Anregungen und Gesprächsbereitschaft rund um das Thema Parelektrische Spektroskopie. Bei Herrn Ramadurai Sivaramakrishnan und Tobias Blaschke, Institut für Physik, HU Berlin bedanke ich mich für die Durchführung von Messungen im Rahmen der Parelektrischen Spektroskopie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer H. Müller, Institut für Pharmazeutische Technologie, FU Berlin, sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern dafür, dass sie uns jederzeit ihre Laborräumlichkeiten und alle notwendigen Geräte zur Herstellung und Charakterisierung von nanopartikulären Zubereitungen zur Verfügung gestellt haben.

Bei Frau Dr. Annekathrin Haberland möchte ich mich für die Iniziiierung des ersten Kontaktes zu der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting sowie für die wissenschaftliche Betreuung bedanken. Mein dank gilt auch Herrn Dr. Wolfgang Mehnert für seine wissenschaftliche Unterstützung insbesondere bei der statistischen Auswertung sowie seine konstruktive Kritik.

Ich möchte mich bei Frau Hannelore Gonska für die Hilfe bei Isolierung und Kultivierung humaner Hautzellen bedanken sowie Frau Barbara Brüggener für die Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen.

Ich danke Dr. med. Antje Kirsch, Abteilung für Hand- und plastische Chirurgie, Zentralklinik Emil von Behring Krankenhaus, ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Überlassung von exzidierte Humanhaut. Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Maria K. Rübhelke, die diesen Kontakt ermöglicht hat.

Ich möchte Herrn Dr. Steffen Rummel, Pharmazeutische Chemie, FU Berlin, für seine Hilfe bei der chemischen Synthese und der Auswertung der NMR-Spektren danken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn Prof. dr. Christos C. Zouboulis, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin, für die Überlassung der Sebozytenzelllinie SZ95.

Herrn Prof. Dr. Wellstein, Georgetown University Washington D.C., danke ich für die Überlassung der Mausfibroblastenzelllinie GR+/29+.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn PD Dr. Burkhard Kleuser möchte ich für das freundliche Arbeitsklima und viele gemeinsame Unternehmungen danken, insbesondere Frau Dipl. Ing. Peggy Schlupp für Ihre Beihilfe bei der Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikel und Frau Apothekerin Corinna Schraut für ihre Unterstützung bei der PCR und Western-Blot-Analytik.

Einen besondern dank möchte ich meiner Familie, dem lieben Frank sowie der ganzen Familie Genoske aussprechen. Sie haben mich psychologisch und emotional unterstützt und waren immer für mich da.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

J. Štecová, W. Mehnert, T. Blaschke, B. Kleuser, R. Sivaramakrishnan, C.C. Zouboulis, H. Seltmann, H.C. Korting, K.D. Kramer, M. Schäfer-Korting: Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: Skin uptake, metabolism and pharmacological effects in SZ95 cells, Pharm Res (submitted)

Poster

J. Štecová, S. Lombardi Borgia, P. Schlupp, W. Mehnert, Schäfer-Korting M.: Innovative drug carriers for topical therapy, Gesellschaft für Dermopharmazie e.V. Symposium-Einsparung von Tierversuchen mit Humanhautmodellen, Berlin 2004

J. Štecová, R. Sivaramakrishnan, W. Mehnert, K.D. Kramer, C.C. Zouboulis, M. Schäfer-Korting: Innovative Drug Carriers for topical cyproterone acetate therapy of androgenetic alopecia and acne, Jahrestagung der deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Regensburg 2004

J. Štecová, P. Schlupp, W. Mehnert, K.D. Kramer, C.C. Zouboulis and M. Schäfer-Korting: Nanostructured carriers for topical cyproterone acetate application to intact and stripped human skin, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Dermopharmazie, Wien 2005

Abkürzungsverzeichnis

AGA	Androgenetische Alopezie
akFKS	Aktivkohlebehandeltes Fetales Kälberserum
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen responsive element
BMV	Betamethason-17-valerat
BPE	Bovine Pituitary Extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovines Serum Albumin
CP	Cyproteron
CPA	Cyproteronacetat
cpm	Counts per Minute/Zählrate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fb	Fibroblasten
FBM	Fibroblastenmedium
FGM	Fibroblast Growth Medium (Fibroblastenwachstumsmedium)
FKS	Fetales Kälberserum
GRBM	GR+/29+ -medium (GR+/29+-basalmedium)
GRGM	GR+/29+ Growth Medium (GR+/29+-wachstumsmedium)
³ H-DHT	1,2,6,7, ³ H-Dihydrotestosteron
hEGF	Human epidermal growth factor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
3 α -HSD	3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase
17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KBM	Keratinozytenbasalmedium
Kc	Keratinozyten

