

**Analytische Methoden zur Bestimmung der
ZNS-Bioverfügbarkeit
von Pirinixinsäure- und Zimtsäurederivaten
als potentielle Wirkstoffe zur Therapie von Morbus Alzheimer**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und
Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt am Main

von
Maren Pellowska
aus Dessau

Frankfurt, 2014

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz

Priv.-Doz. Dr. Gunter P. Eckert

Datum der Disputation:

Inhalt

I Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	6
II Substanzauswahl und <i>in vitro</i> Charakterisierung	9
II.1 Pirinixinsäurederivate	9
II.2 Zimtsäurederivate	10
III Allgemeiner Teil	11
III.1 Amyloid-Kaskade Theorie und Bedeutung der γ -Sekretase.....	11
III.1.1 A β und Alzheimer	12
III.1.2 Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität	13
III.2 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)	15
III.2.1 PPAR γ Agonisten und Alzheimer	16
III.2.2 PPAR γ als therapeutisches Target für AD	17
III.2.3 TZDs als Alzheimer Therapeutika?	20
III.3 Tau	21
III.3.1 Tau und Alzheimer	21
III.3.2 Tau-regulierende Therapieansätze bei AD	23
III.4 Mitochondrien	25
III.4.1 Die Atmungskette.....	25
III.4.2 Fission- und Fusion-Prozesse.....	25
III.4.3 Mitochondriale Dysfunktion bei Alzheimer.....	27
III.4.3.1 Gestörte Fission- und Fusion-Prozesse bei Alzheimer.....	28
III.4.3.2 Auswirkungen von A β auf die mitochondriale Funktion.....	29
III.4.3.3 Auswirkungen von Tau auf die mitochondriale Funktion.....	30
III.4.4 Therapieansätze zur Verbesserung der mitochondrialen Dysfunktion.....	31
VI Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	33
VI.1 Geräte	33
V.1.1 MS-Detektion	33
VI.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	35

V Analytische Methodenentwicklung und –Validierung für MH84.....	36
V.1 Entwicklung der HPLC-Trennmethode.....	37
V.2 Bestimmung eines internen Standards.....	38
V.2.1 Strukturell verschiedene Substanzen.....	38
V.2.2 Strukturell ähnliche Substanzen	40
V.3 APCI- und MS-Parameteroptimierung	42
V.4 Probenaufarbeitung aus biologischen Matrices	45
V.4.1 Hirnproben	45
V.4.2 Plasmaproben	47
V.5 Methodvalidierung von MH84	49
V.5.1 Selektivität, Linearität und Nachweisgrenzen von MH84 in den Matrices.....	49
V.5.2 Stabilität	52
V.5.2.1 Stabilität von MH84 bei Raumtemperatur (25°C).....	52
V.5.2.2 Stabilität der aufgearbeiteten Matrix-QCs im Autosampler.....	54
V.5.2.3 Langzeitstabilität der Matrix-QCs.....	55
V.5.2.4 Auftaustabilität der Matrix-QCs.....	57
V.5.2.5 Übersicht über alle Stabilitätsprüfungen	59
V.5.3 Präzision und Richtigkeit (Accuracy) zur Bestätigung der Reproduzierbarkeit	60
V.5.3.1 Intraday-Assay.....	60
V.5.3.2 Interday-Assay.....	61
V.5.3.3 Übersicht über alle Richtigkeits- und Präzisionsbestimmungen	63
V.5.4 Wiederfindung und Crossvalidierung.....	64
 VI MH84 Tierstudien	 67
VI.1 Tiere.....	67
VI.2 Herstellung der Lösungen für die orale Gabe	67
VI.3 Pharmakokinetik-Studie	68
VI.4 ZNS-Akkumulationsstudie.....	71
VI.5 Pharmakodynamik-Studien	72
VI.6 Diskussion der MH84 Tierstudien	73

VII Analytische Methodenentwicklung für MH163	75
VII.1 Entwicklung der HPLC-Trennmethode	75
VII.2 Bestimmung eines internen Standards	75
VII.3 APCI- und MS-Parameteroptimierung	76
VII.4 Strukturaufklärung des Umlagerungsproduktes.....	79
VII.5 Diskussion der Methodenentwicklung für MH163.....	85
VIII Zusammenfassung der vorliegenden Gesamtarbeit	87
IX Anhang	91
IX.1 Abkürzungen	91
IX.2 Abbildungsverzeichnis	95
IX.3 Tabellenverzeichnis.....	96
IX.4 Literaturverzeichnis.....	98
X Danksagung	107
XI Lebenslauf.....	109

I Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung eines Wirkstoffes ist, neben der Synthese, der Struktur-Wirkungs-Optimierung und der Testung der Substanzen in *in vitro* Zellsystemen, im Wesentlichen von der analytischen Substanz-Charakterisierung abhängig. Dazu zählen neben der Synthesenahen Analytik jedoch auch Untersuchungen zur Stabilität des neuen Arzneistoffes. Durch die Erfüllung der analytischen Vorgaben und einer erfolgreich entwickelten quantitativen Analysenmethode, können sich vielversprechende Substanzen für die Untersuchung in Tierstudien zu bestimmten Krankheitsmodellen qualifizieren.

Die, in dieser Arbeit untersuchten, Substanzen haben vielversprechende Ergebnisse in Zellsystemen zur Charakterisierung typischer Angriffspunkte zu Morbus Alzheimer (AD) gezeigt. Diese Krankheit trägt, aufgrund der immer höheren Lebenserwartung, enorm zu den ökonomischen Ausgaben des Gesundheitssystems bezüglich der Behandlung und Pflege der Patienten bei.

Neben den Symptomen des kognitiven Verfalls, der aus dem Verlust an funktionsfähigen Synapsen und dem Absterben von Neuronen resultiert, können im Gehirn von AD Patienten Ablagerungen verschiedener Proteine nachgewiesen werden. Die A β -Plaques sind dabei charakteristische extrazelluläre Ablagerungen von A β -Peptiden, die, wie sich gezeigt hat, jedoch bereits vor der Plaquebildung auch intrazellulär zur Schädigung der Neuronen beitragen können. Neurofibrilläre Tangles des Tau-Proteins treten im Gegensatz dazu hauptsächlich intrazellulär auf und sind vermutlich das Resultat der Hyperphosphorylierung des Proteins und der damit verbundenen Destabilisierung des Zytoskeletts der Neuronen. Es existieren Untersuchungen, in denen Veränderungen des A β - und Tau-Haushaltes synergistisch zum Absterben der Neuronen bei AD beitragen [1].

Die Auswahl der untersuchten Substanzen erfolgte aus zwei verschiedenen Substanzbibliotheken, die innerhalb der Arbeitsgruppe durch langjährige Struktur-Wirkungs-Optimierung ausgehend von den Leitstrukturen, der Pirinixinsäure und der Zimtsäure, erhalten wurden.

Der Anteil der vorliegenden Arbeit am Gesamtprozess der universitären Wirkstoffentwicklung der hier ausgewählten Substanzen ist in Abb.1 dargestellt.

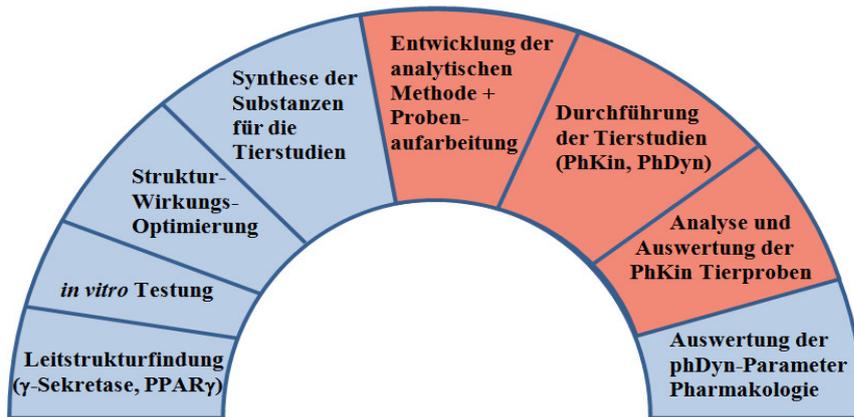


Abb. 1: Bedeutung der (bio-) analytischen Untersuchungen im Gesamtprozess der universitären Wirkstoffentwicklung zum Krankheitsbild von Morbus Alzheimer, phKin = Pharmakokinetik, PhDyn = Pharmakodynamik

Als vielversprechendste Wirkstoff-Kandidaten haben sich MH84, ein Pirinixinsäurederivat und MH163, ein Zimtsäurederivat, herausgestellt. Diese Substanzen verbinden einen dualen Wirkmechanismus an der γ -Sekretase und PPAR γ (Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor γ) mit positiven Effekten auf die Verbesserung der mitochondrialen Dysfunktion, zu der es bei AD bereits in frühen Stadien kommt. Sie decken somit einen Großteil der bislang wahrscheinlichsten, möglichen Therapieoptionen für Morbus Alzheimer ab.

Eine verringerte Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP) durch die γ -Sekretase soll dabei zu einer Reduzierung der toxischen, AD typischen A β 42-Peptide führen. Des Weiteren wird eine Reduktion der A β 42 Produktion über eine indirekte Beeinflussung der β -Sekretase über die Wirkung an PPAR γ diskutiert. Dies könnte sich, neben einer Senkung der direkten neurodegenerativen Toxizität dieser Spezies, zusätzlich positiv auf die Tau-Pathologie auswirken[2].

Die Aktivierung von PPAR γ zeigt sowohl positive Effekte auf die Regulierung der A β -Spiegel, welche aus einer reduzierten Bildung und einem gesteigerten Abbau von überschüssigem A β resultieren, als auch eine Verbesserung der inflammatorischen Symptome und möglicher Stoffwechsel-Veränderungen in Zell- und Tiermodellen zu AD [3].

Die mitochondriale Dysfunktion gilt als eine der frühzeitigen pathologischen Veränderungen der Krankheit und resultiert aus gesteigertem oxidativen Stress, der z.B. auch durch überschüssige lösliche, intrazelluläre A β -Oligomere verursacht werden kann. Eine Verbesserung dieser Dysfunktion stellt eine vielversprechende Therapieoption für neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, dar [4].

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung empfindlicher und selektiver Analysenmethoden für die ausgewählten Substanzen und deren Validierung nach Guideline der FDA (Food and Drug Administration) für bioanalytische Methodenentwicklung [5]. Dies stellt die Grundlage dar, um die Gehalte der Verbindungen aus biologischen Matrices wie Plasma und Hirn einwandfrei quantifizieren zu können und somit auch die Bioverfügbarkeit im ZNS nachzuweisen. Die in der Validierung enthaltenen Untersuchungen zur Stabilität charakterisieren den Analyten und stellen sicher, dass die Ergebnisse der Proben-Analyse verlässlich sind.

Der Einsatz einer validen Analysenmethode soll für die Auswertung der potenten Verbindung MH84 in biologischen Proben aus Tierstudien dargestellt werden. Die pharmakokinetische Charakterisierung und die Untersuchung der ZNS-Gängigkeit über die Blut-Hirn-Schranke stehen dabei im Vordergrund. Dieses Charakteristikum ist von essentieller Bedeutung für die Adressierung AD relevanter Angriffspunkte.

Die Ergebnisse einer ZNS-Akkumulationsstudie und von zwei pharmakodynamischen Studien in transgenen Tiermodellen sollen ebenfalls kurz vorgestellt werden.

II Substanzauswahl und *in vitro* Charakterisierung

Die zu Beginn ausgewählten Substanzen weisen verschiedene Aktivitätsprofile an der γ -Sekretase und PPAR γ auf, wobei diese Auswahl neben Substanzen mit dualen Wirkungen auch Substanzen beinhaltet, die selektive γ -Sekretase Modulatoren oder PPAR γ Aktivatoren darstellen (Tab.1). Die Substanzen wurden in der Arbeitsgruppe synthetisiert und stellen vielversprechende Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Optimierung bezüglich der AD-Targets dar. Die endgültige Auswahl der Substanzen für anstehende Tierversuche und die dafür benötigte analytische Methodenentwicklung und – validierung, erfolgte anschließend über ihr Potential die Mitochondrienfunktion *in vitro* zu verbessern [6],[7]. Die Untersuchungen der Substanzen an den Mitochondrien wurden durch Maximilian Pohland (Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe-Universität Frankfurt/Main) durchgeführt und werden derzeit veröffentlicht, weshalb in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der beiden vielversprechendsten Substanzen kurz beschrieben werden.

Tab. 1: Übersicht über die *in vitro* Daten von vorausgewählten Kandidaten für potentielle *in vivo* Studien

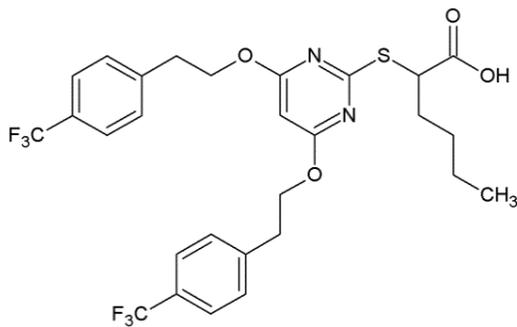
Substanz	γ -Sekretase		PPAR γ
	Inhibition von A β 42 (IC ₅₀ [μ M])	Aktivierung von A β 38 (EC ₅₀ [μ M])	Aktivierung (EC ₅₀ [μ M])
MH49	6,00	4,60	6,60
MH73	> 40	> 40	2,20
MH74	Inverser Modulator	IC ₅₀ A β 38 ~ 5 μ M	Inaktiv bei 10 μ M
MH84	6,00	1,80	11,00
MH163	1,10	0,60	28 \pm 8 % Aktivierung bei 10 μ M
DF34	0,78	1,00	4,64

II.1 Pirinixinsäurederivate

Bei den mitochondrialen Untersuchungen wurden transfizierte HEK-293_{APPwt} Zellen, die neuronales APP überexprimieren, mit Natriumnitroprussid (SNP) inkubiert um oxidativen bzw. nitrosativen Stress zu simulieren. Die Behandlung mit SNP führt dabei zu einer Erniedrigung der Basalwerte für das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel.

Die Auswahl an Pirinixinsäurederivaten für diese Untersuchungen umfasste die Verbindungen MH49, MH73, MH74 und MH84.

Das vielversprechendste Pirinixinsäurederivat war MH84, welches bei der Inkubation die Schädigung durch SNP bereits bei einer Konzentration von 30 nM um ca. die Hälfte verringern konnte. Die Aktivität aller Komplexe der Atmungskette bei HEK-293_{APPwt} Zellen konnte bei einer Konzentration von 1 µM deutlich erhöht werden. Diese Verbesserungen gehen mit einer Erhöhung der Anzahl an funktionsfähigen Mitochondrien einher (Bestimmung anhand der Citratsynthaseaktivität).



MH84

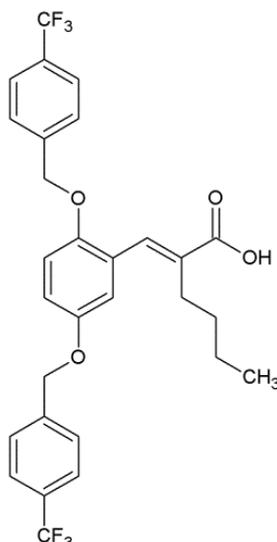
2-((4,6-Bis(4-(Trifluoromethyl)phenoxy)pyrimidin-2-yl)thio)hexansäure

M = 602,2 g/mol

Abb. 2: MH84, ausgewähltes Pirinixinsäurederivat für *in vivo* Studien

II.2 Zimtsäurederivate

Die getesteten Vertreter dieser Substanzklasse waren MH163 und DF34. MH163 wurde aufgrund der etwas besseren Wirksamkeit für die weitere analytische Methodenentwicklung ausgewählt. Es konnte *in vitro* eine signifikante Verbesserung des MMP bei einer Konzentration von 30 nM gezeigt werden. Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion mittels der ATP-Spiegel zeigte für MH163 protektive Effekte bei 1 µM nach einer Schädigung mit SNP.



MH163

(E)-2-Bis((4-(Trifluoromethyl)benzyl)oxy)benzylidene)hexansäure

M = 552,2 g/mol

Abb. 3: MH163, ausgewähltes Zimtsäurederivat für *in vivo* Studien

III Allgemeiner Teil

Alzheimer

Alzheimer (AD) ist für bis zu 70% der Demenz-Diagnosen verantwortlich und betraf im Jahr 2012 circa 36 Millionen Menschen weltweit [8].

Die Krankheit ist durch einen fortschreitenden kognitiven Verfall gekennzeichnet, wobei hauptsächlich das Gedächtnis, visuell-räumliche Fähigkeiten und ausführende Funktionen gestört sind. Im späteren Krankheitsverlauf kommt es zusätzlich zu komplexen Verhaltensstörungen und psychologischen Veränderungen [9], [10]. Die Ursache für die symptomatischen Veränderungen ist ein selektiver neuronaler Abbau und der Verlust an Synapsen in den betroffenen Hirnregionen, wie dem Hippocampus, dem limbischen System, der Amygdala, dem frontalen und temporalen Neocortex [11]. Diese Veränderungen sind assoziiert mit der Ausbildung von extrazellulären senilen Plaques (A β) und intraneuronalen neurofibrillären Tangles (Tau) [12]. Die Zusammenhänge zwischen den AD-typischen pathophysiologischen Veränderungen werden folgend kurz beschrieben, um die besondere Bedeutung der untersuchten Substanzen darzustellen.

III.1 Amyloid-Kaskade Theorie und Bedeutung der γ -Sekretase

Die Amyloid-Kaskade Theorie war der erste Versuch die Entstehung und den Verlauf von Morbus Alzheimer zu erklären. Mittlerweile konnte festgestellt werden, dass die Bildung und Ablagerung von neurotoxischem A β Spezies als alleiniger Krankheitsauslöser ausgeschlossen werden kann. Dennoch spielt die Generierung von neurotoxischen A β Spezies im Zusammenspiel mit anderen, vielschichtigen Veränderungen eine bedeutende Rolle.

Der Abbau des Amyloid- β Precursor Proteins (APP) erfolgt durch verschiedene Sekretasen. Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Wege [13].

Im nicht-amyloidogenen Weg wird der Großteil des APP prozessiert. Die α -Sekretase schneidet dabei das APP in extrazelluläre Fragmente (APP α) und membrangebundene α -carboxyterminale Fragmente (CTF α , C83). Diese werden anschließend durch die γ -Sekretase in lösliche p3-Fragmente und die APP-intrazelluläre Domäne (AICD) zerlegt.

Im amyloidogenen, bei AD pathologisch veränderten, Weg wird APP zunächst durch die β -Sekretase (BACE1) in ein β -carboxyterminales Fragment (CTF β oder C99) geschnitten.

Dieses Fragment wird daraufhin durch die γ -Sekretase in die charakteristischen A β Peptide gespalten [13]. Dabei entstehen sowohl auf normalem, als auch auf krankhaften Wege A β 37-43 Peptide [14], [15].

Diese Peptide werden in den extrazellulären Raum freigesetzt, während das, durch die β -Sekretase entstandene AICD, wie auch im nicht-amyloidogenen Weg, in das Zytosol gelangt und an nukläeren Signal-Kaskaden beteiligt ist [16], [17].

Strukturell ist die γ -Sekretase ein Aspartyl-Protease-Komplex mit Presenilin im katalytischen Zentrum [18]. Dieser Komplex ist trans-membranär [19] und besteht aus mindestens vier Proteineneinheiten: Presenilin 1 oder 2 (PS), Anterior Pharynx-Defective 1 (APH-1), Nicastrin (NCT) und Presenilin Enhancer 2 (PEN-2) [20].

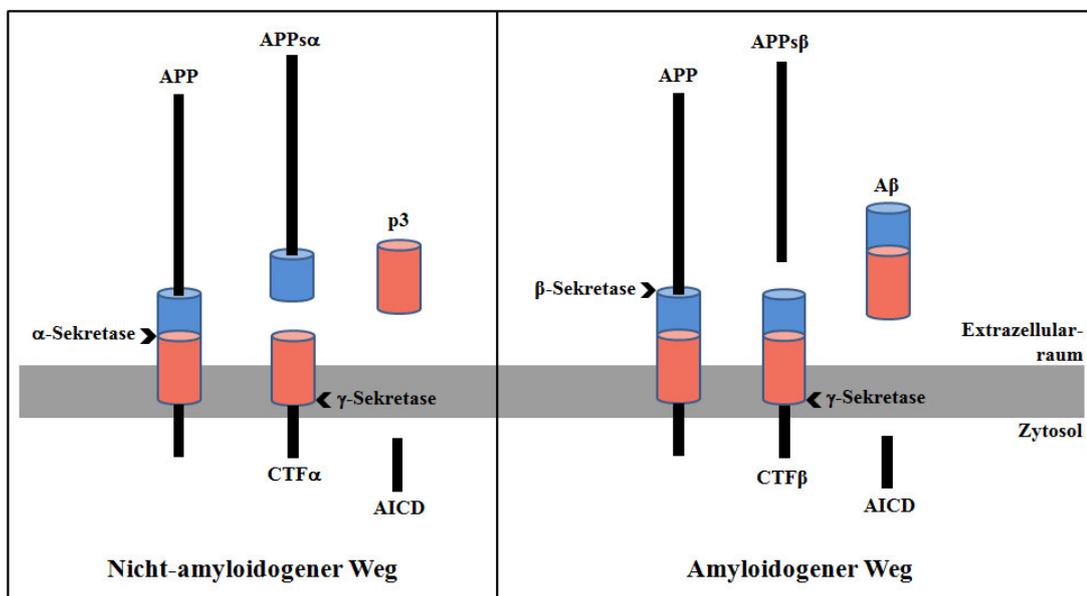


Abb. 4: Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg der APP-Prozessierung, nach [13]

III.1.1 A β und Alzheimer

Die bei der APP-Prozessierung entstandenen A β -Monomere können nach vorangegangener Konformationsänderung polymerisieren und zunächst kurze, lösliche, metastabile Oligomere bilden. Manche dieser Oligomere können sich verstärkt, durch Anlagerung weiterer Monomere, zu Protofibrillen zusammenschließen. Durch das Zusammenlagern von Protofibrillen kommt es zur Bildung großer, unlöslicher Filamente (geraden und gepaarten, helikalen Filamenten), die sich anschließend weiter zu den charakteristischen Amyloid Plaques zusammenballen [21]. Diese Plaques galten lange Zeit als Ursache für die A β -

induzierten neurotoxischen Effekte, wobei später die oligomeren A β -Strukturen als besonders neurotoxisch eingestuft wurden [22], [23], [24].

Bei AD ist die APP-Prozessierung zugunsten einer gesteigerten Bildung von A β 42 verändert. Dieses Peptid führt verstärkt zu neurotoxischen Effekten und hat eine hohe Tendenz zu den AD typischen Amyloid Plaques zu agglomerieren [25].

In familiären, early-onset Fällen von AD resultiert die verstärkte A β 42 Bildung auf Mutationen im APP, Presenilin 1 oder Presenilin 2. Diese Form betrifft weniger als 5% der AD Patienten. Auf der anderen Seite konnte bei ca. 50% der late-onset Patienten die ApoE4 Isoform nachgewiesen werden [26]. Einheitliche Ursachen für die Krankheit konnten somit nicht identifiziert werden, wobei die erwähnten genetischen Veränderungen ein Hauptrisiko für die Erkrankung darstellen.

Das veränderte A β -Profil scheint auch mit anderen, AD typischen, Veränderungen verbunden zu sein. A β schädigt dabei hauptsächlich die synaptischen Bereiche der Neuronen, was zu einer gestörten Reizweiterleitung und schließlich zum Absterben der Synapsen und Neuronen führt [27], [28]. In transgenen Mausmodellen konnte außerdem gezeigt werden, dass A β nur cytotoxisch und neurodegenerativ wirkt, wenn Tau anwesend ist. Bei Tau^{-/-} Mäusen konnten keine A β -induzierten toxischen Effekte nachgewiesen werden [29]. Überschüssiges A β schädigt zusätzlich die Mitochondrienfunktion, was im Umkehrschluss die Tau-Pathologie begünstigt [30], [27].

III.1.2 Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität

Da A β ein möglicher, wichtiger Verknüpfungspunkt zu nahezu allen AD typischen Veränderungen darstellt, scheint die therapeutische Beeinflussung der APP-Prozessierung ein wichtiger Angriffspunkt für eine mögliche Behandlung darzustellen. Eine dieser Therapiemöglichkeiten ist die Reduzierung der Bildung des neurotoxischen A β 42. γ -Sekretase Inhibitoren (GSI) wie LY-411575, LY-450139 (Semagacestat) reduzieren dabei jedoch alle A β -Peptide und haben eine fehlenden Target-Selektivität. Dadurch kam es in klinischen Studien zu einem damit verbundenen, ungünstigen Nebenwirkungsprofil. Die Nebenwirkungen der GSI, wie ein erhöhtes Hautkrebsrisiko oder teils schwere gastrointestinale Störungen, beruhen unter anderem auf einer Blockade des Notch-Signalwegs. Dies zeigt die Analogie zwischen APP- und Notch-Prozessierung durch Presenilin-abhängige Abbauschritte [31].

Um die Wirkung der GSI auf APP zu spezifizieren wurden Notch-sparing GSI (z.B. BMS-708163 (Avagacestat), GSI-953 (Begacestat)) entwickelt. Diese Selektivität scheint jedoch auch vom verwendeten Test-Zellsystem abhängig zu sein, da es in klinischen Studien weder zu einer Verringerung der Nebenwirkungen noch zu einer selektiven Reduktion des A β kam [32].

Bei der Untersuchung nicht-steroidaler, antiinflammatorischer Wirkstoffe (NSAIDs) konnte bei einigen der Substanzen (Ibuprofen, Sulindac, Flurbiprofen und Indomethacin) eine selektive Absenkung von A β 42 *in vitro* und *in vivo* festgestellt werden. Dieser Effekt beruht auf modulatorischen Wirkungen dieser Substanzen auf die γ -Sekretase [33], [34], [35].

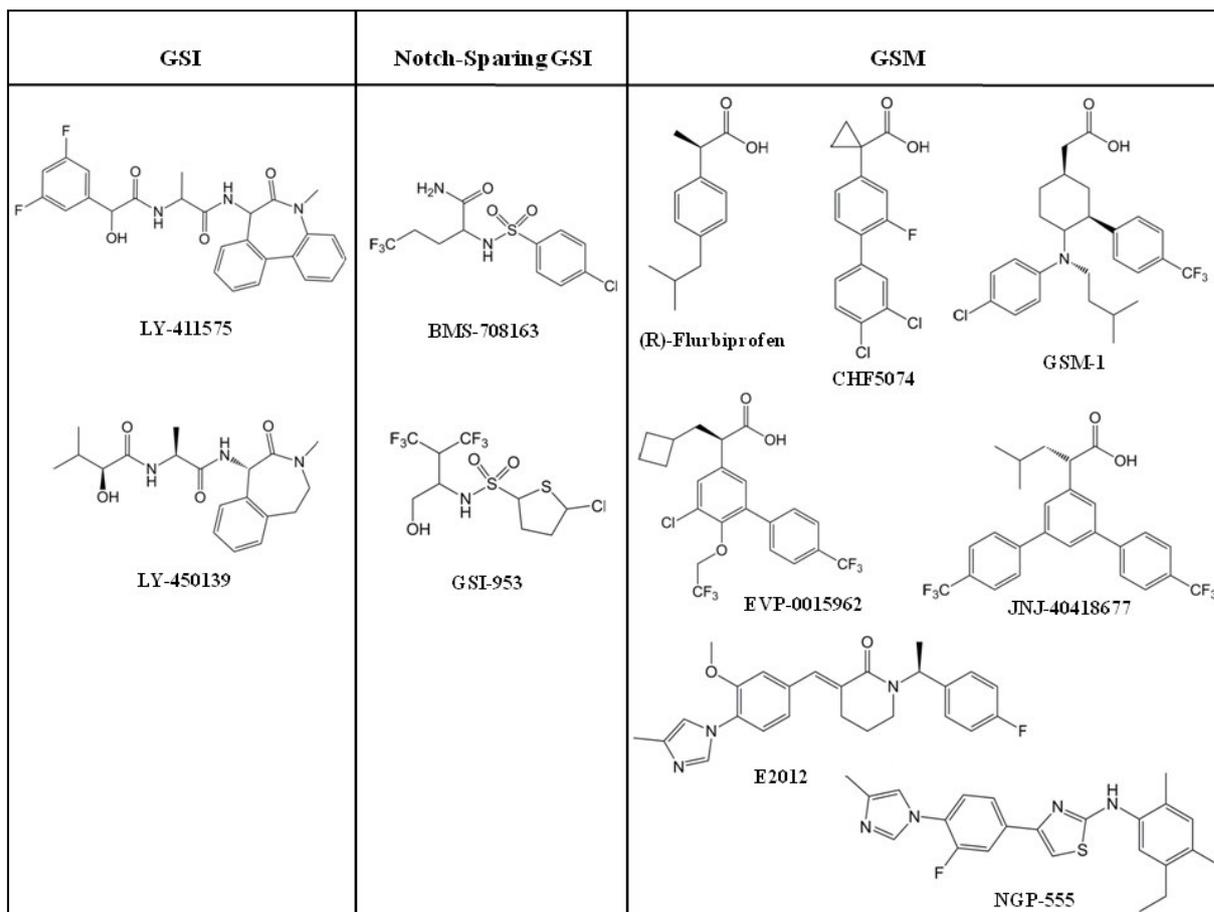
γ -Sekretase Modulatoren (GSM) verschieben die APP-Prozessierung ausgehend vom langen, neurotoxischen und leicht akkumulierenden A β 42 zugunsten kürzerer und weniger toxischer A β 38 oder A β 37 Peptide. Es kommt dabei zu keiner Beeinträchtigung der Notch-Prozessierung und zu weniger Nebenwirkungen [36].

Aufgrund der schwachen *in vitro* Wirksamkeit z.B. von Flurbiprofen (A β 42IC₅₀ ~ 200-300 μ M) wurde ein wirksameres Derivat CHF5074 synthetisiert (A β 42IC₅₀ = 41 μ M). Dieses konnte in klinischen Studien nur eine Verringerung der Mikroglia-Aktivierung (siehe Kap. III.2.2), jedoch keine Verringerung des A β 42 zeigen.

Zur Verbesserung der Wirksamkeit und der Bioverfügbarkeit im ZNS wurden weitere GSM (z.B. GSM-1, EVP-0015962, JNJ-40418677, E2012, E2212, NGP-555, usw.) entwickelt [37], [38].

E2012 zeigte in einer kleinen Phase I Studie eine Dosis-abhängige Reduktion des A β 40/42 Verhältnisses im Menschen [39]. Weitere Untersuchungen wurden jedoch unterbrochen, um stattdessen die optimierte Verbindung E2212 (bislang nur Strukturvermutungen) zu untersuchen. Die erste Phase I Studie startete im Januar 2010 (NCT01221259). Diese Studie zeigte eine gute Verträglichkeit und eine ausreichende Bioverfügbarkeit in gesunden Menschen. Die A β 42 Spiegel im Plasma konnten mit steigender Dosis reduziert werden [40]. Weitere klinische Studien zur Effizienz und ZNS-Gängigkeit der Substanz bei AD Patienten stehen bislang noch aus.

Obwohl es viele γ -Modulatoren in der Pipeline gibt, wurden bislang kaum klinische Studien zu dieser Wirkstoffgruppe durchgeführt. Ob diese Wirkstoffklasse in naher Zukunft in der Therapie von AD eingesetzt werden kann, bleibt daher ungewiss.

Abb. 5: Auswahl bislang untersuchter γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) und γ -Sekretase-Modulatoren (GSM)

III.2 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

Die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) gehören zu den nukleären Rezeptoren und stellen Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren dar.

Die Expression vieler verschiedenster Gene wird durch die Aktivierung der PPARs reguliert.

Es sind drei Subtypen der Rezeptorfamilie bekannt, PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3) [41], welche sich in ihrer Funktion, Ligandenspezifität und der

Gewebeverteilung unterscheiden. Physiologisch sind alle drei Isoformen im Lipid-, Energie- und Glucosestoffwechsel von essentieller Bedeutung. Sie haben zusätzlich einen Einfluss auf die Adipozyten-Differenzierung, Insulin-Sensitivität und Tumorsuppression [42].

Nach Aktivierung eines PPARs durch die Bindung eines Liganden, kommt es zu einer Heterodimerisierung mit einer der drei Isoformen des Retinoid X Rezeptors (RXR), welche durch bindende Wechselwirkungen an drei verschiedenen Stellen der Ligandenbindungsdomäne (LBD) realisiert wird.

Der so gebildete heterodimere Komplex bindet über die Nucleotid-Sequenz AGGTCA-x-AGGTCA an die Promotorregion der Target-DNA. Die sich wiederholenden Teilsequenzen stammen jeweils von der DNA-Bindungsdomäne des PPAR und des RXR und sind nur durch ein zusätzliches Nucleotid (x) voneinander getrennt [43].

Bei Abwesenheit eines PPAR Agonisten wird die Transkription von Genen unterdrückt, indem Corepressoren wie N-CoR (nuclear receptor corepressor) oder SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptor) an PPAR binden. Bei Ligandenbindung werden diese Corepressoren durch Konformationsänderungen freigesetzt und stattdessen Coaktivatoren rekrutiert. Dies sind z.B. bei PPAR γ : PGC-1 α (PPAR γ Coaktivator 1 α), CREB binding Protein (CBP), p300 Proteine, SRC1 (Steroid-Rezeptor Coaktivator) oder PBP (PPAR-bindendes Protein). Dadurch wird die RNA Polymerase aktiviert und die Genexpression eingeleitet [44], [45].

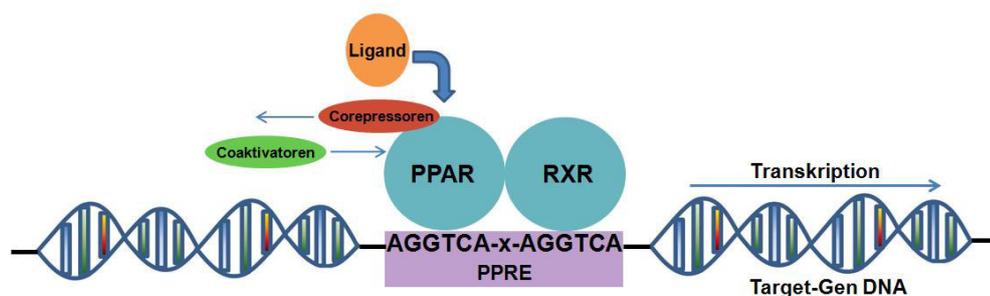


Abb. 6: Genexpression durch die Aktivierung von PPAR, nach [46]

III.2.1 PPAR γ Agonisten und Alzheimer

Obwohl bislang wenig über die Funktionen von PPAR γ im Zentralnervensystem (ZNS) bekannt ist, scheint die Beeinflussung der PPAR γ -Aktivität im ZNS verschiedene Einflüsse auf die pathologischen Veränderungen von Morbus Alzheimer wie A β -Plaques, Tau-Tangles und Entzündung zu haben.

Die wichtigste Substanzklasse dieser Target-Adressierung sind die Thiazolidinedione (TZDs), deren Wirkung an PPAR γ in braunem Fettgewebe in der Literatur ausführlich beschrieben ist. Sie sind als Glukose-senkende und Insulin-sensitivierende Therapeutika bei Diabetes mellitus Type 2 indiziert [47].

Desweiteren weisen verschiedenste andere Substanzklassen wie z.B. langkettige Fettsäuren, synthetische auf Tyrosin basierende Verbindungen und NSAIDs, wie Ibuprofen und Indomethacin eine Wirkung als PPAR γ Agonisten auf [48].

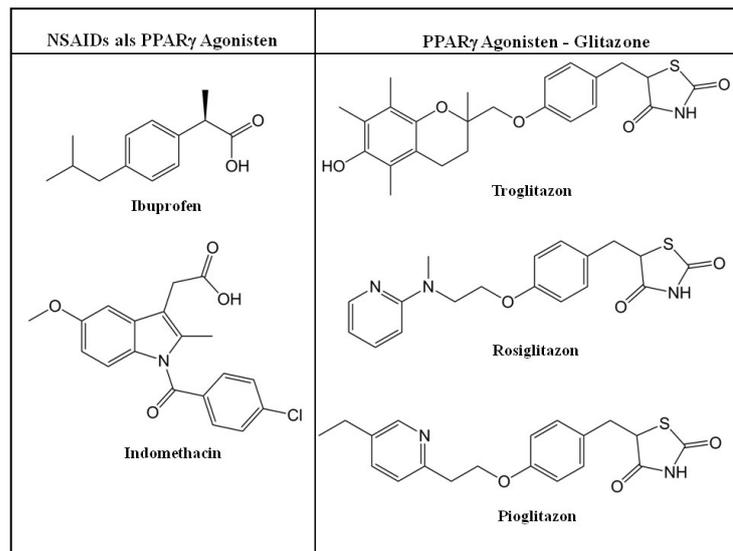
III.2.2 PPAR γ als therapeutisches Target für AD

Der Nachweis proinflammatorischer Cytokine sowie verschiedener Chemokine im Gehirn von AD Patienten gab Hinweise auf chronische Entzündungsreaktionen in den betroffenen Hirnarealen. Diese Entzündungsfaktoren werden durch die A β -induzierte Aktivierung der Mikroglia freigesetzt [49].

Eine langfristige Behandlung mit NSAIDs führte zu einer signifikanten Senkung des Risikos an AD zu erkranken [50], [51], [52]. Zusätzlich dazu wurden Studien durchgeführt, die gezeigt haben, dass der kognitive Abbau bei AD Patienten, sowie der Krankheitsverlauf durch die langfristige Therapie mit NSAIDs gemildert werden kann [53], [54], [52]. Des Weiteren konnte *in vitro* eine deutliche Reduktion von A β assoziierten, aktivierten Mikroglia nach einer entsprechenden NSAID Behandlung nachgewiesen werden [55].

Zunächst wurde der entzündungshemmende Effekt der NSAIDs im Gehirn auf ihre Wirkung als COX-Inhibitoren zurückgeführt. Paradoxerweise, wurden für den entzündungshemmenden Effekt deutlich höhere Dosierungen benötigt, als für die Inhibierung der Cyclooxygenasen eigentlich notwendig sind [56], [57]. Aus diesem Grund wurde eine COX-unabhängige Wirkweise der NSAIDs vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass NSAIDs die Genexpression proinflammatorischer Mediatoren regulieren können, indem sie mit den PPARs interagieren [56]. PPAR γ Agonisten konnten nachweislich die Bildung proinflammatorischer, neurotoxischer Mediatoren in A β -stimulierten Mikroglia und Monocyten unterbinden [49]. NSAIDs weisen jedoch gerade bei hohen Dosierungen ein schlechtes Nebenwirkungsprofil, hauptsächlich im Gastrointestinal Trakt, auf, wodurch eine dauerhafte oder vorbeugende AD Behandlung kaum möglich ist.

In den Fokus der Untersuchungen sind daraufhin die Thiazolidinedione (TZDs) gerückt, da sie als PPAR γ Agonisten bei Diabetes mellitus Typ 2 indiziert sind.

Abb. 7: NSAIDs und TZDs mit PPAR γ -agonistischen Eigenschaften

Diese Substanzklasse konnte in *in vitro* Systemen die entzündungsbedingte Aktivierung von Hirn-Astrozyten und -Mikroglia unterbinden [58]. TZDs können somit die Bildung der Neurotoxine inhibieren, die durch die aktivierten Mikroglia entstehen. Neben der Senkung der typischen Entzündungsmarker, konnte auch eine verringerte Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und somit eine Unterbindung des NO- vermittelten Absterben von Neuronen festgestellt werden [59]. Die neuroprotektiven Effekte der TZDs können durch die Zugabe von GW9662, einem PPAR γ Antagonisten, vollständig aufgehoben werden [58].

In Neuronen des Hippocampus konnten ebenfalls neuroprotektive Effekte der TZDs und anderer PPAR γ Agonisten gezeigt werden, die auf einer Inhibierung der Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) beruhen könnten [60]. Diese Kinase scheint auch im Zusammenhang mit der gestörten Aktivität der γ -Sekretase, der Hyperphosphorylierung von Tau und den gestörten Transportvorgängen von neuronalen Mitochondrien zu stehen [27], [61], [62]. PPAR γ Agonisten (z.B.: Pioglitazon) können zusätzlich A β -Spiegel und dessen Ablagerungen in Mäusen verringern [63].

Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Cytokine die Expression der β -Sekretase erhöhen [64] und dass PPAR γ Agonisten diese Expression durch die Bindung an das Responseelement der Promotorregion des β -Sekretase Targetgens verringern können [65], [64]. Durch die herabgesetzte Expression der β -Sekretase wird nachweislich weniger APP prozessiert, was zu geringeren A β Spiegeln führt [66].

Neben der Beeinflussung der A β Produktion kann auch der Abbau von bereits bestehendem A β durch PPAR γ Agonisten verbessert werden.

Mikroglia sind dabei verantwortlich für die Aufnahme und Degradierung von überschüssigem A β im ZNS. Die AD-typische Überaktivierung der Mikroglia, sowie die erhöhten Spiegel an verschiedenen Cytokinen und Chemokinen treten bereits vor der A β -Plaques Bildung auf [67]. Die chronische Entzündung im Gehirn hat einen negativen Einfluss auf die Abbaufunktion von A β durch die Mikroglia und führt zu zytotoxischen Effekten in den betroffenen Hirnregionen. Es konnte eine erhöhte Aufnahme und ein verstärkter Abbau von A β durch die Stimulierung von PPAR γ durch die Agonisten DSP-8658 und Pioglitazon nachgewiesen werden [68].

Die proinflammatorische Genexpression wird durch Inaktivierung von NF κ B-abhängigen Promotoren durch PPAR γ Agonisten inhibiert [69]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine PPAR γ Aktivierung die Genexpression von proinflammatorischen Genen in Mikroglia und Makrophagen herabsetzt [57], [70]. Es wird vermutet, dass Entzündungen das entscheidende Bindeglied zwischen A β und der Tau Pathologie sind, indem sie die Substratspezifität von Kinasen und Phosphatasen verändern, wodurch es zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins kommt [71].

Erhöhte Serum Cholesterin-Spiegel werden ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko an AD zu erkranken in Verbindung gebracht [72]. Dieser Zusammenhang wird jedoch wissenschaftlich kontrovers diskutiert [73], [74].

Verschiedene Gene, die die Cholesterin-Homöostase regulieren, sind scheinbar mit der AD Pathogenese verknüpft. Am besten untersucht wurden das Apolipoprotein E (ApoE) und die ATP-binding cassette A1 (ABCA1). Die Aktivierung von PPAR γ und Liver X Rezeptoren (LXRs) über einen gekoppelten metabolischen Weg führt zum Anstieg von Apolipoprotein E (apoE) und ABCA1 im Gehirn [75]. ApoE ist das primäre Apolipoprotein im ZNS, welches am Lipid-Metabolismus, der Cholesterin-Homöostase und lokalen Lipid-Transportprozessen beteiligt ist [76]. Es existieren drei verschiedene ApoE Isoformen (E2, E3 und E4), wobei das E4 Allel das Risiko die sporadische, late-onset Variante von AD zu entwickeln deutlich erhöht. ApoE4 führt zu einem Defizit A β Peptide abzubauen, was schließlich zu einer Akkumulation und zur Plaquesbildung führen kann [77]. Im Allgemeinen hat ApoE je nach vorliegender Isoform (E2>E3>E4) einen Einfluss auf die Fähigkeit A β durch Mikroglia und das Insulin-Degrading Enzym (IDE) abzubauen [78].

Die Rolle von ABCA1 ist es Lipide wie Phospholipide und Cholesterin auf ApoE zu übertragen und somit deren Transport zu ermöglichen. Eine Überexprimierung von ABCA1

durch PPAR γ , RXR und LXR führt in Mausmodellen zur Senkung der A β Spiegel und somit zu einer reduzierten Plaquebildung [79].