KCl	Kaliumchlorid
KGM	Keratinocyte Growth Medium (Keratinocytenwachstumsmedium)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LD	Laserdiffraktometrie
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
LTB 4	Leukotrien B ₄
MS	Mikrosphären (Mikropartikel)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NE	Nanoemulsion
NLC	Nanostructured Lipid Carriers
NLC-M	Nanostructured Lipid Carriers mit Miglyol als flüssige Phase
NLC-O	Nanostructured Lipid Carriers mit Ölsäure als flüssige Phase
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
19-NT	19-Nortestosteron
n.u.	Nicht untersucht
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCOS	Polyzystischer Ovar-Syndrom
PCS	Photonkorrelationsspektroskopie
PI	Polydispersitätsindex
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PS	Parelektrische Spektroskopie
5 α -R	5 α -Reduktase
rph	Rotation per hour
rpm	Rotation per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RU 58841	Roussel-Uclaf 58841
RUM	Roussel-Uclaf 58841-myristat
SBM	Sebozytenbasalmedium
SGM	Sebocyte growth medium (Sebozytenwachstumsmedium)

SGM-ak	Sebocyte growth medium (Sebozytenwachstumsmedium) mit Aktivkohle
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLN	Solid Lipid Nanoparticle (Feste Lipid Nanopartikel)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Haare und Haarzyklus.....	1
1.2	Die Talgdrüse.....	4
1.3	Androgene.....	6
1.3.1	Metabolisierung von Androgenen in der Haut.....	6
1.3.2	Der Androgenrezeptor und seine Lokalisation in der Haut.....	8
1.4	Androgenabhängige Erkrankungen und ihre Therapie.....	10
1.5	Barrierefunktion der Haut.....	17
1.6	Partikuläre Trägersysteme zur topischen Anwendung an der Haut.....	19
1.7	Fragestellung und Zielsetzung.....	23
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterial.....	25
2.3	Nährmedien und Lösungen.....	28
2.4	Zellisolierung und -kultivierung.....	33
2.5	Herstellung von Cyproteron.....	34
2.6	Entwicklung und Validierung einer HPLC-Analytik.....	35
2.6.1	HPLC-Trennung.....	35
2.6.2	Probenvorbereitung.....	38
2.7	Kutane Metabolisierung.....	39
2.8	Pharmakodynamik von CPA und CP.....	40
2.8.1	Rezeptorbindung.....	40
2.8.2	Untersuchung der Wirkung von Androgenen und Antiandrogenen auf SZ95 Zellen.....	41
2.8.3	Untersuchung von Expression und Funktion des Androgenrezeptors bei SZ95 Zellen.....	42
2.9	Partikuläre Arzneistoffträger: Herstellung und Charakterisierung.....	45
2.9.1	Nanopartikuläre Arzneistoffträger.....	45
2.9.2	Mikropartikuläre Arzneistoffträger.....	45
2.9.3	Creme Herstellung.....	46
2.9.4	Gehaltbestimmung.....	46
2.9.5	Partikelgrößemessung.....	46
2.9.6	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	47

2.9.7	Prüfung auf Kristallisation und Rekristallisation.....	47
2.9.8	Untersuchung der Wirkstoffbeladung der Partikel	47
2.9.9	Untersuchung der Oberflächenstruktur der Partikel	48
2.9.10	Interaktion von CPA mit dem Träger	48
2.10	In-vitro-Untersuchung kutaner Penetration und Permeation	52
2.10.1	Design des Franz-Zell-Versuchs.....	52
2.10.2	Penetration bei defekter Hornschicht.....	53
2.10.3	Untersuchung der follikulären Penetration	53
2.11	Statistik	54
3.	ERGEBNISSE	55
3.1	Herstellung von CPA	55
3.2	Entwicklung und Qualitätssicherung einer HPLC Analytik.....	56
3.3	Kutane Metabolisierung von CP	60
3.4	Wirkung von CPA und CP an der Haut	60
3.4.1	Androgenrezeptorbindung bei GR+/29+ Zellen	60
3.4.2	Untersuchung zur antiandrogenen Wirkung an SZ95 Zellen	61
3.4.3	Expression des Androgenrezeptors bei SZ95 Zellen.....	63
3.5	Partikuläre Arzneistoffträger	67
3.5.1	Rezepturentwicklung	67
3.5.2	Charakterisierung der partikulären Arzneistoffträgersystemen.....	70
3.6	Kutane Resorption	77
3.6.1	Penetration und Permeation bei intakter Haut	78
3.6.2	Penetration bei defekter Hornschicht.....	85
3.6.3	Follikuläre Penetration.....	86
4.	DISKUSSION.....	88
4.1	HPLC Analytik für CPA.....	88
4.2	CPA Spaltung und kutane Metabolisierung.....	90
4.3	Pharmakodynamik von CPA und CP.....	91
4.4	Rezepturentwicklung und Charakterisierung der partikulären Trägersysteme.....	93
4.5	In-vitro-Untersuchung kutaner Penetration und Permeation	97
4.6	Ausblick	100
5.	Zusammenfassung (Summary)	101
6.	LITERATURVERZEICHNIS	105