Das Risiko an AD zu erkranken ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 doppelt so hoch als bei gesunden Patienten [80]. Die Insulin-Rezeptor-Signalkaskade scheint bei AD auf Grund einer Insulin-Resistenz im Gehirn deutlich herabgesetzt zu sein [81]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres A β vom Insulin-Degrading Enzym (IDE) abgebaut wird, welches ApoE4 abhängig bei late-onset AD Patienten in deutlich geringeren Spiegeln im ZNS vorliegt [78], [82]. IDE baut Insulin ab und reguliert die Steady-State Insulin Konzentration im peripheren Gewebe. Andere kurze Peptide wie A β sind ebenfalls Substrate von IDE. PPAR γ Agonisten erhöhen die IDE Expression und deren proteolytische Aktivität, was zu herabgesetzten extrazellulären A β Spiegeln führt [83].

Bei AD sind die PGC-1 α Level nachweislich erniedrigt [84]. Eine Erhöhung der Konzentration führt zu einer gesteigerten mitochondrialen Biosynthese und zu einem verstärkten Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [85]. Eine Aktivierung von PPAR γ fördert die Expression von PGC-1 α [86]. PPAR γ Agonisten haben somit auch einen positiven Einfluss auf die Verbesserung der AD-typischen mitochondrialen Dysfunktion (siehe Kapitel III.4.3).

III.2.3 TZDs als Alzheimer Therapeutika?

Eine Behandlung mit Rosiglitazon führte in Tierstudien zu einer Verbesserung der Lern- und Erinnerungsfähigkeit [87]. Eine Phase II Studie mit mehr als 500 Patienten zeigte eine Verbesserung der Aufmerksamkeit und Gedächtnisleistung bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD durch Rosiglitazon [88].

Leider konnte in folgenden, klinischen Studien die Wirksamkeit der PPAR γ Agonisten Rosiglitazon und Pioglitazon bei AD nicht bestätigt werden. Als Ursache wird eine zu geringe Fähigkeit vermutet die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [87], [89].

Einige positive Effekte der Agonisten auf die AD Pathologie werden indirekten peripheren Wirkungen zugeschrieben. Diese sind ein verbesserter Lipid- und Insulinstoffwechsel [87], [90].

Eine Standardtherapie durch TZDs ist demnach aufgrund fehlender Effizienz bei AD nicht angezeigt. Aufgrund schwerer Nebenwirkungen wurden Troglitazon (Lebertoxizität) und Rosiglitazon (erhöhtes Herzinfarkttrisiko) auch für andere Indikationen in Europa vom Markt

genommen [91], [92]. In den USA hat die FDA, nach einer strikten Limitierung der Verschreibung für Rosiglitazon im Jahr 2011, die Vorschriften 2013 wieder gelockert, nachdem eine neue Studie das erhöhte Herzinfarktrisiko nicht bestätigen konnte [93]. Pioglitazon ist in den USA und in Europa immer noch mit dem Hinweis zugelassen, dass eine Behandlungsdauer von mehr als 1-2 Jahr zu erhöhtem Blasenkrebsrisiko führt [94].

III.3 Tau

Tau gehört zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs). Es fördert den Einbau von Tubulin in die Mikrotubuli und führt dadurch zu dessen Stabilisierung. Tau selbst wird abhängig vom Phosphorylierungsstatus, der durch Kinasen und Phosphatasen reguliert wird, an die Mikrotubuli gebunden [95], [96]. Gestörte Phosphorylierungsprozesse führen zu einer Absenkung der Bindungskapazität von Tubulin und somit zu einer Schädigung der Mikrotubuli-Struktur [97].

Mikrotubuli induzieren diverse zelluläre Prozesse wie Morphogenese, Zellteilung und intrazelluläre Transportvorgänge. Der Transport von Zellorganellen erfolgt über Mikrotubuli-abhängige Motorproteine, wie z.B. Kinesin und Dynein [98], [99]. Die axonalen Transportvorgänge in Neuronen werden durch Tau reguliert [100].

III.3.1 Tau und Alzheimer

Bei AD verliert Tau, aufgrund von Konformationsänderungen und Fehlfaltungen der Proteinstruktur, seine Fähigkeit an die Mikrotubuli zu binden. Dadurch kommt es zu Schädigungen im Zytoskelett der Neuronen [101]. Dies führt zur Ablösung des Taus und zu einer anschließenden Akkumulation zu oligomeren und fibrillären Tau-Strukturen wie geraden- (straight filaments, SF) oder gepaarten, helikalen (paired helical filaments, PHF) Filamenten. Diese Strukturen können sich weiter zusammen schließen, um die bei AD typischen neurofibrillären Tangles (NFTs) zu bilden [102].

Die oligomeren Formen weisen *in vitro* eine erhöhte Toxizität im Vergleich zu den NFTs auf [103]. Scheinbar ist die nachträgliche Polymerisierung zu SF, PHF und NFTs ein endogener Vorgang um den Abbau der toxischen Tau Oligomere aus dem Cytosol zu ermöglichen [104].

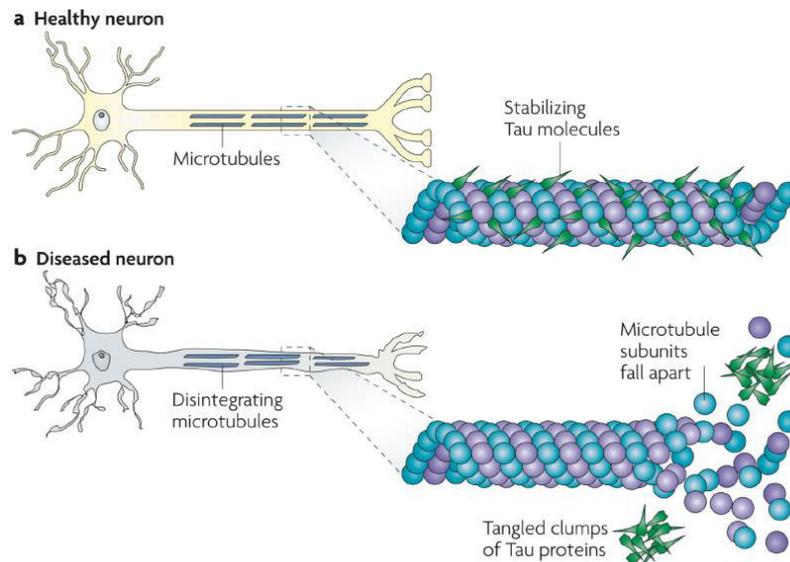


Abb. 8: Störung der Stabilität der Mikrotubuli durch hyperphosphoryliertes Tau [105]

Als Grund für die Konformationsänderungen und Fehlfaltungen, die zur Polymerisation des Proteins führen, werden posttranslationale Veränderungen beschrieben [106]. Zu diesen Veränderungen gehören unter anderem die Hyperphosphorylierung, Acetylierung und die proteolytische Spaltung. Diese werden als Hauptursachen und Triebkräfte für die Tangle-Bildung beschrieben [97].

Im gesunden Gehirn ist Tau nur wenig phosphoryliert und weist dadurch eine gute Löslichkeit und nahezu keine Sekundärstruktur auf. Ein über 10-facher Überschuss an Tubulin im Vergleich zu Tau, gewährleistet eine fast vollständige Bindung des Proteins an die Mikrotubuli [104].

Das Vorkommen von hyperphosphoryliertem Tau bei AD Patienten ist drei- bis vierfach höher als bei gleichaltrigen Kontrollpatienten ohne AD. Dabei ist das hyperphosphorylierte Tau ein wichtiger Bestandteil der charakteristischen PHFs und NFTs [107]. Zusätzlich befinden sich ca. 40% des gesamten hyperphosphorylierten Tau im Zytosol der AD Patienten und sind nicht zu PHFs oder NFTs aggregiert. Dieses freie, hyperphosphorylierte Tau kann die, oben beschriebenen toxischen Oligomere ausbilden [108]. Als Ursache für die Hyperphosphorylierung von Tau ist eine abgeschwächte Aktivität von Tau-Phosphatasen (Serin-/Threonin Phosphatasen), wie den Protein Phosphatasen PP1, PP2A, PP2B und PP5 beschrieben worden. Eine Reduzierung der gesamten Tau-Phosphatase-Aktivität von bis zu 50% wurde bei AD Patienten nachgewiesen [109].

Die Hyperphosphorylierung von Tau kann jedoch auch das Ergebnis einer Erhöhung der Aktivität von Tau-Kinasen sein. Dabei scheint GSK3 β die wichtigste Kinase bei der Regulierung der Tau-Phosphorylierung darzustellen. Weitere mögliche, beteiligte Kinasen

sind die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5), die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMK-II) [110]. Veränderungen der Kinaseaktivität wurden *in vitro* auch abhängig von der Einwirkung von A β Peptiden beschrieben [111].

Im Inneren der PHFs wurden zusätzlich proteolytisch verkürzte Tau gefunden [112], [113]. Die verkürzten Tau Strukturen konnten auch bei AD Patienten nachgewiesen werden [114]. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass sich diese Fragmente verstärkt und deutlich schneller zusammenlagern als das ungekürzte Tauprotein [115].

Zusätzlich konnte acetyliertes Tau in allen Stadien von AD nachgewiesen werden, deren Häufigkeit mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert. Am häufigsten konnte acetyliertes Tau in den NFTs gefunden werden [116].

Die Verteilung des acetylierten Tau in den verschiedenen Hirnarealen entspricht der Verteilung des hyperphosphorylierten Tau, wodurch es zur Vermutung kam, dass bei AD eine Hyperphosphorylierung vor der Acetylierung stattfindet. Die Acetylierung des Tau könnte somit ein Zwischenschritt bei der Bildung der neurofibrillären Tangles sein [116].

Die zwischenzeitlich gebildeten Tau-Oligomere weisen die höchste Toxizität der aggregierten hyperphosphorylierten Spezies auf und tragen wahrscheinlich am stärksten zur Neurodegeneration und dem damit verbundenen kognitiven Verfall bei AD bei. Die hyperphosphorylierten Tau-Oligomere finden sich unter anderem verstärkt in den Pre- und Postsynapsen der von AD betroffenen Neuronen, wodurch eine daraus resultierende toxische Wirkung gerade in diesen Bereichen wahrscheinlich ist [117].

Eine Reduktion von löslichen, oligomeren A β Spezies führt zu einer Absenkung der Tau-Pathologie in transgenen Mausmodellen und verdeutlicht, dass A β und Tau Veränderungen synergistisch miteinander im Zusammenhang stehen könnten [30].

Die bei AD offensichtlichen, aggregierten hyperphosphorylierten Tau-Spezies (SFs, PHFs und NTFs) sind eventuell lediglich ein Versuch der Zelle, die toxischen löslichen Formen unschädlich zu machen.

III.3.2 Tau-regulierende Therapieansätze bei AD

Da die, in dieser Arbeit analysierten, Substanzen nur A β vermittelte, indirekte Wirkung auf die Tau-Pathologie haben, werden die aktuellen therapeutischen Entwicklungen an diesem Target nur kurz tabellarisch dargestellt.

Tab. 2: Übersicht über Tau-regulierende Therapieansätze in der klinischen Entwicklung

Mikrotubuli stabilisierende Substanzen	<i>Epothilone D</i>	verbessert kognitive Funktionen	Phase I, milde AD	NCT01492374
	<i>Davunetide</i> (NAP, AI-108)	intranasale Applikation	Phase II, verschiedene Tauopathien	NCT01056965
Inhibierung der Tau Kinasen	<i>LiCl</i> (GSK-3 β)	keine Wirkung	Zwei kleine Studien, milde bis moderate AD	[118] [119] (ISRCTN72046462)
	<i>Tideglusib</i> (NP-12, GSK-3 β)	leichte Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten	Phase II, AD und PSP*	NCT01350362
	<i>Valproat</i> (GSK-3 β)	Erhöhung der Atrophie des Hirns, keine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten	Phase III	NCT00071721 [120]
Aktivierung der Tau Phosphatasen	<i>Memantin</i> (PP2A)	nach 1 Jahr signifikant weniger phosphoryliertes Tau im CSF von AD Patienten	Zugelassen als nicht-kompetitiver N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor Antagonist	[8]
Tau-Aggregationshemmer	<i>Methylenblau</i>	Verbesserung der kognitiven Defizite	Phase II beendet 3 Phase III Studien, erste Ergebnisse 2016 erwartet	[121] [122]
Entzündungs-hemmende Therapie	<i>Etanercept</i> (Tumor-Nekrose-Faktor Inhibitor)	Injektionen ins Rückenmark, Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten	Phase II, doppelblind gegen Placebo	NCT01068353

* PSP = progressive supranukleäre Blickparese

Noch nicht in klinischen Studien, aber erfolgreich in *in vitro* Tests sind andere Kinase-Inhibitoren und Phosphatase Aktivatoren, andere Mikrotubuli-stabilisierende Substanzen, weiterentwickelte Tau-Aggregationshemmer [123] und die Immunotherapie mit Tau-spezifischen Antikörpern (z.B. Tau 378-408) zur Verhinderung der Ausbreitung der Tau-Pathologie [124].

Bei folgenden therapeutischen Ansätzen konnten bislang noch keine vielversprechenden Ergebnisse erzielt werden. Dies betrifft den Abbau von fehlgefaltetem Tau und NFTs, die Inhibierung der Tau Expression und Inhibierung anderer post-translationaler Modifikationen (Acetylierung, Verkürzung von Tau, usw.) [8], [125].

III.4 Mitochondrien

III.4.1 Die Atmungskette

Als Energiekraftwerke aller Zellen, außer der roten Blutkörperchen, kommt den Mitochondrien eine essentielle, lebensnotwendige Bedeutung im gesamten Organismus zu. Sie sind verantwortlich für die Versorgung der Zellen mit ATP (Adenosintri-phosphat), welches innerhalb der Atmungskette gebildet wird.

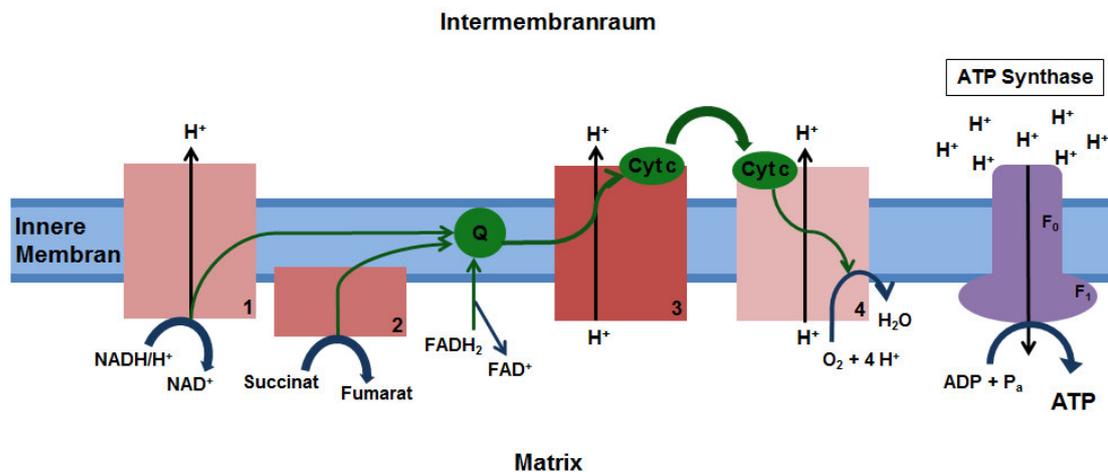


Abb. 9: Mitochondriale Atmungskette, nach [126]

Die Elektronen, die bei verschiedenen Stoffwechselprozessen (z.B. Zitratzyklus) entstehen, werden durch die Atmungskette in verschiedenen Redoxschritten (Komplex 1-4) auf Sauerstoff übertragen. In einer Knallgas-ähnlichen Reaktion entsteht dabei Wasser. Da diese Reaktion auf direktem Weg sehr exotherm ist, ermöglichen die einzelnen Redoxkomplexe eine schonende, schrittweise Elektronenübertragung.

Auf dem Weg zum Sauerstoff wird ein Protonengradient zur inneren Mitochondrienmembran aufgebaut. Dieser Gradient ermöglicht schließlich die Umwandlung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat durch die ATP Synthase [126].

III.4.2 Fission- und Fusion-Prozesse

Mitochondrien sind, neben ihrer Hauptaufgabe zur Energieversorgung, der endogene Hauptlieferant der ROS. Hohe ROS-Spiegel wirken jedoch toxisch auf die Mitochondrien. Die Regulierung der Gehalte der ROS unterliegt einem strengen Kontrollmechanismus.

Mitochondrien sind sehr dynamisch und führen kontinuierlich Fission (Teilungs)- und Fusion (Vereinigungs)-Prozesse aus. Das Gleichgewicht beider Abläufe ist essentiell für die ROS-Regulierung, die Energiebereitstellung sowie für die Transportfähigkeit der Mitochondrien innerhalb der Zelle [127].

Mit fortschreitender Lebensdauer eines Mitochondriums kommt es vermehrt zu oxidativen Schädigungen wie zu Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) und Fehlfunktionen der Atmungskette. Diese führen zu einer verstärkten Bildung der ROS. Um diese übermäßige ROS-Bildung zu unterbinden, werden defekte Mitochondrien durch Fission verkleinert. Dabei können eventuelle noch funktionsfähige Bereiche erhalten werden, indem ein gesundes und ein geschädigtes Mitochondrium gebildet wird. Der geschädigte Bereich wird somit abgetrennt und durch mitochondriale Autophagozytose (Mitophagozytose) abgebaut [128], [129]. Fission-Prozesse sind zusätzlich essentiell für den Transport der Mitochondrien in bestimmte Zellkompartimente (z.B. bei Nervenzellen in die Dendriten und durch die Axone zu den Synapsen). Zu große Mitochondrien können diese Bereiche nicht erreichen [130]. Im Umkehrschluss sind Mitochondrien in der Lage bei hohem Energiebedarf, in Stresssituationen die ATP-Produktion zu erhöhen indem sie verstärkten Fusion-Prozessen unterliegen [129].

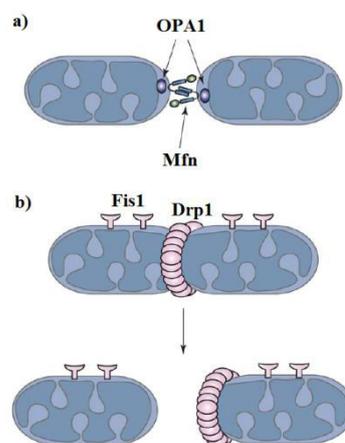


Abb. 10: Dynamische Fusion- (a) und Fission-Prozesse (b) der Mitochondrien [131]

Für die mitochondriale Fusion sind verschiedene GTPasen verantwortlich: Mfn1 (Mitofusin 1), Mfn2 (Mitofusin 2) und Opa1 (optic atrophy 1). Die, auf der äußeren Membran lokalisierten, Mitofusine benachbarter Mitochondrien dimerisieren und führen somit zur Fusion der äußeren Membran. Die Fusion der inneren Membran erfolgt anschließend durch Opa1, welches im Intermembranraum vorliegt [132].

Die mitochondriale Teilung bzw. Fission wird durch zwei weitere GTPasen reguliert: Fis1 (Fission 1 Protein) und Drp1 (auch Dlp1; dynamin-like/related Protein 1). Während Fis1 hauptsächlich in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist, befindet sich der Großteil von Drp1 im Zytosol bis er für die Fission rekrutiert wird. Es wurde berichtet, dass Drp1 essentiell an der Ausbildung der mitochondrialen Form, Größe, Verteilung sowie deren Neugestaltung und Aufrechterhaltung beteiligt ist [133].

III.4.3 Mitochondriale Dysfunktion bei Alzheimer

In den letzten Jahren wurden Veränderungen der Mitochondrien unter anderem bei Untersuchungen zur Entstehung von Morbus Alzheimer identifiziert. Dabei konnten Störungen der mitochondrialen Dynamik (Fission- und Fusion-Prozesse), bei den Transportprozessen der Mitochondrien und ein Funktionsverlust der Atmungskette nachgewiesen werden [127], [133].

Um eine normale Funktion der Mitochondrien zu gewährleisten, müssen diese eine intakte Struktur aufweisen um den elektrochemischen Gradienten in der Atmungskette aufrecht zu erhalten. Geschädigte Mitochondrien, die z.B. zerstörte Cristae oder eine teilweise oder ganzheitlich zerstörte innere Struktur aufweisen, konnten in Neuronen der Hirnrinde und dem Hippocampus sowie in peripheren Geweben von AD Patienten nachgewiesen werden [27]. Außerdem wurde bei diesen Patienten eine leichte Erhöhung der gemittelten Mitochondriengröße beschrieben, die mit einer Verringerung der Anzahl, vor allem in Axonen, Dendriten und Nervenendigungen, einhergeht. Zusätzlich treten Abweichungen von der mittleren, in gesunden Neuronen vorliegenden, Mitochondriengröße durch die Bildung sehr kleiner aber auch großer, geschwollener Mitochondrien, auf [134], [135].

Ein weiterer Unterschied zwischen gleichaltrigen Kontrollpersonen und AD Patienten ist das erhöhte ROS (reactive oxygen species)-Level [136]. Normalerweise ist das Level sehr niedrig, da die Bildung im Gleichgewicht zu ihrem Abbau durch Antioxidantien steht. Oxidativer Stress beschreibt schließlich ein Ungleichgewicht dieser Vorgänge. Die Generierung der ROS erfolgt hauptsächlich durch ein „Elektronenleck“ in Komplex I und III der Atmungskette [137]. Der Abbau der ROS erfolgt über antioxidative Vorgänge, wie z. B. der Abbau von O_2^- durch Superoxiddismutasen (SOD) [137].

Neben der gestörten Funktion des Komplex I wurde auch eine verringerte Aktivität des Komplex IV bei AD Patienten festgestellt [136]. Ob diese Aktivitätsverringering direkt durch

die Krankheit verursacht wird oder indirekt durch die hohen ROS-Level aus der Fehlfunktion in Komplex I resultiert, ist bislang noch nicht genau belegt [136]. Zusätzlich führt die erhöhte ROS-Bildung zur Freisetzung von Cytochrome c, wodurch apoptotische Vorgänge ausgelöst werden können [138].

Im Zuge der Untersuchungen der mitochondrialen Dysfunktion bei AD, wurde auch ein verringerter Energiestoffwechsel in Form eines verringerten Glucose-Metabolismus festgestellt [139]. Die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) ist herabgesetzt. Der gestörte Energiestoffwechsel führt zur Erhöhung von A β und seinen schädigenden Einflüssen auf die Neuronen [140].

Durch all diese Veränderungen kommt es zur mitochondrialen Dysfunktion, die eine ausreichende Versorgung mit Energie in Form von ATP unmöglich macht und dadurch zum Untergang von Synapsen und Neuronen führt.

III.4.3.1 Gestörte Fission- und Fusion-Prozesse bei Alzheimer

Gesunde Neuronen sind stark polarisierte Zellen, welche vergleichsweise verlängerte Mitochondrien im Bereich des Zellkörpers (Soma) und stärker fragmentierte Mitochondrien in den Axonen aufweisen [135]. Diese Zellen benötigen viel Energie in Form von ATP für axonale Transportvorgänge von Makromolekülen und Zellorganellen (wie den Mitochondrien selbst), sowie der Aufrechterhaltung von Ionengradienten und dem Membranpotential. Weiterhin wird viel Energie benötigt, um den Transport und die Freisetzung der Neurotransmitter zu bewerkstelligen [141].

Bei AD ist das Gleichgewicht zwischen Fission und Fusion gestört, was zu einer gestörten Regulierung der ROS führt (siehe Kapitel III.4.2). Es werden verstärkt sehr kleine, aber auch große geschwollene Mitochondrien gefunden. Diese Beobachtung konnte in postmortalen Studien an AD Patienten bestätigt werden, da dort eine Erhöhung der Fission-Proteine Drp1 und Fis1, jedoch eine Reduktion der Fusion-Proteine Mfn 1/2 und Opa1 nachgewiesen werden konnte [142]. Dies führt zu einer Steigerung der Fission der Mitochondrien. Die so erzeugten sehr kleinen Mitochondrien können sich nicht gerichtet bewegen und gelangen nicht mehr kontrolliert in die Regionen mit erhöhtem ATP-Bedarf. Ebenfalls können sehr kleine Mitochondrien keine funktionsfähige Atmungskette ausbilden, wodurch eine ausreichende ATP-Versorgung nicht mehr zu Stande kommt, aber eine erhöhte Erzeugung von ROS stattfindet, welche die Mitochondrien weiter zusätzlich schädigen.

Obwohl eine erhöhte Fission zu einer verstärkten Teilung der Mitochondrien führt, wird in den Axonen, Nervenendigungen und den Dendriten eine starke Verringerung der Mitochondrienanzahl beobachtet. Der Grund dafür ist, neben der ungerichteten Beweglichkeit der sehr kleinen Mitochondrien, die gesteigerte Mitophagozytose, die durch die erhöhten Gehalte an Drp1 in Gang gesetzt wird (fission-mediated mitophagy) [143]. Erhöhter oxidativer Stress, der aus bereits geschädigten Mitochondrien resultiert, wirkt sich nachhaltig weiter auf die Mitochondrien-Dynamik aus. Essentielle Störungen der Fission- und Fusion-Abläufe führen zu einer mangelhaften Energieversorgung, einer gestörten lokalen Verteilung der Mitochondrien in den Neuronen, synaptischen Schädigungen und zu einem Absterben der Neuronen.

III.4.3.2 Auswirkungen von A β auf die mitochondriale Funktion

Synapsen sind besonders empfindlich bezüglich der schädigenden Wirkung von A β . In diesem Bereich der Nervenzelle befinden sich bei gesunden Zellen besonders viele Mitochondrien um den hohen Energiebedarf zu gewährleisten. Diese Mitochondrien sind etwas kleiner als die Mitochondrien im Zellkörper (Soma) [135]. Der Grund dafür ist, dass die Biosynthese der Mitochondrien im Soma stattfindet. Für den axonalen Transport dürfen die Mitochondrien jedoch nur eine bestimmte Größe aufweisen, um bis zur Synapse zu gelangen. Durch die negativen Auswirkungen von A β , genau in diesem Bereich der Nervenzelle, werden besonders viele Mitochondrien geschädigt, was zu einem für AD typischen Untergang der Synapsen führt [28].

In verschiedenen, transgenen Mausmodellen konnten A β -Ablagerungen innerhalb der Neuronen gefunden werden, bevor es zur Ausbildung der extrazellulären A β -Plaques kommt [144]. Dieses Verhalten konnte auch in Neuronen von AD Patienten nachgewiesen werden [145].

Die Herkunft des intrazellulären A β unterliegt verschiedenen vorgeschlagenen Mechanismen. Zum einen könnte das intrazelluläre A β innerhalb der Zelle selbst gebildet werden, da sowohl APP als auch β - und γ -Sekretase innerhalb der Zelle gefunden wurden (z.B. an den Membranen der Mitochondrien, dem trans-Golgi-Netzwerk, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), in Endosomen, Autophagosomen und Lysosomen) [146], [147]. Viele Studien kommen jedoch zum Schluss, dass lösliches extrazelluläres A β durch die Zellmembran in das Innere der Zelle gelangt. Während Aufnahme wege des A β , zu dessen

Abbau, wie die Phagozytose, Pinocytose und Endocytose für Gliazellen charakteristisch sind, erfolgt die Aufnahme in Neuronen über Lipid Rafts und damit assoziierte A β -bindende Proteine wie Glutamat-Rezeptoren (z.B.: der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor), Acetylcholin Rezeptoren (z.B.: der $\alpha 7$ nikotinische Acetylcholinrezeptor ($\alpha 7nChR$)) und Apolipoproteine (z.B. ApoE4). Lipid Raft-assoziierte Proteine (außer der Apolipoproteine) sind hauptsächlich in der synaptischen Membran lokalisiert [148]. Dies unterstützt die Erkenntnis dass extrazelluläres A β 42 vorzugsweise zu Schädigungen an den Synapsen führt [148], [27].

Das intrazelluläre A β gelangt anschließend über Translocasen, die sich auf der äußeren mitochondrialen Membran befinden (translocase of the outer membrane, TOM), in die Zellorganellen [149]. A β konnte sowohl in der inneren mitochondrialen Membran, sowie in der Mitochondrien-Matrix von AD Patienten nachgewiesen werden [150]. Das intrazelluläre A β führt nachweislich zu einer verringerten Aktivität des Komplex IV der Atmungskette und somit zu einer verringerten ATP Produktion [136].

Die geschädigten Mitochondrien weisen ebenfalls Störungen der Ca²⁺-Regulation auf. Dabei werden A β metabotrophe Glutamat-Rezeptoren aktiviert, welche zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören. Es ergibt sich dadurch eine gesteigerte Aktivität der Mitochondrien-assoziierten ER-Membran (MAM), welche zu einem verstärkten Einstrom von Ca²⁺ aus dem ER in das Mitochondrium führt [151].

Eine starke Erhöhung der Ca²⁺ Konzentrationen innerhalb der Mitochondrien führt zur Ausbildung von mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP), welche einen raschen Ausstrom der überschüssigen Ca²⁺-Ionen ermöglichen. Jedoch kommt es dadurch auch zu einem unkontrollierten Einstrom von Flüssigkeit. Diese Flüssigkeit führt zum oben erwähnten Anschwellen der Mitochondrien und zur Zerstörung der inneren Struktur (Cristae) bis hin zum Bersten der äußeren mitochondrialen Membran. Die Schädigung der Mitochondrien wird an einem Absinken des mitochondrialen Membranpotentials sichtbar. Intrazelluläres A β fördert die Ausbildung der mPTP durch Wechselwirkung mit einem zur Ausbildung dieser Poren benötigten Kompartiments, dem Cyclophilin D (CypD) [151].

III.4.3.3 Auswirkungen von Tau auf die mitochondriale Funktion

Die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion durch hyperphosphoryliertes Tau ist bislang deutlich weniger untersucht worden, als die Beeinflussung durch A β .

Die Verringerung der Mitochondrien in den Axonen, Nervenendigungen und Dendriten resultiert neben der gesteigerten Mitophagozytose, zusätzlich aus gestörten axonalen Transportvorgängen. In gesunden Zellen stabilisiert Tau die Mikrotubuli [152], [153]. Der Transport der Mitochondrien erfolgt hauptsächlich entlang der Mikrotubuli und ist neben den Motorproteinen (Kinesin und Dynein) auch von den Ca^{2+} -bindenden GTPasen Miro und Milton abhängig [154]. Bei der Destabilisierung des Zytoskeletts durch NFTs kommt es zu einer gestörten Ausbildung der Motorprotein-Komplexe zwischen den Mitochondrien und den Mikrotubuli [105]. Untersuchungen haben gezeigt, dass reduzierte Gehalte an Miro- und/oder Milton sowie ein Mangel an axonalen Mitochondrien zu einer verstärkten Phosphorylierung des Tau führen und somit die Destabilisierung der Mikrotubuli weiter begünstigen können [154]. Das Fusion-Protein Mfn2 interagiert scheinbar mit dem Miro-Protein des Motorprotein-Komplexes. Mfn2-knockout Mäuse zeigen eine deutliche Verschlechterung der Transportprozesse [130]. Da bei AD der Gehalt an Mfn2 verringert ist (siehe III.4.3.1) könnte diese Interaktion einen Einfluss auf die fortschreitende Neurodegeneration haben. Eine weitere mögliche Ursache für einen herabgesetzten Mitochondrientransport durch das Vorliegen von NFTs könnte sein, dass eine Rekrutierung des Drp1 aus dem Zytosol zum Mitochondrium durch die Tangles unterbunden wird. Deswegen kommt es im Soma zu einer reduzierten Fission und somit vergrößerten Mitochondrien [135]. Diese können aufgrund ihrer Größe nicht durch die Axone und in die Dendriten transportiert werden. Aufgrund der herabgesetzten Fission werden die vergrößerten Mitochondrien im Soma ebenfalls langsamer abgebaut [130]. Sie unterliegen somit einer längeren Zeitspanne, in der sie oxidativem Stress ausgesetzt sind. Dies führt zu Schädigungen, wie einem Funktionsverlust innerhalb der Atemkette, Mutationen in Fission- und Fusionproteinen sowie in der mtDNA [130]. Eine tau-vermittelte Reduzierung der Anzahl an Mitochondrien in Axonen, Dendriten und Nervenendigungen könnte demnach zusätzlich und synergistisch zu den neurotoxischen Wirkungen von A β zur Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer führen.

III.4.4 Therapieansätze zur Verbesserung der mitochondrialen Dysfunktion

Antioxidative Therapien zur Verbesserung der mitochondrialen Dysfunktion und der daraus resultierenden Neurodegeneration stellen einen wichtigen Zweig der AD Forschung und anderer neurodegenerativer Krankheiten dar. Die Untersuchungen reichen dabei von Fischöl

(Omega-3-Fettsäuren) über Vitamin E und anderen Naturstoffen, bis hin zu synthetischen Antioxidantien wie MitoQ und Dimebon.

Viele dieser möglichen Therapeutika zeigen in Zelltests eine verbesserte mitochondriale Atmung, eine Verbesserung der synaptischen Plastizität, eine Senkung inflammatorischer Biomarker, eine Verbesserung der Ca^{2+} -Homöostase und eine Prävention der A β induzierten Toxizität. Viele dieser Substanzen befinden sich derzeit entweder in klinischen Studien oder konnten bislang keine *in vivo* Effizienz zeigen [155].

Der vielversprechendste Kandidat dieser AD Therapieoption in klinischen Studien war Dimebon. Dieses zeigte in Phase II Studien (randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert) eine signifikante Verbesserung der kognitiven Veränderungen nach 26 Wochen und einer Dosis von 3 x 20 mg/Tag [156]. Leider konnten diese positiven Ergebnisse in Phase III Studien nicht bestätigt werden. Diese Studien wurden jedoch anders konzipiert (andere Dimebon-Formulierung, anderes Krankheitsstadium und ein deutlich höheres Durchschnittsalter der Patienten). Bei den Phase III Studien konnte außerdem in der Placebogruppe keine Verschlechterung der Symptome beobachtet werden, wodurch die Auswertung der Effizienz von Dimebon zusätzlich erschwert ist [157]. Auch in Studien zu anderen antioxidativen Wirkstoffen konnte gezeigt werden, dass nur ein frühzeitiger Therapiebeginn zu signifikanten Wirkungen führt [158]. Ob die negativen Resultate von Dimebon in den Phase III Studien an mangelnder Wirksamkeit oder aus einem ungeeigneten Studien-Design resultieren bleibt ungewiss [156].

Naturstoffe wie Curcumin, L-Carnitin und Resveratrol zeigten trotz vielversprechender Ergebnisse in *in vitro* Tests, sowie in präklinischen Tierstudien, maximal moderate Wirkungen in klinischen Studien. Der Grund dafür ist hauptsächlich die schlechte Bioverfügbarkeit dieser Substanzen, aber auch zu kurze Behandlungsdauern und eine Patientenauswahl mit zu weit fortgeschrittenen Krankheitsverläufen [159], [160]. Klinische Studien zur Arzneipflanze Ginkgo biloba kommen zu keinen einheitlichen Ergebnissen. Während einige dieser Studien signifikante Verbesserungen der kognitiven Symptomatik beschreiben, wird die Wirksamkeit in anderen Studien stark angezweifelt. Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) spricht sich jedoch seit 2008 für die Verschreibung des Ginkgo biloba-Extraktes EGb 761 mit einer hohen Dosis von 240 mg/Tag in Deutschland aus [161].

Die bislang erzielte Wirksamkeit der Arzneistoffe zur Therapie der mitochondrialen Dysfunktion scheint bislang nicht ausreichend zu sein, um eine effektive, alleinige Therapieoption bezüglich AD darzustellen.

VI Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

VI.1 Geräte

Für die Quantifizierung von MH84 und MH163 wurde eine MicrOTOF-Q-TOF LC-MS Anlage der Firma Bruker (Bremen, Deutschland) verwendet. Diese beinhaltet eine Agilent 1200 HPLC, die aus folgenden Teilen bestand: binäre Pumpe, Online-Vakuum-Degaser, Autosampler, UV-Detektor mit variabler Wellenlänge und einem Stickstoffgenerator (UHPLCMS18). Das Massenspektrometer der LC-MS Anlage war ein MicrOTOF-QII der Firma Bruker Daltronik.

Die Steuerung der Anlage erfolgte über die Software Compass 1.2 und micrOTOF-Q control, während die gemessenen Spektren anschließend mit der Software QuantAnalysisTM ausgewertet und quantifiziert wurden. Die Berechnung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte anschließend in Excel2007 von Microsoft.

V.1.1 MS-Detektion

Das verwendete MicrOTOF-QII Massenspektrometer verfügte über zwei verschiedene, austauschbare Ionisierungsmöglichkeiten. Während die ESI (electrospray ionization) nur während der Methodenentwicklung verwendet wurde, beinhalteten die endgültigen LC-MS-Methoden die Verwendung einer APCI (atmospheric pressure chemical ionization)-Quelle zur Ionisierung.

Beide Techniken finden unter Atmosphärendruck statt, sind relativ schonend und können mit geeigneten Parametern so verwendet werden, dass es nur zu einer geringen Fragmentierung der Moleküle kommt.

Bei der ESI wird der Lösungsmittelstrom, der den Analyten enthält, von der HPLC durch eine Kapillare geleitet. An der Spitze der Kapillare liegt eine Spannung an, welche durch das Zusammenspiel mit der Gegenelektrode (Spray-Schild) zur Ausbildung eines elektrischen Feldes führt. An der Spitze der Kapillare kommt es aufgrund der anliegenden Spannung zu einer Ansammlung gleichartiger Ladungen. Je nach der eingestellten Spannung können entweder positive oder negative Ladungen erzeugt werden. Bei optimalen Spray-Bedingungen bildet sich ein Taylor-Kegel aus, der die Freisetzung eines feinen Flüssigkeitsstroms aus der Kapillare ermöglicht. Durch die Vernebelung dieses Stromes durch ein neutrales Gas, dem Nebuliser Gas (N₂), kommt es zur Tröpfchenbildung. Die geladenen Tröpfchen bewegen sich

im elektrischen Feld in Richtung der Gegenelektrode und werden durch das Verdampfen des Lösungsmittels immer kleiner bis sich die gewünschten Ionen gebildet haben. Diese gelangen anschließend durch eine Glaskapillare, die sich in der Mitte des Spray-Schild befindet, in den Massenanalysator.

Bei der APCI-Ionisierung gelangt der HPLC-Lösungsmittelfluss ebenfalls durch eine Kapillare in den Ionisator. Diese Kapillare ist beheizt und führt mit Hilfe des Nebuliser Gases (N_2) zur Verdampfung der Lösung. Eine hohe Stromstärke, die an einer Corona-Nadel anliegt, führt zur Ladungsübertragung auf die Lösungsmittelmoleküle. Durch die weitere Verdampfung des Lösungsmittels durch das Trocknungsgas werden die Ladungen an den Analyten abgegeben, wodurch die gewünschten Ionen entstehen. Das Spray-Schild dient, wie bei der ESI-Ionisierung als Gegenelektrode und ermöglicht den Ionentransport in Richtung der Glaskapillare, die den Einlass zum Massenanalysator darstellt.

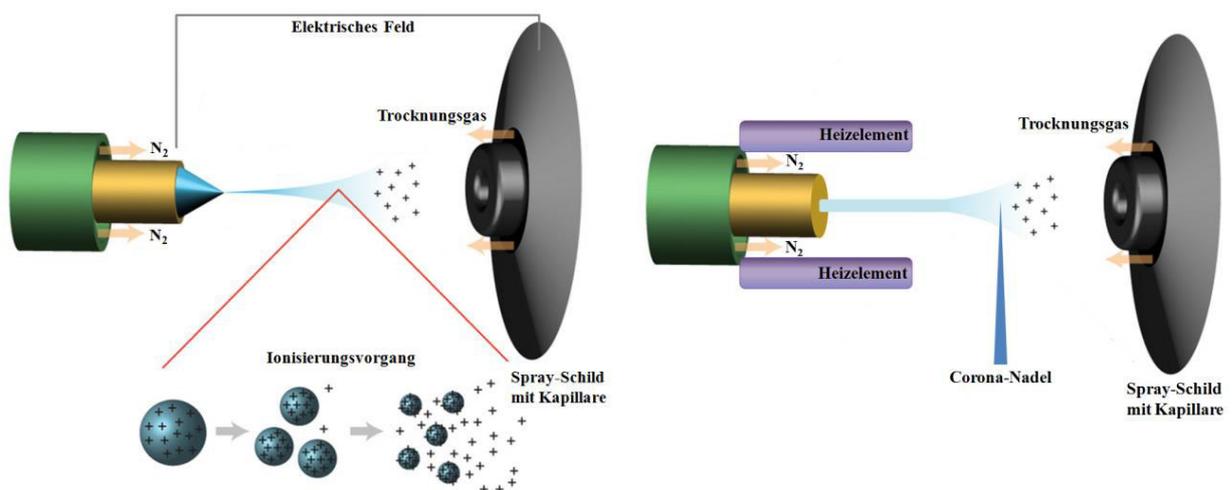


Abb. 11: Übersicht über die Ionisierungsvorgänge in der ESI- (links) und APCI-Quelle (rechts), nach [162]

Nach der Ionisierung gelangen die Ionen über ein Interface in den Massenanalysator. Das verwendete Massenspektrometer kombiniert dabei verschiedene massenanalytische Einheiten. Ein Hexapol, ein Quadrupol und ein Time-of-Flight (TOF) sind als Massenanalysatoren in Reihe geschaltet und führen zu einer sehr präzisen Massentrennung. Die Quadrupol-Einheit besitzt eine Kollisionszelle, womit zusätzlich eine gewünschte Fragmentierung mit anschließender Detektion von Tochterionen möglich ist. Diese MS/MS-Detektion wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht verwendet, da die unfragmentierten Molekülonen mit ausreichender Empfindlichkeit nachweisbar waren.

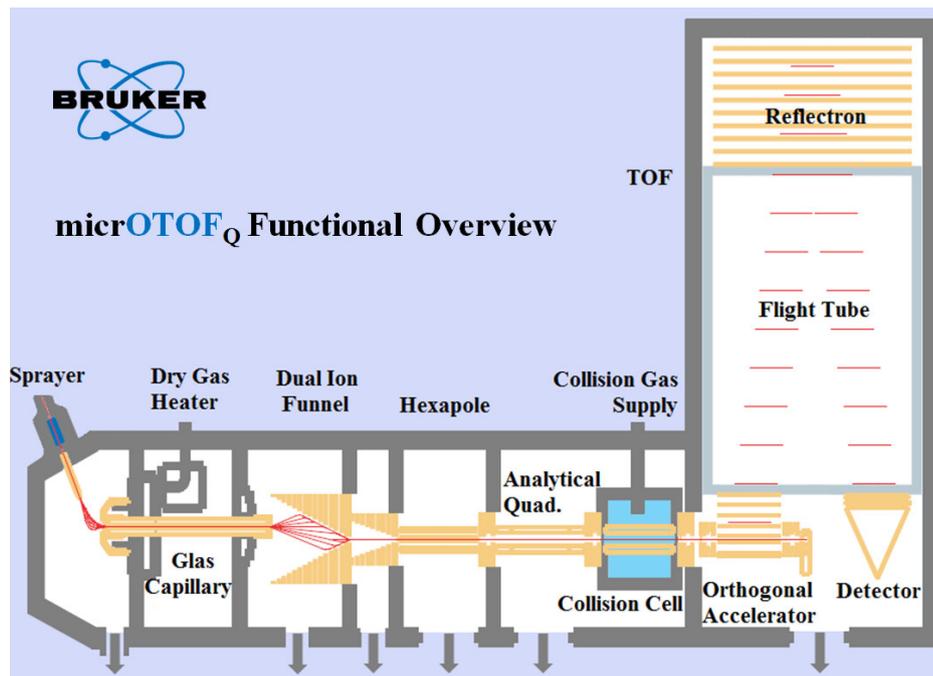


Abb. 12: Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers (Abb. nach Bruker)

VI.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die LC-MS Fließmittel Methanol und 0,1% Ameisensäure, tert.-Butylmethylether, Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS, > 99,9% ultra quality), Dimethylsulfoxid (DMSO), sowie die Lösungsmittel Aceton, Tetrahydrofuran (THF) und Acetonitril (ACN) wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen. Polyethylenglycol 400 (PEG400) wurde bei Sigma-Aldrich, Steinheim bestellt. Alle Chemikalien wiesen eine möglichst hohe Reinheit, mindestens aber HPLC-Standard auf.

Das Wasser, welches zur Pufferherstellung und zur Herstellung des 50%igen Methanol verwendet wurde, entstammt einem Wasseraufarbeitungs-System (ELGA, Purelab Ultra®). Dieses Wasser wurde anschließend nochmals destilliert.

Die Extrelut®-Säulen für die Probenaufarbeitung waren bei Merck, Darmstadt verfügbar. Die PALL GHP Acrodisc Spritzenfilter (45µm GHP Membran) lieferte Altmann Analytik (Analytics shop.com).

Die verwendete chromatographische HPLC-Trennsäule (MultoHigh 100 RP 18-5µ, 125 x 4 mm) wurde von CS Chromatographie Service, Langerwehe bezogen.

V Analytische Methodenentwicklung und –Validierung für MH84

Nach Auswahl von MH84 als vielversprechendstes Pirinixinsäure-Derivat für die Durchführung von präklinischen Tierstudien bezüglich Morbus Alzheimer war es notwendig eine geeignete, besonders empfindliche Analytik-Methode zu entwickeln. Die Methode der Wahl war eine LC-MS-Methode, da eine Massendetektion im Allgemeinen für viele organische Moleküle deutlich höhere Empfindlichkeiten ermöglicht als die Verwendung einer UV/VIS-Detektion. Dies konnte im Laufe der Methodenentwicklung bestätigt werden, da die LC-MS Anlage über einen zusätzlichen UV/VIS-Detektor verfügte und das dazugehörige UV-Chromatogramm aufzeichnet. Die empfindlichste UV-Wellenlänge wurde im Vorfeld an einer Varian ProStar 210 HPLC-Anlage mit UV/VIS-Detektor bestimmt. Die Software dieser Anlage ermöglicht es das UV-Absorptionsspektrum der untersuchten Substanz darzustellen. Die so bestimmte empfindlichste Wellenlänge lag bei 258 nm und wurde für die Referenzspektren der LC-MS Anlage übernommen. Der oben beschriebene Empfindlichkeitsvorteil ist in Abb.13 dargestellt.

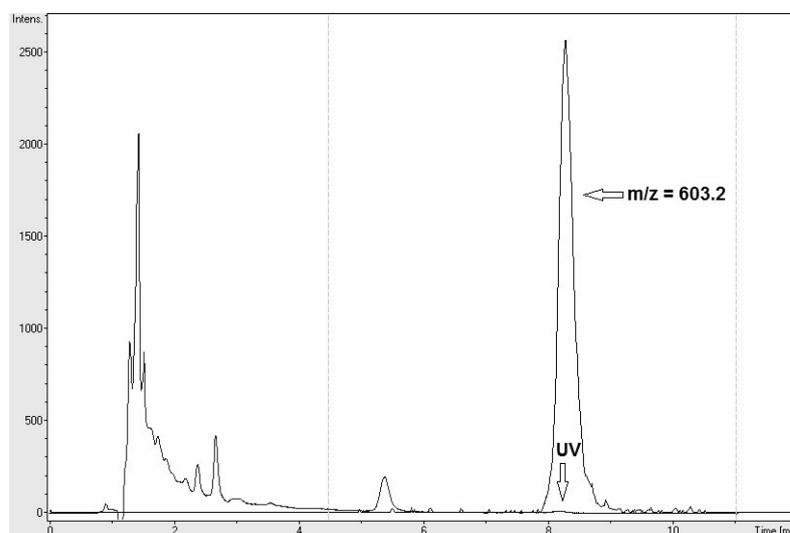


Abb. 13: Vergleich zwischen dem UV Chromatogramm und dem Chromatogramm der Massenspur von MH84 ($m/z = 603.2$) nach APCI-Parameteroptimierung, $c = 20 \text{ ng/mL}$; der Peak bei 5,5 min stammt von MH41 (UV-Signal vom IS, Massenspur nicht eingeblendet)

V.1 Entwicklung der HPLC-Trennmethode

Aufgrund des gewünschten Einsatzes der LC-MS-Methode für die Auswertung biologischer Proben wie Plasma- und Hirnproben aus Tierversuchen wurde die Trennmethode so entwickelt, dass mögliche Matrix-Signale, die nach der Probenaufarbeitung zurückbleiben könnten, vom gewünschten Substanz-Peak getrennt zu finden sind (Abb.13). Die MS-Detektion wurde zu Beginn mit Hilfe einer ESI-Ionenquelle durchgeführt. Da die Substanz aufgrund ihrer Struktur sehr lipophil ist, wurde zunächst auf einer Standard-RP18 Säule (Inertsil ODS-2 5 μm (150 x 2.1 mm)) ein optimales Lösungsmittelgemisch gesucht. Der geringe Durchmesser der Säule ist besonders geeignet für die geringen Fließmittelgeschwindigkeiten (max. 0,5 mL/min), die bei der ESI-Detektion verwendet werden.

Dabei wurden verschiedene Methanol/ Ameisensäure (0,1%) Gemische bei einer Flussrate von 0,5 mL/min getestet, indem man von einem 95%igen Methanol-Anteil ausging und diesen in kleinen Schritten verringerte. Bei einem Gemisch von 87% Methanol/ 13% Ameisensäure (0,1%) ergab sich eine Retentionszeit für MH84 von 8 min. Eine Retentionszeit zwischen 6 und 10 min ist wünschenswert um die oben beschriebenen, verbleibenden Matrixsignale abzutrennen und um ein Retentionsfenster für einen internen Standard (IS) zu belassen.

Die Empfindlichkeit der ESI-Methode im negativ-Modus lag bei einem Injektionsvolumen von 100 μL bei einem LOQ von 15 ng/mL und somit unwesentlich geringer als die Empfindlichkeit des dazu gehörigen UV-Chromatogramms mit einem LOQ von 20 ng/mL. Eine Umstellung auf den positiv-Modus an der ESI-Quelle führte zu einem nahezu vollständigen Verlust des Signals. Aufgrund der zu erwartenden sehr kleinen Konzentrationen in den Hirnproben, musste die Empfindlichkeit weiter verbessert werden. Trotz optimierter ESI-Einstellungen konnte dieses Ziel nicht erreicht werden. Aus diesem Grund wurde eine APCI-Ionenquelle eingesetzt und auf eine Verbesserung bezüglich der Empfindlichkeit untersucht. Die bislang eingesetzte Inertsil ODS-2 Säule konnte für diese Untersuchungen nicht genutzt werden. Aufgrund des geringen Säulendurchmessers kam es bei der Verwendung der geforderten minimalen Flussrate von 1 mL/min für die APCI-Detektion zu einem zu hohen Druck (> 400 Bar) für die Anlage.

Daraufhin wurde eine MulthoHigh 100 RP 18-5 μ (125 x 4 mm) Säule ausgewählt und das Fließmittelgemisch bei einem Fluss von 1 mL/min erneut angepasst.

Ein Gemisch von 89% Methanol/ 11% Ameisensäure (0,1%) lieferte eine vergleichbare Retentionszeit des Analyten von 8,3 min. Da im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung nach einem internen Standard mit höherer Retentionszeit als MH84 gesucht wurde (siehe Kap. V.2), wurden 91% Methanol und 9% Ameisensäure (0,1%) verwendet um eine Retentionszeit von 6 min zu erhalten. Dieses Fließmittelgemisch wurde für die Testung von verschiedenen Säulen-Materialien beibehalten. Überraschender Weise konnte bei der Verwendung der APCI-Quelle eine höhere Empfindlichkeit im positiv-Modus im Vergleich zum negativ-Modus erzielt werden, obwohl Moleküle mit Säuregruppen erfahrungsgemäß bevorzugt mit einer negativen Ionisierung detektierbar sind.

Um einen Einfluss verschiedener Säulenmaterialien auf die Trennung und Empfindlichkeit der Methode zu untersuchen, wurden vor allem andere C18-Säulen wie Nucleodur 100-5 C18 ec (125 x 4 mm), LiChrospher 100 RP 18-5 μ EC (125 x 4 mm) und Multospher 120 RP 18 HP-5 μ (125 x 4 mm) aber auch eine C8-Säule (Lichrosphere 5 μ RP8, 125 x 4 mm) untersucht.

Die zu Beginn getestete MultoHigh 100 RP 18-5 μ column (125 x 4 mm) Säule stellte sich bezüglich des Retentionsverhaltens verglichen mit den Matrix-Signalen, der Peakform, der Empfindlichkeit und dem erzeugten Druck auf das HPLC System am geeignetsten heraus. Der sich dabei ergebende LOQ bei einem Injektionsvolumen von 100 μ L lag bei 4 ng/mL. Um das Injektionsvolumen für die Schonung der HPLC-Säule bei der Injektion von aufgearbeiteten Matrix-Proben auf 50 μ L zu verringern wurden die Parameter der APCI-Ionisierung optimiert (siehe Kap. V.3).

V.2 Bestimmung eines internen Standards

V.2.1 Strukturell verschiedene Substanzen

Die Anforderung an einen internen Standard wurde im Vorfeld der Suche festgelegt. Die Substanz sollte, wenn möglich, eine höhere Retentionszeit als MH84 bei der Verwendung der entwickelten Methode aufweisen. Diese Anforderung wurde gestellt um eine möglichst hohe Empfindlichkeit der Methode für MH84 zu realisieren. Bei der Elution des internen Standards nach dem Analyten, kann dieser zu kleineren Retentionszeiten verschoben werden. Umso früher der Analyt eluiert, desto höher wird der erhaltene Peak und umso empfindlicher ist die

Methode. Dies wird deutlich bei der Bestimmung der Nachweisgrenzen, da dort die Höhe des Peaks ins Verhältnis zur Höhe des Rauschens gesetzt wird.

Zunächst wurden verschiedene im Haus verfügbare, kommerziell erhältliche Substanzen auf die Eignung als möglicher interner Standard untersucht. Diese Substanzen waren strukturell verschieden zu MH84, aber wurden bezüglich ihrer lipophilen Eigenschaften ausgewählt, wodurch ähnliche Retentionszeiten zu erwarten waren. Dabei handelte es sich um Amitriptylin (1), Bamipin (2), Benzafibrat (3), Carbamazepin (4), Chlorpromazin (5), Clotrimazol (6), Diphenhydramin (7), Levonorgestrel (8) und Spironolacton (9). Leider wies keine dieser Substanzen eine annähernd ähnliche Retentionszeit wie MH84 auf.

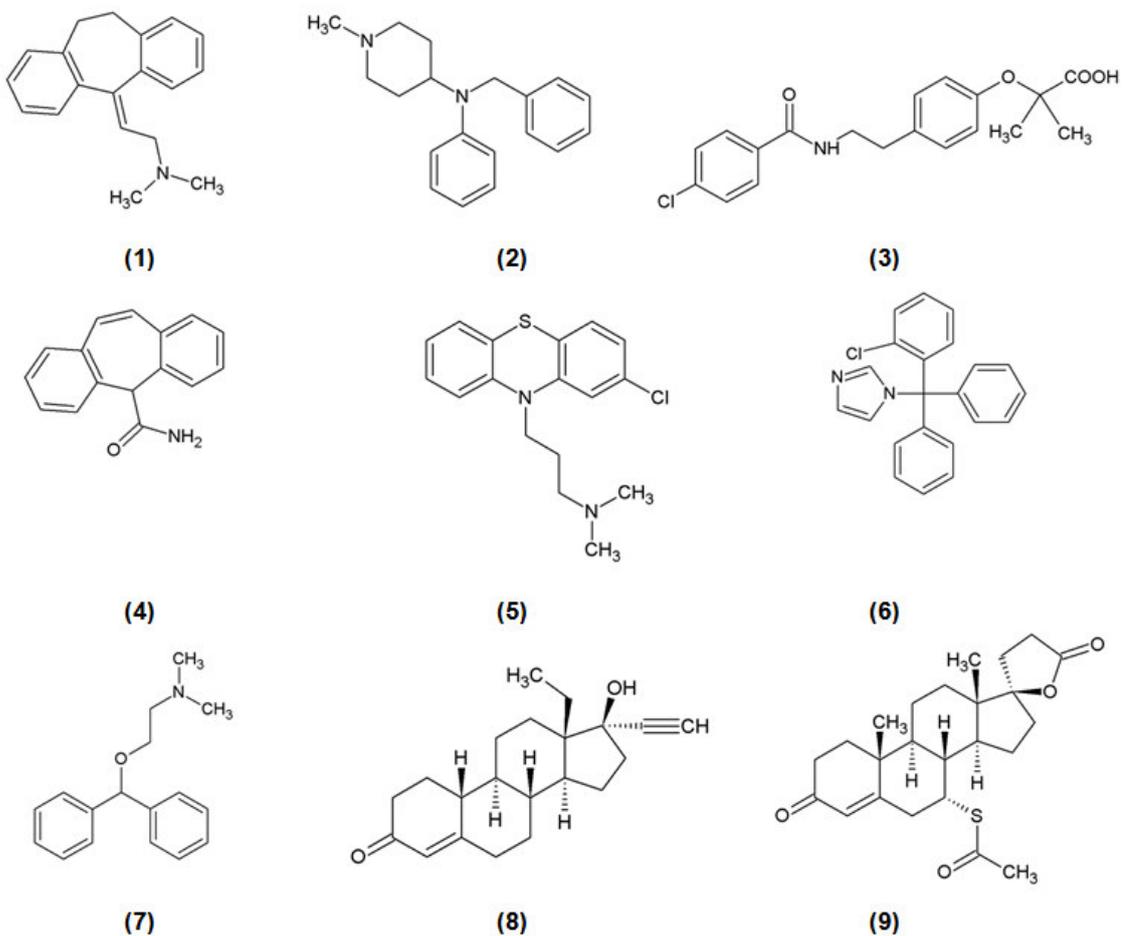


Abb. 14: Kommerzielle Substanzen, die auf ihre Eignung als IS für die MH84-Methode untersucht wurden

V.2.2 Strukturell ähnliche Substanzen

Um einen internen Standard zu finden, wurden anschließend die Pirinixinsäureester der hausinternen Substanzbibliothek in Betracht gezogen. Diese wiesen eine deutlich höhere Lipophilie als die entsprechenden Säuren auf. Ein Ester, der sehr ähnliche chromatographische Eigenschaften aufwies war MH40. Die Retentionszeit des Esters lag bei 7,5 min bei einer Retentionszeit von MH84 von 6 min. Dieses Retentionsverhalten entsprach den gewünschten Vorgaben und führte zunächst zur Auswahl der Substanz als interner Standard der MH84-Methode.

Leider konnte MH40 nach der Aufarbeitung von matrixhaltigen Lösungen nicht mehr im UV-Chromatogramm sowie in dessen Massenspur nachgewiesen werden. Scheinbar kam es zu einer Instabilität des Esters oder zu einer Absorption an der verwendeten Aufarbeitungsfestphase. MH40 war somit nicht für die Verwendung der entwickelten Aufarbeitungsmethode (siehe Kap. V.4) geeignet und schied als Möglichkeit für einen internen Standard aus.

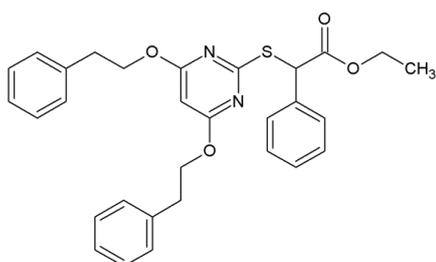
Um die negativen Effekte der Ester zu umgehen, wurden verschiedene inaktive Pirinixinsäurederivate untersucht. Ausschließlich die Substanz MH49, welche zu Beginn der Arbeit selbst als potentieller Kandidat für die Verwendung in Tierversuchen in Betracht gezogen wurde (Kap. II.1), zeigte eine Retentionszeit größer der Retentionszeit von MH84. Aufgrund der positiven *in vitro* Ergebnisse und die eventuelle Eignung für *in vivo* Studien wurde MH49 nicht als interner Standard der MH84-Methode verwendet.

Anschließend wurde nun nach einer Pirinixinsäure gesucht die möglichst nah vor dem MH84 Peak im Chromatogramm erscheint. Ein interner Standard aus der gleichen Substanzklasse sollte sich auch während der Probenaufarbeitung ein ähnliches Verhalten gewährleisten. Folgende Pirinixinsäuren konnten bei der bisherigen Suche Retentionszeiten aufweisen, die etwas kleiner waren als die Retentionszeit von MH84: LP105, MD84 und MH41.

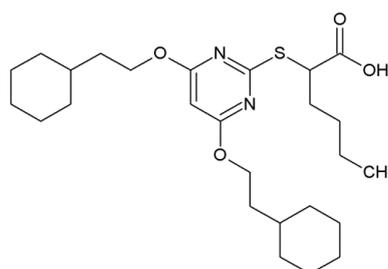
Um zu gewährleisten, dass der Peak des internen Standards von möglichen Matrixsignalen getrennt wird, wurde das Fließmittelgemisch wieder auf 89% Methanol/ 11% Ameisensäure (0,1%) verändert und somit die Retentionszeit von MH84 erneut auf 8,3 min verschoben. Eine Verschiebung zu größeren Retentionszeiten wurde nicht angestrebt um die Empfindlichkeit für MH84 so groß wie möglich zu halten.

LP105 zeigte einen Peak bei 3,5 min im Chromatogramm und eluierte somit noch im Bereich zu erwartender Matrixeinflüsse. Deshalb schied diese Substanz bei der Auswahl als interner Standard aus.

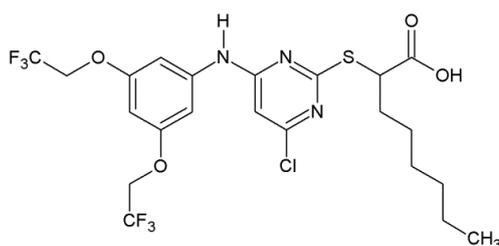
MD84 war nur in kleinen Mengen verfügbar und eluierte bei 5,5 min. Eine möglichst ähnliche chemische Struktur zwischen internem Standard und Analyten gewährleistet auch ein ähnliches Verhalten während der Probenaufarbeitung und eine ähnliche Wiederfindung. Die chemische Struktur von MD84 ist etwas verschieden zu der von MH84. Dadurch ist ein ähnliches Verhalten während der Probenaufarbeitung nicht zwingend gewährleistet. Aus diesem Grund wurde gleichzeitig die Substanz MH41 untersucht. Es handelt sich hierbei um die Säure des zunächst als internen Standard verwendeten MH40 (Ester). Die Retentionszeit lag ebenfalls bei 5,5 min im Vergleich zu den 8,3 min von MH84. Die Substanz war in größerer Menge vorrätig und auch als potentieller Wirkstoffkandidat durch die Charakterisierung in zellulären Testsystemen ausgeschlossen worden. Aufgrund der deutlich höheren chemischen Ähnlichkeit im Vergleich zu MD84 und seinem geeigneten chromatografischen Verhalten wurde diese Substanz als interner Standard für die MH84-Methode ausgewählt.



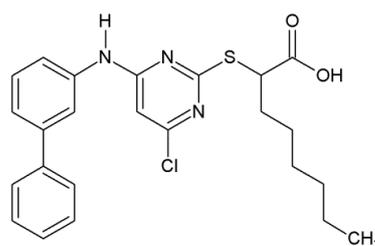
MH40



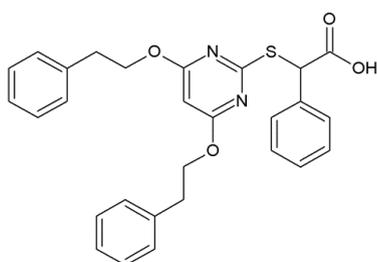
MH49



LP105



MD84



MH41

Abb. 15: Strukturell ähnliche Substanzen für die Testung als IS der MH84-Methode

V.3 APCI- und MS-Parameteroptimierung

Die optimierbaren Parameter der APCI-Ionisierung umfassen die Spannung an der Kapillare, den anliegenden Strom an der Corona-Nadel, den Nebuliser-Gasfluss, den Gasfluss des Trocknungsgases, die Trocknungstemperatur sowie die Verdampfungstemperatur. Bei Verwendung folgender Parameter, konnte eine Empfindlichkeit mit einem LOQ von 4 ng/mL bei einem Injektionsvolumen von 100 µL erreicht werden.

Tab. 3: Ausgangsparameter der APCI für die MH84-Methode

Capillary	4000 V
Corona	4000 nA
Nebuliser	2.0 Bar
Dry Gas	5,0 L/min
Dry Temp.	200°C
Vapor. Temp.	450°C

Um zu überprüfen, ob die deutlich höheren Ströme an der Corona-Nadel im negativ-Modus zu einem Vorteil gegenüber der positiv-Methode führen, wurde bei 10000, 20000, 30000 nA gemessen und mit den Ergebnissen der positiv Messung bei (+)4000 nA (Tab.3) verglichen. Die Empfindlichkeit war ungefähr halb so groß als bei der vergleichenden Messung im positiv-Modus. Deshalb wurde die Methode im positiv-Modus weiter optimiert. Dabei wurde jeweils nur ein Parameter der Ausgangsparameter verändert und am Ende alle besten Einstellungen miteinander kombiniert.

Tab. 4: Optimierung der APCI-Parameter für die MH84 Analytik-Methode

Capillary	3000; 3500; 4000, 4500 ; 5000; 5500; 6000 V
Corona	2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 4500; 5000; 5500; 6000 ; 6500; 7000; 7500; 8000; 8500; 9000; 9500; 10000 nA
Nebuliser	2 ; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8 Bar
Dry Gas	4 ; 5; 6; 7; 8; 9; 10 L/min
Dry Temp.	150; 175; 200; 225 ; 250; 275; 300°C
Vapor. Temp.	250; 275; 300; 325; 350; 375; 400; 425; 450 ; 470°C

Die Kombination aller optimierten Parameter führte zu einer geringeren Intensität im Vergleich zur Ausgangsmethode. Deswegen wurden verschiedene Parameterkombinationen

getestet und zusätzlich die Transfer-Parameter innerhalb des Massenspektrometers untersucht. Diese waren die Einstellung der Ion-Energy am Quadrupol und die Parameter der Kollisionszelle. Deshalb wurden die Parameter der Ion-Energy am Quadrupol, die Collision-Energy und die Collision RF weiter optimiert.

Tab. 5: Optimierte Einstellung des Massenspektrometers für die MH84-Methode

Ion Energy	1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 eV
Collision Energy	6; 6,5; 7; 7,5; 8 ; 8,5; 9; 9,5; 10 eV
Collision RF	300; 350 ; 400; 450; 500; 550; 600 Vpp

Die Methode mit der optimalen Kombination aller Parameter wurde für die Verwendung der Methodvalidierung festgelegt (Tab.6).

Tab. 6: Zusammenfassung der optimierten APCI-MS-Parameter für MH84

Capillary	4500 V
Corona	6000 nA
Nebuliser	2.0 Bar
Dry Gas	5,0 L/min
Dry Temp.	200°C
Vapor. Temp.	400°C
Ion Energy	3,5 eV
Collision Energy	8 eV
Collision RF	350 Vpp

Die Empfindlichkeit der Methode in 50%igem Methanol lag bei einem LOQ von 0,75 ng/mL und einem LOD von 0,22 ng/mL bei Verwendung eines Injektionsvolumens von 100 µL. Leider musste beim Versuch der Methodvalidierung festgestellt werden, dass diese Methode keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte. Mehrere identische Injektionen führten zu bis zu 30%igen Abweichungen der Signale in der Massenspur von MH84. Die parallel gemessenen UV-Signale wiesen keine Abweichung zwischen den Injektionen auf, wodurch Probleme am Injektorsystem ausgeschlossen werden konnten. Es wurde deshalb versucht mit der Veränderung der APCI-Einstellungen konstantere Spray-Bedingungen zu erhalten um reproduzierbare Ionisierungsbedingungen zu schaffen.

Dies wurde durch die Herabsetzung des Trockengas-Flusses von 5 L/min auf 3 L/min und gleichzeitiger Erhöhung der Trocknungstemperatur von 200°C auf 350°C realisiert.

Tab. 7: Endgültige APCI-MS-Bedingungen zur Durchführung der Methodvalidierung und zur Auswertung der präklinischen Tierstudien von MH84

Capillary	4500 V
Corona	6000 nA
Nebuliser	2.0 Bar
Dry Gas	3,0 L/min
Dry Temp.	350°C
Vapor. Temp.	400°C
Ion Energy	3,5 eV
Collision Energy	8 eV
Collision RF	350 Vpp

Die Empfindlichkeit nach Veränderung der Spray-Bedingungen lag im Bereich der vorher optimierten APCI-Methode. Der LOQ lag bei 0,90 ng/mL und der LOD bei 0,27 ng/mL, wenn ein Injektionsvolumen von 100 µL verwendet wurde. Die APCI-Bedingungen wurden ausschließlich für die Empfindlichkeit von MH84 optimiert. Der interne Standard MH41 zeigte bei diesen Parametern ein deutlich schlechteres Empfindlichkeitsprofil (siehe Abb.16).

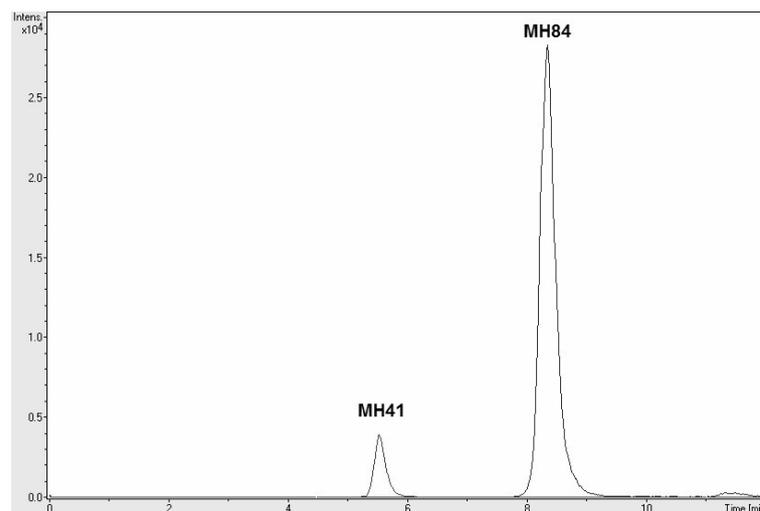


Abb. 16: Empfindlichkeitsvorteil für MH84 im Vergleich zu MH41 (IS), beide Substanzen mit gleicher Konzentration $c = 100 \text{ ng/mL}$ in aufgearbeiteter Hirnmatrix (Injektionsvolumen: 100 µL)

Die Empfindlichkeit und Nachweisgrenzen bezogen auf die verschiedenen Matrices werden im Kap. V.5.1, Tab.8 der Methodvalidierung besprochen.

V.4 Probenaufarbeitung aus biologischen Matrices

V.4.1 Hirnproben

Aufgrund des Mangels an entsprechenden Mengen an Mäusehirn von unbehandelten Tieren für die analytische Methodvalidierung und die Erstellung der verwendeten Kalibriergeraden, wurden 188,9 g Schweinehirn, die von einem regionalen Metzger bezogen wurden, im Verhältnis 1:10 mit TRIS-Puffer (5 mM, pH = 7,4) versetzt und für 3 Minuten bei 10000 rpm mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das erhaltene Hirnhomogenat wurde in Portionen zu jeweils 50 mL bei -20°C eingefroren. Die Äquivalenz zwischen den verwendeten Tierspezies wurde in einem Crossvalidierungs-Schritt als Bestandteil der Methodvalidierung (Kap. V.5.4) untersucht.

In vielen Untersuchungen zur Probenaufarbeitung aus biologischen Matrices wird die Proteinfällung mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln und Zugabe von Säure vorgenommen. Im Vorfeld der Anwendung einer solchen Methode bestand die Vermutung, dass eine Zugabe von Säure zu einer Protonierung des Pyrimidinringes von MH84 führen könnte und sich das chromatographische Verhalten der Substanz dadurch ändern könnte. Dennoch wurde von einer solchen Vorschrift zur Proteinfällung ausgegangen.

Es wurden 400 µL Hirnhomogenat mit 100 µL HCl_{conc}, 100 µL einer MH84 haltigen Lösung (in 50%igem Methanol) sowie 100 µL einer Lösung des internen Standards (c = 1 µg/mL in 50%igem Methanol) und 300 µL Methanol in einem spitzkonischen Glasvial gemischt. Die so erhaltene Mischung wurde für 10 min bei 5300 rpm in der Laborfuge zentrifugiert. Von diesem Gesamtvolumen (1 mL) wurden 850 µL des Überstandes auf ein Extrelut® Festphasen-Röhrchen gegeben. Nach 15 min erfolgte die Flüssig-Flüssig-Extraktion an der Festphase mit ca. 7 mL tert.-Butylmethylether. Das Eluat wurde in einem Heizblock bei 40°C im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und schließlich in 500 µL 50%igem Methanol gelöst. Dazu wurde der Rückstand zunächst gevortext und anschließend für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die so erhaltene Lösung wurde durch einen 45 µm Spritzenfilter gefiltert und in einem für die LC-MS-Anlage geeigneten Vial mit Einsatz aufgefangen, aus dem die Injektion in die Anlage erfolgte. Leider bestätigte sich die Vermutung der Protonierung des Pyrimidinringes und es kam zu einer kompletten Veränderung des Retentionsverhaltens des Analyten. Durch die Anwendung der entwickelten HPLC-Methode konnte keine vergleichbare Retention von MH84 an der Umkehrphase ermöglicht werden. MH84 wurde ohne Wechselwirkung mit dem Injektionspeak eluiert. Diese Veränderung des

chromatographischen Verhaltens konnte auf der Normalphase bestätigt werden, da dort die protonierte Form des Analyten im Vergleich zur unprotonierten Form nicht durch das für MH84 geeignete Laufmittel (Hex/EE 3:1) von der Startlinie verdrängt werden konnte. Zur Erhaltung des ursprünglichen Retentionsverhaltens wurden geringere HCl-Konzentrationen, schwächere Säuren wie Essigsäure und ein nachträglicher Neutralisationsschritt untersucht. Keine der Veränderungen konnte das Retentionsverhalten wiederherstellen oder ermöglichen. Der Versuch auf die Verwendung der Säure ganz zu verzichten und die Proteine ausschließlich durch einen höheren Methanol-Anteil (400 μ L Hirnhomogenat und 3600 μ L Methanol) auszufällen ist aufgrund unvollständiger Proteinfällung, welche durch eine getrübe Lösung nach der Probenaufarbeitung und nach dem Filtrationsschritt auffiel, gescheitert. Auch das zusätzliche Anwenden von längeren Einwirkzeiten für das Methanol und eine zusätzliche Wärmebehandlung bei 80°C für 2 h im Heizblock konnte keine vollständige Proteinfällung hervorrufen. Desweiteren wurden verschiedene andere Elutionsmittel für die Flüssig-Flüssig-Extraktion ausprobiert. Ein Umstieg auf Diethylether führte dabei zu einer leichten Verbesserung der Trübung während eine Mischung aus THF/n-Hexan/EtAc/Isopropanol (16/16/16/1,5) aus einem anderen Protokoll zur Hirnmatrix-Aufarbeitung [163] keinen Vorteil für die Aufarbeitung ergab. Die Proteinfällung mit anderen Lösungsmitteln, wie THF, ACN und Aceton wurde ebenfalls untersucht. Dabei wurden jeweils 400 μ L Hirnhomogenat mit 100 μ L H₂O, um einen wässrigen Anteil von 50% im Gesamtvolumen zu erhalten und 500 μ L der drei alternativen Lösungsmittel versetzt. THF führte zu stark getrüben Lösungen nach der Probenaufarbeitung aufgrund einer unzureichenden Proteinfällung. Sowohl die Verwendung von ACN als auch Aceton resultierte unter den gleichen experimentellen Bedingungen in sehr klaren Lösungen, während die Verwendung von Aceton jedoch bessere Reproduzierbarkeiten der Wiederfindung von MH84 zeigte und schließlich für die Methode der Hirnaufarbeitung verwendet wurde.

Die endgültige Zusammensetzung der Hirnhomogenat-Lösungsmittel-Mischungen für die Erstellung der Kalibriergeraden beinhaltete:

400 μ L Hirnhomogenat + 100 μ L MH84 Lösung (in MeOH/H₂O (50%)) + 100 μ L IS-Lösung (c = 1 μ g/mL in MeOH/H₂O (50%)) + 400 μ L Aceton zur Proteinfällung

Bei der Aufarbeitung der Proben aus den Tierstudien wurden ebenfalls 400 μ L des Hirnhomogenates mit 100 μ L 50%igem Methanol anstelle der MH84-haltigen Lösung

versetzt. Die Blankproben ohne IS enthielten, durch Ersatz des IS-Anteils, 200 μL 50%iges Methanol.

Die Aufarbeitung dieser Hirnhomogenat-Lösungsmittel-Mischung wurde wie oben beschrieben mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion an der Festphase (Extrelut[®]) durchgeführt. Eine Übersicht zur Probenaufarbeitung ist in Abb.17 dargestellt.

Bei den nachfolgenden Versuchen zur Bestimmung der Wiederfindung kam es zu dem Phänomen, dass nach der Aufarbeitung eine höhere Konzentration an MH84 gefunden wurde als theoretisch bei 100%iger verlustfreier Aufarbeitung möglich wäre. Es wurden teilweise Wiederfindungen von 130-140% bestimmt. Als Ursache konnte der Zentrifugationsschritt vor der Flüssig-Flüssig-Extraktion ausfindig gemacht werden. Die eingestellten Drehzahlen an der Laborzentrifuge führten dazu, dass der Wirkstoff sich aufgrund der hohen Molekularmasse im Zusammenspiel mit dem ausgefallenen Protein durch die Zentrifugalkraft direkt oberhalb der Oberfläche des Pellets aufkonzentriert. Bei der Abnahme von 850 μL des Gesamtvolumens von 1 mL des Überstandes kam es zu einer Überschreitung der Wiederfindung über das theoretisch mögliche Ergebnis von 100%. Zur Behebung des Problems wurde die Drehzahl auf 3000 rpm gesenkt. Dies entsprach einer Zentrifugalkraft von 900 $\times g$ und führte zu deutlich besser reproduzierbaren und theoretisch möglichen Ergebnissen. Diese Zentrifugalkraft wurde ebenfalls bei der späteren Gewinnung des Plasmas aus den Tierstudien angewendet.

V.4.2 Plasmaproben

Ausgehend von dem neu entwickelten Aufarbeitungsprotokoll für die Hirnproben wurde eine ähnliche Methode für die Aufarbeitung von Plasmaproben entwickelt.

Ausgehend vom geringen Plasmavolumen, welches bei Tierstudien an Mäusen zu erwarten ist wurde ein verwendetes Plasmavolumen von 30 μL für die Probenaufarbeitung festgelegt.

Dieses Volumen erlaubt eine eventuell notwendige Doppelbestimmung aus den Tierproben. Da der wässrige Anteil in Form des Homogenates bei der Hirnaufarbeitung bei 400 μL lag, wurden 370 μL H_2O zu den 30 μL Plasma hinzugegeben. Wie oben beschrieben erfolgte die Zugabe von MH84 und dem IS bei den Kalibriergeraden durch jeweils 100 μL einer Lösung in 50%igem Methanol. Für die Proteinfällung wurden ebenfalls 400 μL Aceton verwendet.

Die endgültige Zusammensetzung der Plasma-Lösungsmittel-Mischung für die Erstellung der Kalibriergeraden beinhaltete:

30 μL Plasma + 370 μL H_2O + 100 μL MH84 Lösung (in MeOH/ H_2O (50%)) + 100 μL IS-Lösung ($c = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ in MeOH/ H_2O (50%)) + 400 μL Aceton zur Proteinfällung

Bei der Vermessung der Proben aus den Tierstudien wurde der Anteil der MH84-haltigen Lösung durch 100 μL 50%iges Methanol ersetzt. Bei den Blankproben wurden 200 μL 50%iges Methanol verwendet um den MH84- und IS-Anteil auszugleichen.

Aufgrund des geringen Plasmavolumens bezogen auf das Gesamtvolumen der Plasma-Lösungsmittel-Mischung, ergab sich nur eine geringe Trübung vor Filtration der Lösung. Dadurch konnte auf einen Zentrifugationsschritt im Anschluss an die Proteinfällung verzichtet werden. Es wurden 850 μL der Mischung direkt auf die Extrelut[®]-Säulen für die Flüssig-Flüssig-Extraktion gegeben. Nach 15 min wurden ca. 7 mL tert.-Butylmethylether auf die Säulen gegeben. Die aufgefangene Ether-Lösung wurde im Heizblock bei 40°C im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und anschließend in 500 μL 50%igem Methanol gelöst. Dabei wurde der Rückstand zunächst gevortext und anschließend für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach der Filtration durch einen 45 μm Spritzenfilter, wurde die Lösung in einem für die LC-MS-Anlage geeigneten Vial mit Einsatz aufgefangen, aus dem die Injektion in die LC/MS-Anlage erfolgte.

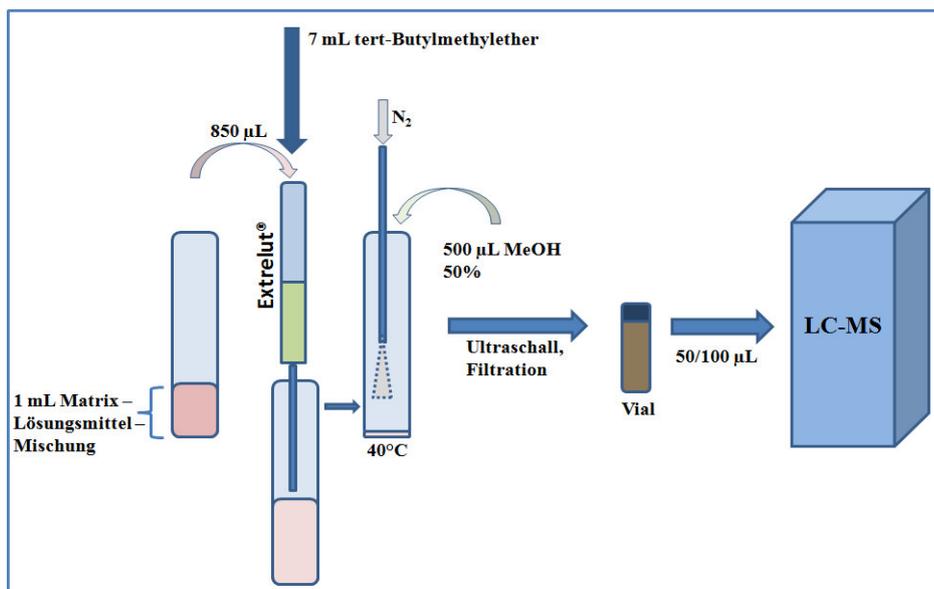


Abb. 17: Ablaufschema der Probenaufarbeitung von MH84 aus Plasma und Hirnhomogenat

V.5 Methodvalidierung von MH84

Die Validierung wurde nach der Guideline „Bioanalytical method validation, revision 1“ (September 2013) der FDA durchgeführt[5].

Diese Vorschrift beinhaltet sowohl grundlegende Forderungen an die analytisch untersuchte Substanz bezüglich ihrer Stabilität bei Zimmertemperatur, nach Einfriervorgängen und der Langzeitstabilität von Stammlösungen und in biologischen Proben, sowie an die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der der analytischen Methode. Durch eine Erfüllung dieser Forderungen, innerhalb eines geeigneten zeitlich relevanten analytischen Zeitraums, qualifiziert sich die Methode zur Analyse von biologischen Proben.

V.5.1 Selektivität, Linearität und Nachweisgrenzen von MH84 in den Matrices

Der Vorteil bei der Verwendung einer massenspektrometrischen Detektion für die entwickelte LC-Methode ist die resultierende Selektivität, die sich durch die Aufzeichnung und Auswertung der spezifischen Massenspur ergibt. In entsprechenden Blank-Proben des Plasmas und des Hirnhomogenates ohne MH84 und IS konnten keinerlei störende Signale auf diesen Massenspuren nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die aufgezeichneten Chromatogramme ausschließlich Veränderungen des Signals des Analyten und des IS darstellen.

Für MH84 und MH41 (IS) wurden die Massenspuren der Molekülmassen verwendet. Durch den angewendeten positiv-Modus der APCI-Quelle ergaben sich die Massenspuren für MH84 mit $m/z = 603,2$ und für MH41 $m/z = 439,2$. Die Verwendung dieser Massenspuren stellt die Selektivität der LC-MS-Methode für MH84 und seinen internen Standard MH41 sicher.

Das geforderte Kriterium einer möglichst einfachen mathematischen Korrelation zwischen Analysensignal und Konzentration, konnte zunächst während der Methodenentwicklung nicht realisiert werden. Anstelle von linearen Abhängigkeiten, zeigten sich quadratische Verhältnisse bei der Erstellung der Kalibrierfunktionen (Abb. 18).

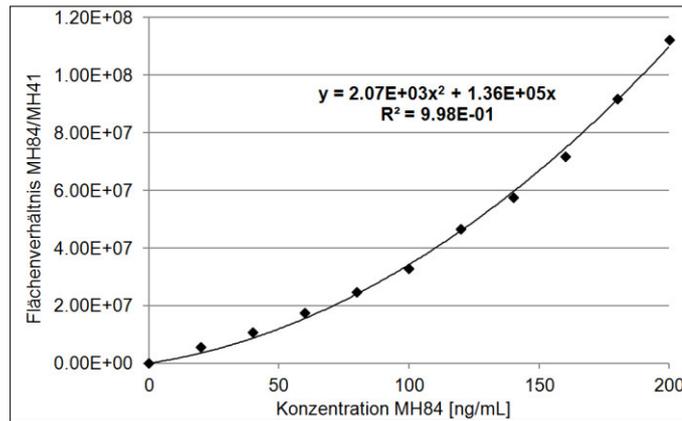


Abb. 18: Quadratische Kalibrierfunktion zu Beginn der Methodenentwicklung für MH84

Dieses Verhalten könnte durch eine eventuelle Verstärkung der Ionenbildung (Ion-Enhancement) bei der MS-Detektion mit zunehmender Konzentration erklärt werden. Warum es zu diesem Verhalten bei der verwendeten Anlage kam, konnte nicht geklärt werden. Durch mehrfaches Reinigen der Ionenquelle, des Hexapols und der Funnels sowie der Reinigung des Quadrupols und der Umstellung auf die stabileren Spray-Bedingungen (Kap. V.3) konnte eine leichte Verbesserung festgestellt werden. Diese Verbesserung konnte aber nur genutzt werden wenn einzelne Kalibrierpunkte für die Erstellung der Kalibriergerade ausgeschlossen wurden (hier z.B. 75, 125, 150 und 175 ng/mL, Abb.19) um einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 > 0,9$ zu erhalten.

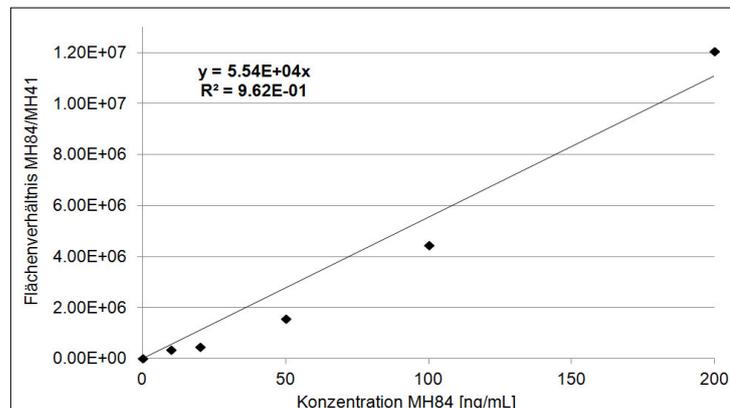


Abb. 19: Leichte Verbesserung der Linearität der Kalibrierfunktion von MH84

Um die Proben aus den Tierversuchen und die Qualitätskontroll-Proben (QCs) bei der Methodvalidierung einwandfrei quantifizieren zu können, muss der Korrelationsquotient jedoch höher sein ($R^2 > 0,99$) und der gesamte Kalibrierbereich abgedeckt sein, da sonst die maximal erlaubte Schwankung der FDA von 15% leicht überschritten werden kann. Aus diesem Grund wurde der Messbereich zwischen 2 und 250 ng/mL in zwei Kalibriergeraden

aufgeteilt um Korrelationsquotienten von jeweils > 0,99 zu erreichen. Die daraus resultierenden linearen Bereiche lagen zwischen 2 und 25 ng/mL und zwischen 20 und 250 ng/mL.

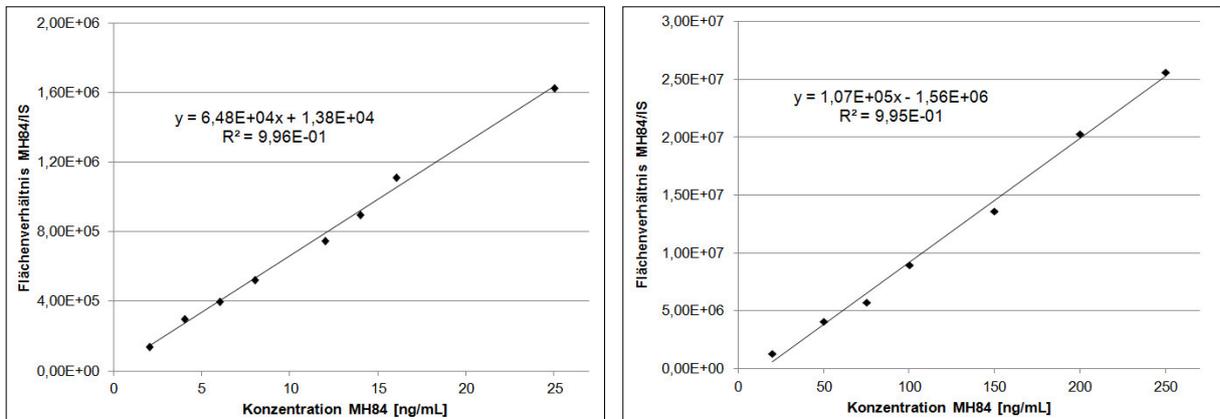


Abb. 20: Optimierte Kalibriergeraden aus der entsprechenden Matrix; links: 2 – 25 ng/mL im Hirnhomogenat, rechts: 20 – 250 ng/mL im Plasma

Kleine Konzentrationen der QCs und in Tierproben wurden somit mit einer anderen Kalibriergerade ausgewertet als hohe Konzentrationen. Die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit (Kap. V.5.3) zeigt die Konformität dieses Vorgehens bezüglich der realisierten Validierungsergebnisse.

Die Auswertung des QCs mit der Konzentration von 5 ng/mL aus Hirnhomogenat, sowie der Kalibrierpunkte zwischen 2 und 10 ng/mL wurde zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für die jeweilige Matrix verwendet. Dazu wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der nach dem „Glätten“ (Smoothing) durch das Programm QuantAnalysis® erhaltenen, Chromatogramme der MH84-Massenspuren bestimmt. Der LOQ beschreibt dabei das 10-fache Verhältnis zwischen Signal zu Rauschen, während der LOD als dreifaches Signal-zu-Rausch-Verhältnis definiert wird. Nach der Bestimmung der Einzelwerte wurden diese auf die Konzentration pro Milliliter Plasma bzw. pro Gramm Hirngewebe umgerechnet.

Tab. 8: Nachweisgrenzen für MH84 aus Plasma und Hirnhomogenat; links: LOQ, rechts: LOD; abs. = absolut in der Messlösung enthaltene Menge nach der Aufarbeitung, Hochrechnung pro mL Plasma und g Hirn

	LOQ abs. [ng/mL]	LOQ [ng/mL Plasma] oder [ng/g Hirn]	LOD abs. [ng/mL]	LOD [ng/mL Plasma] oder [ng/g Hirn]
Plasma	1,44	48,00	0,43	14,33
Hirn	0,76	20,90	0,23	6,33

V.5.2 Stabilität

V.5.2.1 Stabilität von MH84 bei Raumtemperatur (25°C)

Zunächst wurde im Rahmen der Methodvalidierung die Stabilität von MH84 in 50%igem Methanol untersucht. In diesem Lösungsmittel werden die Proben nach der Aufarbeitung der entsprechenden Matrix aufgenommen, sodass die Stabilität in diesem Medium von erheblicher Bedeutung ist. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils 50 µL aus je 2 Vials pro Konzentration in die LC-MS injiziert.

Tab. 9: Stabilität von MH84 in 50%igem Methanol (c = 5, 100, 200 ng/mL) nach 24 und 48 h

5 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
t = 0	4,90	98,02	t = 0	96,77	96,77	t = 0	197,40	98,70
t = 0	5,06	101,15	t = 0	97,65	97,65	t = 0	199,49	99,75
t= 24 h	5,09	101,85	t= 24 h	92,57	92,57	t= 24 h	197,79	98,90
t= 24 h	4,32	86,49	t= 24 h	95,16	95,16	t= 24 h	196,80	98,40
t= 48 h	5,73	114,52	t= 48 h	95,17	95,17	t= 48 h	195,30	97,65
t= 48 h	4,71	94,21	t= 48 h	97,46	97,46	t= 48 h	200,12	100,06
MW [ng/mL]	4,97		MW [ng/mL]	95,80		MW [ng/mL]	197,82	
SD [ng/mL]	0,47		SD [ng/mL]	1,92		SD [ng/mL]	1,77	
RSD [%]	9,37		RSD [%]	2,00		RSD [%]	0,89	

Es konnte keine Instabilität der drei Konzentrationen in 50%igem Methanol festgestellt werden. Die kurzfristige Stabilität von MH84 in 50%igem Methanol konnte somit bestätigt werden.

Zusätzlich wurde die Stabilität der MH84 Stammlösung in DMSO (c = 250 µg/mL), die nach dem Einwiegen der Substanz hergestellt wurde, bei Raumtemperatur untersucht. Da bei der Methodenentwicklung bislang keinerlei Instabilitäten auffällig waren, wurde zunächst ein Zeitraum von einem Monat zur Stabilitätsbestimmung ausgewählt. Diese Untersuchung dient dazu eventuelle Konzentrationsabweichungen nach längerer Verwendung der Stammlösung ausschließen zu können.

Diese Untersuchung wurde mit einem Injektionsvolumen von 50 µL durchgeführt. Als kleinste Konzentration diente 20 ng/mL.

Nach einem Monat konnten bei der Herstellung der festgelegten QCs (20, 100 und 200 ng/mL) Ergebnisse zwischen 97,15 und 108,22 % der gewünschten Konzentration erhalten werden. Dies liegt im Schwankungsbereich der analytischen Methode (Kap. V.5.3).

Aufgrund der bestätigten Stabilität einen Monat nach Herstellung der Stammlösung wurde auf Untersuchungen zu kleineren Zeiträumen verzichtet und die Untersuchung stattdessen analog mit einer zwei Monate alten Stammlösung wiederholt. Die bestimmten Gehalte der QCs lagen dabei zwischen 93,89 und 106,02%. Die Stabilität dieser Stammlösung konnte somit auch nach zwei Monaten bestätigt werden.

Tab. 10: Stabilität der DMSO-Stammlösungen von MH84 (c = 250 µg/mL) für 1 und 2 Monate

<i>1 Monat</i>								
20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	21,64	108,22	1	97,15	97,15	1	209,22	104,61
2	21,55	107,76	2	100,21	100,21	2	208,74	104,37
3	19,85	99,26	3	104,93	104,93	3	205,12	102,56
MW [ng/mL]	21,02		MW [ng/mL]	100,76		MW [ng/mL]	207,69	
SD [ng/mL]	1,01		SD [ng/mL]	3,92		SD [ng/mL]	2,24	
RSD [%]	4,80		RSD [%]	3,89		RSD [%]	1,08	
<i>2 Monate</i>								
20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	20,36	101,79	1	95,56	95,56	1	197,85	98,92
2	21,20	106,02	2	93,89	93,89	2	204,67	102,34
3	19,05	95,27	3	98,78	98,78	3	202,57	101,28
MW [ng/mL]	20,21		MW [ng/mL]	96,08		MW [ng/mL]	201,69	
SD [ng/mL]	1,08		SD [ng/mL]	2,48		SD [ng/mL]	3,50	
RSD [%]	5,42		RSD [%]	2,58		RSD [%]	1,73	

V.5.2.2 Stabilität der aufgearbeiteten Matrix-QCs im Autosampler

Um eine verlässliche Quantifizierung aufgearbeiteter Plasma- und Hirnproben zu gewährleisten, war es nötig die Stabilität dieser Proben über einem Zeitraum von 48 h nach der Aufarbeitung zu untersuchen. Innerhalb dieses Zeitraums sollte es möglich sein spätere Proben aus Tierstudien zu messen ohne in zeitliche Bedrängnis zu kommen. Es wurden wiederum 3 Proben pro QC im Plasma und Hirngewebe durch Spiken der Wirkstofflösung zu Leermatrix hergestellt (Kap. V.4) und ihre Konzentration direkt nach der Aufarbeitung und nach 48 h bestimmt. Diese Bestimmung der Startkonzentration wurde zu Beginn der Methodvalidierung durchgeführt um mögliche Fehlerquellen bei der Probenaufarbeitung zu erkennen. Bei der Untersuchung der Langzeitstabilität (Kap. V.5.2.3) und den Proben nach mehreren Einfrierzyklen (Kap. V.5.2.4) wurde darauf verzichtet, da sich die Aufarbeitungsmethoden der Matrixproben als zuverlässig bewährt haben. Die Stabilität der aufgearbeiteten Plasmaproben wurde für jeweils drei Wiederholungen bei den Konzentrationen 20 ng/mL, 100 ng/mL und 200 ng/mL durchgeführt. Die Stabilität der Einzelproben lag zwischen 92,11 und 106,15% und entsprach der Schwankungsbreite der bislang durchgeführten Bestimmungen ohne Matrix-Verwendung.

Tab. 11: Stabilität der QCs nach Aufarbeitung von MH84 aus Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)

20 ng/mL	Konz. [ng/mL] t = 0	Konz. [ng/mL] t = 48 h	% nach 48 h	Stabilität [%]
1	17,99	16,57	92,11	
2	20,42	19,39	94,96	
3	17,91	18,54	103,52	
MW [ng/mL]	18,77	18,17		96,77
SD [ng/mL]	1,43	1,45		
RSD [%]	7,60	7,96		
100 ng/mL				
100 ng/mL	Konz. [ng/mL] t = 0	Konz. [ng/mL] t = 48 h	% nach 48 h	Stabilität [%]
1	104,93	101,68	96,90	
2	98,65	98,59	99,94	
3	101,12	94,55	93,50	
MW [ng/mL]	101,57	98,27		96,76
SD [ng/mL]	3,16	3,58		
RSD [%]	3,11	3,64		
200 ng/mL				
200 ng/mL	Konz. [ng/mL] t = 0	Konz. [ng/mL] t = 48 h	% nach 48 h	Stabilität [%]
1	180,67	191,79	106,15	
2	189,39	182,32	96,27	
3	216,84	214,14	98,75	
MW [ng/mL]	195,63	196,08		100,23
SD [ng/mL]	18,88	16,34		
RSD [%]	9,65	8,33		

Für die aufgearbeiteten Hirnproben wurden ebenfalls jeweils drei QCs der Konzentrationen 5 ng/mL, 20 ng/mL und 100 ng/mL hergestellt und die Konzentrationen nach 48 h Stunden mit den Startkonzentrationen verglichen.

Die erhaltenen Gehalte der Einzelbestimmungen lagen zwischen 95,39 und 106,28% von der zuvor gemessenen Startkonzentration.

Es konnten weder bei den Plasma- oder Hirnproben-QCs Instabilitäten 48h nach der Aufarbeitung bestimmt werden, die die Schwankungsbreite der Analysenmethode überschreiten.

Tab. 12: Stabilität der QCs nach Aufarbeitung von MH84 aus Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)

5 ng/mL	Konz. [ng/mL] t = 0	Konz. [ng/mL] t = 48 h	% nach 48 h	Stabilität [%]
1	5,14	5,23	101,87	
2	5,30	5,27	99,42	
3	5,06	4,88	96,16	
MW [ng/mL]	5,17	5,13		99,23
SD [ng/mL]	0,12	0,21		
RSD [%]	2,32	4,18		
20 ng/mL				
20 ng/mL	Konz. [ng/mL] t = 0	Konz. [ng/mL] t = 48 h	% nach 48 h	Stabilität [%]
1	18,80	19,95	106,28	
2	21,14	20,75	98,12	
3	21,97	20,98	95,39	
MW [ng/mL]	20,64	20,56		99,63
SD [ng/mL]	1,65	0,54		
RSD [%]	7,98	2,62		
100 ng/mL				
100 ng/mL	Konz. [ng/mL] t = 0	Konz. [ng/mL] t = 48 h	% nach 48 h	Stabilität [%]
1	104,48	101,34	97,22	
2	106,42	108,71	102,00	
3	111,98	110,36	98,65	
MW [ng/mL]	107,62	106,81		99,24
SD [ng/mL]	3,89	4,80		
RSD [%]	3,62	4,50		

V.5.2.3 Langzeitstabilität der Matrix-QCs

Um den Zeitraum zwischen Probennahme und Probenanalyse bezüglich der Stabilität von MH84 zu überprüfen, wurde im Rahmen der Methodvalidierung entsprechend der Forderungen der Guideline der FDA die Langzeitstabilität eingefrorener QC-Proben untersucht. Dazu wurde eine größere Menge an Leermatrix mit der für die jeweilige Konzentration benötigten Menge an MH84 in einem möglichst kleinen Volumen in DMSO

versetzt. Auf einen Zusatz Methanol-haltiger Aliquots wurde verzichtet, um eine dadurch verursachte, eventuelle Proteinfällung zu vermeiden und eine reale Probe hinreichend nachzuempfinden. Die so erhaltenen Matrix-Wirkstoffmischungen wurden für 3 Monate bei -20°C eingefroren und einmalig zur Analyse aufgetaut. Pro Konzentration wurden 3 Proben unter Berücksichtigung des DMSO-Anteils aufgearbeitet und analysiert.

Die Stabilität bezüglich aller QCs der Plasmalösungen betrug zwischen 94,84 und 104,39% und entsprach der Genauigkeit der Methode mit und ohne Matrix-Verwendung aus frischen Lösungen.

Tab. 13: Ergebnisse der Langzeitstabilität für MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)

20 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Monate	% von c_{soll}	Stabilität [%]
1	20,16	100,82	
2	20,20	100,99	
3	20,56	102,81	
MW [ng/mL]	20,31		101,54
SD [ng/mL]	0,22		
RSD [%]	1,09		
100 ng/mL			
100 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Monate	% von c_{soll}	Stabilität [%]
1	102,80	102,80	
2	95,79	95,79	
3	104,39	104,39	
MW [ng/mL]	100,99		100,99
SD [ng/mL]	4,57		
RSD [%]	4,53		
200 ng/mL			
200 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Monate	% von c_{soll}	Stabilität [%]
1	207,71	103,86	
2	204,85	102,43	
3	189,67	94,84	
MW [ng/mL]	200,75		100,37
SD [ng/mL]	9,70		
RSD [%]	4,83		

Bei den Hirn-QCs lagen die Ergebnisse zwischen 94,58 und 105,88%. Eine etwas größere Abweichung bei QC 2 mit c = 20 ng/mL mit 87,08% lag dennoch im Rahmen der Forderung der Validierungsvorschrift. Somit konnte die Langzeitstabilität für MH84 auch in Hirngewebsproben bestätigt werden.

Tab. 14: Ergebnisse der Langzeitstabilität für MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)

5 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Monate	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	4,99	99,75	
2	4,73	94,58	
3	4,83	96,61	
MW [ng/mL]	4,85		96,98
SD [ng/mL]	0,13		
RSD [%]	2,69		
20 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Monate	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	20,92	104,60	
2	17,42	87,08	
3	21,18	105,88	
MW [ng/mL]	19,84		99,19
SD [ng/mL]	2,10		
RSD [%]	10,59		
100 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Monate	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	99,00	99,00	
2	105,46	105,46	
3	100,03	100,03	
MW [ng/mL]	101,50		101,50
SD [ng/mL]	3,47		
RSD [%]	3,42		

V.5.2.4 Auftaustabilität der Matrix-QCs

Laut FDA Guideline ist es zusätzlich notwendig einen Analyten daraufhin zu überprüfen, ob er sich auch nach mehrfachen Einfrieren und Auftauen in den untersuchten Matrices stabil verhält. Diese Untersuchung gewährleistet eine eventuell notwendige, einwandfreie Mehrfach-Quantifizierung der bioanalytischen Proben, für die gezwungener Maßen mehrere Auftauprozesse notwendig sind.

Den entsprechenden Leer-Matrices wurden wie bei der Bestimmung der Langzeitstabilität geringe Mengen an DMSO-Lösungen zugesetzt, die MH84 in der gewünschten Menge enthielten und die so erhaltenen Matrix-Wirkstofflösungen bei -20°C eingefroren.

Anschließend wurden diese Lösungen weitere zweimal eingefroren um sie nach dem dritten Auftauvorgang zu analysieren. Dazu wurden wiederum 3 Wiederholungen pro QC aufgearbeitet.

Für die analysierten Plasma-QCs ergaben sich Einzelgehalte zwischen 89,17 und 111,27%. Diese Abweichungen lagen im Rahmen der von der FDA geforderten Ergebnisse (max. 15% Abweichung) und zeigten keine Instabilität bei allen drei untersuchten QC-Konzentrationen.

Tab. 15: Ergebnisse der Auftaustabilität von MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)

20 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Zyklen	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	18,65	93,25	
2	20,31	101,53	
3	22,25	111,27	
MW [ng/mL]	20,40		102,02
SD [ng/mL]	1,80		
RSD [%]	8,84		
100 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Zyklen	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	98,24	98,24	
2	95,43	95,43	
3	90,74	90,74	
MW [ng/mL]	94,80		94,80
SD [ng/mL]	3,79		
RSD [%]	4,00		
200 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Zyklen	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	178,35	89,17	
2	211,71	105,86	
3	207,66	103,83	
MW [ng/mL]	199,24		99,62
SD [ng/mL]	18,21		
RSD [%]	9,14		

Für die QC-Proben der Hirnmatrix konnten Einzelwerte zwischen 90,00 und 107,02% der gewünschten Konzentration bestimmt werden. Somit lag auch bei dieser Untersuchung kein Hinweis für eine Instabilität bezüglich der Einfrier-Auftau-Zyklen vor.

Tab. 16: Ergebnisse der Auftaustabilität von MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)

5 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Zyklen	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	4,98	99,70	
2	4,82	96,37	
3	4,94	98,80	
MW [ng/mL]	4,91		98,29
SD [ng/mL]	0,09		
RSD [%]	1,75		
20 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Zyklen	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	19,18	95,88	
2	19,43	97,14	
3	18,00	90,00	
MW [ng/mL]	18,87		94,34
SD [ng/mL]	0,76		
RSD [%]	4,04		
100 ng/mL	Konz. [ng/mL] 3 Zyklen	% von c _{soll}	Stabilität [%]
1	106,25	106,25	
2	107,02	107,02	
3	95,85	95,85	
MW [ng/mL]	103,04		103,04
SD [ng/mL]	6,24		
RSD [%]	6,05		

V.5.2.5 Übersicht über alle Stabilitätsprüfungen

Tab. 17: Übersicht der Untersuchungen zur Stabilität von MH84

DMSO Stammlsg. (2 Monate, RT, c=250 µg/mL)	gespikte MH84 Konz. [ng/mL] (n=3)	gemessene MH84 Konz. [ng/mL]	Stabilität [%]					
niedriger QC	20	20,21±1,08	101,03					
mittlerer QC	100	96,08±2,48	96,08					
hoher QC	200	201,69±3,50	100,85					
Aufgearbeitete Matrix (48h, Autosampler)	Plasma (n=3)			Hirnhomogenat (n=3)				
	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	MH84 Konz. t=0 [ng/mL]	MH84 Konz. t= 48h [ng/mL]	Stabilität [%]	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	MH84 Konz. t=0 [ng/mL]	MH84 Konz. t= 48h [ng/mL]	Stabilität [%]
niedriger QC	20	18,77±1,43	18,17±1,45	96,77	5	5,17±0,12	5,13±0,21	99,23
mittlerer QC	100	101,57±3,16	98,27±3,58	96,76	20	20,64±1,65	20,56±0,54	99,63
hoher QC	200	196,63±18,88	196,08±16,34	100,23	100	107,62±3,89	106,81±4,80	99,24
Auftaustabilität (3 Zyklen)	Plasma (n=3)			Hirnhomogenat (n=3)				
	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	MH84 Konz. nach Auftauen [ng/mL]	Stabilität [%]	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	MH84 Konz. nach Auftauen [ng/mL]	Stabilität [%]		
niedriger QC	20	20,40±1,80	102,02	5	4,91±0,09	98,29		
mittlerer QC	100	94,80±3,79	94,80	20	18,87±0,76	94,34		
hoher QC	200	199,24±18,21	99,62	100	103,04±6,24	103,04		
Langzeitstabilität (-20°C, 3 Monate)	Plasma (n=3)			Hirnhomogenat (n=3)				
	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	Langzeit MH84 Konz. [ng/mL]	Stabilität [%]	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	Langzeit MH84 Konz. [ng/mL]	Stabilität [%]		
niedriger QC	20	20,31±0,22	101,54	5	4,85±0,13	96,98		
mittlerer QC	100	100,99±4,57	100,99	20	19,84±2,10	99,19		
hoher QC	200	200,75±9,70	100,37	100	101,50±3,47	101,50		

V.5.3 Präzision und Richtigkeit (Accuracy) zur Bestätigung der Reproduzierbarkeit

V.5.3.1 Intraday-Assay

Der Intraday-Assay dient zur Bestätigung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei wiederholter Probenaufarbeitung und Analyse innerhalb eines Tages. Trotz des hohen Aufwandes dieses Assays dürfen keine Abweichungen über 15% von der gewünschten Konzentration auftreten.

Laut FDA Guideline muss eine Anzahl an 5 Wiederholungen pro QC-Konzentration in der entsprechend untersuchten Matrix untersucht werden. Nach der ersten Aufarbeitung wurde der gleiche Ablauf noch ein zweites Mal analog am gleichen Tag durchgeführt. Die Richtigkeit (Accuracy) gibt den prozentualen Istwert im Vergleich zum Sollwert an während die Präzision die relative Standardabweichung aller Analysen einer Konzentration darstellt. Für die Plasmauntersuchungen ergab sich eine mittlere Richtigkeit aller Einzelergebnisse von 96,39 – 102,12% sowie eine Präzision von 5,94 – 10,36%.

Tab. 18: Ergebnisse des Intraday-Assay für MH84 aus dem Plasma (c = 20,100, 200 ng/mL)

Durchgang A								
20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	17,90	89,50	1	91,89	91,89	1	196,32	98,16
2	21,02	105,10	2	114,93	114,93	2	218,05	109,03
3	21,18	105,90	3	91,78	91,78	3	205,84	102,92
4	22,54	112,70	4	105,43	105,43	4	182,51	91,26
5	19,84	99,20	5	105,02	105,02	5	185,66	92,83
Durchgang B								
20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	17,40	87,00	1	85,66	85,66	1	189,27	94,64
2	22,72	113,60	2	102,49	102,49	2	189,00	94,50
3	17,66	88,30	3	108,56	108,56	3	194,19	97,10
4	20,36	101,80	4	105,44	105,44	4	183,73	91,87
5	22,85	114,25	5	109,97	109,97	5	183,22	91,61
MW [ng/mL]	20,35			102,12			192,78	
SD [ng/mL]	2,11			9,31			11,45	
Präzision RSD [%]	10,36			9,12			5,94	
Richtigkeit MW [%]		101,74			102,12			96,39

Die Analyse der Hirn-QCs führte zu ähnlichen Ergebnissen. Die mittlere Richtigkeit der Methode lag zwischen 98,51 – 104,59% während die Präzision 3,30 – 4,52% betrug. Die

bessere Präzision ist auf das größere eingesetzte Matrixvolumen zurückzuführen (400 µL Hirnhomogenat im Vergleich zu 30 µL Plasma), da sich dieses, trotz ähnlichem viskosen und benetzenden Verhalten, deutlich besser und schwankungsfreier pipettieren lässt.

Tab. 19: Ergebnisse des Intraday-Assay für MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)

Durchgang A								
5 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	5,20	104,01	1	18,67	93,35	1	109,78	109,78
2	5,40	108,09	2	20,27	101,35	2	95,98	95,98
3	5,36	107,27	3	19,95	99,77	3	103,18	103,18
4	5,24	104,78	4	20,29	101,44	4	105,57	105,57
5	5,36	107,28	5	20,81	104,03	5	106,34	106,34
Durchgang B								
5 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	4,94	98,80	1	19,39	96,97	1	98,33	98,33
2	5,38	107,54	2	19,56	97,78	2	98,36	98,36
3	5,21	104,20	3	18,64	93,22	3	101,53	101,53
4	4,93	98,50	4	18,52	92,58	4	96,84	96,84
5	5,27	105,40	5	20,91	104,57	5	100,65	100,65
MW [ng/mL]	5,23			19,70			101,66	
SD [ng/mL]	0,17			0,89			4,52	
Präzision RSD [%]	3,30			4,52			4,45	
Richtigkeit MW [%]		104,59			98,51			101,66

V.5.3.2 Interday-Assay

Beim Interday-Assay wurden die Analysenergebnisse, die an zwei verschiedenen Tagen erhalten wurden miteinander verglichen, um aufzuzeigen, dass die verwendete Methode auch zwischen verschiedenen Tagen reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Dafür wurden an beiden Tagen pro QC-Konzentration in der untersuchten Matrix 5 Wiederholungen untersucht.

Die Richtigkeit ergab sich wiederum als prozentualer Istwert im Vergleich zum Sollwert während die Präzision die relative Standardabweichung aller Analysen des QC angab.

Für die Untersuchung der Plasma-QCs ergab sich für die angewendete Methode an zwei verschiedenen Tagen innerhalb von 8 Tagen eine mittlere Richtigkeit von 100,35 – 101,43% mit einer Präzision von 7,35 – 9,02%.

Tab. 20: Ergebnisse des Interday-Assay für MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)

Tag 1								
20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	17,99	89,95	1	104,93	104,93	1	229,95	114,98
2	20,42	102,10	2	98,65	98,65	2	180,67	90,34
3	21,31	106,55	3	94,71	94,71	3	189,39	94,70
4	17,91	89,55	4	95,03	95,03	4	216,84	108,42
5	22,16	110,80	5	101,12	101,12	5	223,32	111,66
Tag 2								
20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	200 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	17,90	89,50	1	91,89	91,89	1	196,32	98,16
2	21,02	105,10	2	114,93	114,93	2	218,05	109,03
3	21,18	105,90	3	91,78	91,78	3	205,84	102,92
4	22,54	112,70	4	105,43	105,43	4	182,51	91,26
5	19,84	99,20	5	105,02	105,02	5	185,66	92,83
MW [ng/mL]	20,23			100,35			202,86	
SD [ng/mL]	1,76			7,38			18,30	
Präzision RSD [%]	8,68			7,35			9,02	
Richtigkeit MW [%]		101,14			100,35			101,43

Für die Analyse aus der Hirn-Matrix zwischen den zwei Tagen innerhalb von 5 Tagen ergab sich eine mittlere Richtigkeit von 102,12 – 106,29% mit einer Präzision von 2,96 – 5,23%. Die geringere relative Standardabweichung resultiert wiederum aus der Verwendung des größeren Volumens an Matrix.

Tab. 21: Ergebnisse des Interday-Assay für MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)

Tag 1								
5 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	5,52	110,33	1	18,80	93,98	1	104,48	104,48
2	5,06	101,22	2	20,93	104,63	2	98,78	98,78
3	5,30	105,95	3	21,97	109,86	3	106,42	106,42
4	5,55	111,05	4	21,14	105,71	4	111,98	111,98
5	5,14	102,88	5	21,41	107,06	5	110,68	110,68
Tag 2								
5 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	20 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%	100 ng/mL	Konz. [ng/mL]	%
1	5,20	104,01	1	18,67	93,35	1	109,78	109,78
2	5,40	108,09	2	20,27	101,35	2	95,98	95,98
3	5,36	107,27	3	19,95	99,77	3	103,18	103,18
4	5,24	104,78	4	20,29	101,44	4	105,57	105,57
5	5,36	107,28	5	20,81	104,03	5	106,34	106,34

MW [ng/mL]	5,31			20,42			105,32	
SD [ng/mL]	0,16			1,07			5,06	
Präzision RSD [%]	2,96			5,23			4,81	
Richtigkeit MW [%]		106,29			102,12			105,32

V.5.3.3 Übersicht über alle Richtigkeits- und Präzisionsbestimmungen

Alle Bestimmungen zur Richtigkeit und Präzision im Intraday- und Interday-Assay führten zu validen Ergebnissen, die alle Forderungen der FDA Guideline erfüllten. Jeder Einzelwert lag innerhalb der maximalen Abweichung vom Sollwert von 15%. Die Mittelwerte aller durchgeführten Analysen sind in Tab.22 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 22: Zusammenfassung der Richtigkeits- und Präzisionsbestimmungen in Plasma und Hirnhomogenat

Präzision und Richtigkeit des Intraday-Assay und Interday-Assay für die Quantifizierung von MH84 in Plasma							
		Intraday-Assay (n=10)			Interday-Assay (n=10)		
	Gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	gemessene MH84 Konz. [ng/mL]	Präzision RSD % ^a	Richtigkeit [%] ^b	gemessene MH84 Konz. [ng/mL]	Präzision RSD % ^a	Richtigkeit [%] ^b
Niedriger QC	20	20,35	10,36	101,74	20,23	8,68	101,14
mittlerer QC	100	102,12	9,12	102,12	100,35	7,35	100,35
hoher QC	200	192,78	5,94	96,39	202,86	9,02	101,43
Präzision und Richtigkeit des Intraday-Assay und Interday-Assay für die Quantifizierung von MH84 im Hirn							
		Intraday-Assay (n=10)			Interday-Assay (n=10)		
	gespikte MH84 Konz. [ng/mL]	gemessene MH84 Konz. [ng/mL]	Präzision RSD % ^a	Richtigkeit [%] ^b	gemessene MH84 Konz. [ng/mL]	Präzision RSD % ^a	Richtigkeit [%] ^b
niedriger QC	5	5,23	3,30	104,59	5,31	2,96	106,29
mittlerer QC	20	19,70	4,52	98,51	20,42	5,23	102,12
hoher QC	100	101,66	4,45	101,66	105,32	4,81	105,32

^a %RSD= (Standardabweichung/Mittelwert) x 100%

^b % = gemessene Konzentration x 100%/ gespikte Konzentration

V.5.4 Wiederfindung und Crossvalidierung

Die Bestimmung der Wiederfindung dient der Überprüfung der Aufarbeitungsmethode des Analyten aus der verwendeten Matrix. Unter dem Begriff der Wiederfindung versteht man den Gehalt der Probe nach der Matrixaufarbeitung im Vergleich zu der Menge des Analyten, die vor der Aufarbeitung zur Matrix zugesetzt wurde. Sie spiegelt wieder, wie viel des Analyten bei der Aufarbeitung verloren geht und sollte möglichst groß sein, um eine hohe Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten.

Für alle QC-Proben wurden jeweils 6 Wiederholungen untersucht, in dem die Konzentration des QCs im Matrix-Lösungsmittelgemisch vor der Aufarbeitung enthalten war. Der interne Standard wurde ebenfalls vor der Aufarbeitung dazugegeben. Für die Angabe des verlustfreien Wertes wurde der sogenannte 100%-Wert eingeführt, bei dem sowohl Analyt als auch interner Standard erst nach der Aufarbeitung zugesetzt wurden, um die gewünschte 100%ige Konzentration zu erhalten. Auf diesen Wert wurden die Ergebnisse nach der Aufarbeitung bezogen. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen die Wiederfindung als Verhältnis zwischen MH84/MH41 (IS).

Für das Plasma ergaben sich mittlere Wiederfindungen dieses Verhältnisses zwischen 96,36 und 99,45%. Dies zeigt die chemische Ähnlichkeit zwischen MH84 und seinem internen Standard gibt aber noch keine Auskunft über den eigentlichen Verlust des Analyten während der Aufarbeitung. Die Wiederfindung des Einzelgehaltes an MH84 schwankte zwischen 85-110%. Der große Schwankungsbereich konnte jedoch durch den Einsatz des internen Standards vor der Aufarbeitung deutlich reduziert werden, sodass die relative Standardabweichung der hier analysierten Proben nur zwischen 3,66% und 4,49% lag.

Tab. 23: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindung aus Plasma (c = 20, 100 und 200 ng/mL)

20 ng/mL	Wiederfindung [%]	100 ng/mL	Wiederfindung [%]	200 ng/mL	Wiederfindung [%]
1	95,24	1	102,39	1	92,29
2	90,25	2	92,74	2	97,33
3	96,55	3	97,70	3	105,54
4	99,78	4	102,07	4	97,54
5	96,55	5	104,89	5	98,82
6	99,78	6	96,90	6	99,52
MW [%]	96,36	MW [%]	99,45	MW [%]	98,51
SD [%]	3,52	SD [%]	4,47	SD [%]	4,28
RSD [%]	3,66	RSD [%]	4,49	RSD [%]	4,34

Auch bei der Bestimmung der Wiederfindung von MH84 aus der Hirnmatrix wurden Schwankungen zwischen 85 und 110% festgestellt. Der Einsatz des internen Standards vor der Matrix-Aufarbeitung führte jedoch ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der relativen Standardabweichung auf 1,94 – 5,02%. Die mit Hilfe des Verhältnisses aus MH84/MH41 bestimmten mittleren Wiederfindungen lagen zwischen 94,78 und 98,27%.

Tab. 24: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindung aus Hirnhomogenat (c = 5, 20 und 100 ng/mL)

5 ng/mL	Wiederfindung [%]	20 ng/mL	Wiederfindung [%]	100 ng/mL	Wiederfindung [%]
1	91,53	1	96,99	1	92,42
2	105,75	2	97,04	2	90,97
3	95,70	3	98,32	3	92,42
4	98,00	4	96,99	4	99,80
5	101,69	5	97,03	5	93,26
6	96,94	6	92,86	6	99,80
MW [%]	98,27	MW [%]	96,54	MW [%]	94,78
SD [%]	4,93	SD [%]	1,88	SD [%]	3,96
RSD [%]	5,02	RSD [%]	1,94	RSD [%]	4,18

Aufgrund des Mangels an Plasma und Hirngewebe von der Maus (Leermatrix), wurde eine Crossvalidierung durchgeführt. Dabei wurde die Äquivalenz der für die Validierung verwendeten Ersatzmatrix, hier Rattenplasma und Schweinehirn-Homogenat, gezeigt. Dies war notwendig um die Validierungsergebnisse der Ersatzmatrix auf die Mäusematrix zu übertragen und auch um die Proben aus den Tierversuchen mittels einer Kalibriergerade in der Ersatzmatrix analysieren zu können.

Für den QC von 100 ng/mL wurden jeweils drei Wiederholungen pro Matrix aufgearbeitet und mit den entsprechenden 100%-Werten der Matrix verglichen.

Bei der Auswertung der Verhältnisse aus MH84/MH41 konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Spezies festgestellt werden. Beim Plasma-Vergleich zeigten sich mittlere Wiederfindungen von 99,08% bei der Maus im Vergleich zu 98,58% bei der Ratte. Die Analyse im Hirnhomogenat führte zu einer mittleren Wiederfindung bei der Maus von 99,88% im Vergleich zum Schwein mit 103,77%. Diese Ergebnisse liegen im bereits gezeigten Schwankungsbereich der Probenaufarbeitung und Vermessung.

Die Einzelwiederfindungen von MH84 lagen bei allen untersuchten Matrices wiederum zwischen 85 und 110%. Die Äquivalenz der Ersatzmatrix konnte somit zweifelsfrei bewiesen werden.

Tab. 25: Ergebnisse der Crossvalidierung zwischen Maus- und Rattenplasma (links) und Maus- und Schweinehirn (rechts)

Plasma 100 ng/mL	Wiederfindung [%] Maus	Wiederfindung [%] Ratte		Hirn 100 ng/mL	Wiederfindung [%] Maus	Wiederfindung [%] Schwein
1	95,40	96,34		1	110,01	104,60
2	95,17	94,80		2	94,24	97,65
3	106,67	104,59		3	95,40	109,07
MW [%]	99,08	98,58		MW [%]	99,88	103,77
SD [%]	6,57	5,26		SD [%]	8,79	5,75
RSD [%]	6,63	5,34		RSD [%]	8,80	5,54

VI MH84 Tierstudien

Die durchgeführten Tierstudien wurden durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Genehmigungsnummer: FU/1004).

VI.1 Tiere

Für die Untersuchung des pharmakokinetischen Profils und der ZNS-Gängigkeit wurden 3 Monate alte, männliche C57BL/6JRj Mäuse verwendet, die von Janvier Labs, Frankreich bezogen wurden. Die transgenen Tiere für die Pharmakodynamik-Studien stammten aus dem pharmakologischen Institut der Goethe Universität Frankfurt. Die Reproduktion erfolgte dort durch Inzucht von C57BL/6J Mäusen, die eine mutierte Form des humanen APP tragen. Die offizielle Bezeichnung dieser Mäuse lautet Thy1-APP751_{SL}. Die aus der Züchtung ebenfalls erhaltenen, nicht-transgenen Mäuse wurden sowohl für die jeweiligen Kontrollgruppen als auch für die 3-wöchige ZNS-Akkumulationsstudie verwendet. Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen betreut, hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung und wurden in einem 12 h Tages-/Nacht-Zyklus gehalten.

VI.2 Herstellung der Lösungen für die orale Gabe

Aufgrund der hohen Lipophilie, wurde MH84 in Polyethylenglycol 400 (PEG400) gelöst. Dieses ist gut verträglich und stellt ein geeignetes Lösungsmittel für unpolare Substanzen dar. Dafür wurden für die Pharmakokinetik-Studie 42,0 mg MH84 eingewogen bis zu einer Gesamtmasse von 22,6 g mit PEG400 versetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 2,1 mg/mL (Dichte PEG400 = 1,13 g/mL).

Diese Konzentration wurde errechnet, indem von einem maximalen Applikationsvolumen von 200 µL pro Maus ausgegangen wurde. Das geschätzte maximale Gewicht der Mäuse lag bei 35 g. Für eine Dosis von 12 mg/Kg ergab sich demnach die oben hergestellte Konzentration der Lösung. Die verabreichte Menge wurde dann dem wirklichen Körpergewicht der Maus angepasst.

Für die ZNS-Akkumulationsstudie und Pharmakodynamik-Studien erfolgte die Herstellung der MH84-Lösungen analog. Es wurden für jede Langzeitstudie 50 mL der beschriebenen Lösung hergestellt.

VI.3 Pharmakokinetik-Studie

Diese Studie wurde von Prof. Dr. Jochen Klein geleitet und experimentell von Christoph Stein am pharmakologischen Institut der Goethe Universität durchgeführt.

Die Bestimmung der Pharmakokinetik im Plasma und im Gehirn ist von essentieller Bedeutung für MH84. Durch diese Untersuchungen wird das Überqueren der Blut-Hirn-Schranke charakterisiert, welches für die gewünschte Wirkung im ZNS unerlässlich ist.

Für die Bestimmung der pharmakokinetischen Eigenschaften von MH84 wurden jeweils 6 gesunden Mäusen pro untersuchtem Zeitpunkt eine einmalige Dosis von 12 mg/Kg MH84 (in PEG400 gelöst) mittels Schlundsonde verabreicht. Es wurden 9 Zeitpunkte (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 6; 12; 24; 48 h) untersucht, die das gesamte pharmakokinetische Profil abdecken sollten.

Nach der entsprechenden Zeit wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und durch Dekapitation getötet. Das Blut wurde dabei in heparinisierten Eppendorf-Gefäßen (1,5 mL) aufgefangen und anschließend direkt bei 900 xg zentrifugiert um das Plasma zu erhalten.

Parallel dazu wurde das Hirn entnommen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Behandlung (Homogenisierung) bei -20°C aufbewahrt.

Die Plasma- und Hirnproben wurden wie in der Methodenentwicklung beschrieben (Kap. V.4) aufgearbeitet und mit der validierten LC-MS Methode analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergerade in der jeweiligen Matrix. Proben die höhere Konzentrationen aufwiesen als von der verwendeten Kalibriergerade abgedeckt wurden, konnten durch eine Verdünnung mit Leermatrix und nochmaliger Aufarbeitung analysiert werden.

Tab. 26: Einzelergebnisse der Pharmakokinetik-Studie von MH84 an gesunden C57Bl/6JRj-Mäusen

Zeit [h]	Tier	Körpergewicht [g]	Hirngewicht [mg]	Plasmakonz. [µg/mL]	MW und SD Plasmakonz.	Hirnkonz. [ng/g]	MW und SD Hirnkonz.
0,5	1	27	413,6	10,02		130,05	
0,5	2	24	427,2	8,44		141,52	
0,5	3	24	427,5	2,27		74,33	
0,5	4	25	430,0	1,39		76,07	
0,5	5	24	412,0	2,10		56,40	
0,5	6	24	427,5	1,62	4,31 ± 3,86	81,92	93,38 ± 34,13
1	1	24	405,2	5,41		211,42	
1	2	26	420,6	1,40		100,15	
1	3	26	421,3	8,50		176,17	
1	4	27	418,7	2,88		121,57	
1	5	23	385,7	9,77		188,13	
1	6	24	429,2	4,31	6,17 ± 2,88	182,47	163,32 ± 42,88
1,5	1	27	432,4	13,32		406,85	
1,5	2	24	428,4	14,49		388,78	
1,5	3	23	439,3	9,51		407,79	

1,5	4	25	445,2	7,53		382,95	
1,5	5	26	444,3	8,09		218,94	
1,5	6	26	436,2	2,12	9,51 ± 3,14	118,54	320,64 ± 122,26
2	1	25	455,7	8,26		405,06	
2	2	27	447,4	5,61		157,39	
2	3	28	425,5	7,22		201,43	
2	4	24	416,3	6,67		188,94	
2	5	25	445,5	8,84		328,20	
2	6	23	426,5	5,20	6,97 ± 1,43	257,69	256,45 ± 94,48
3	1	26	431,1	10,82		337,73	
3	2	23	443,4	6,33		415,65	
3	3	24	421,9	15,26		308,04	
3	4	23	434,8	11,45		276,03	
3	5	24	417,6	7,98		269,43	
3	6	28	451,1	13,59	10,90 ± 3,35	259,83	311,12 ± 58,73
6	1	26	434,4	8,47		342,88	
6	2	25	437,0	1,80		118,06	
6	3	29	449,6	4,62		304,98	
6	4	24	417,6	3,01		69,50	
6	5	23	432,0	12,76		276,64	
6	6	26	451,5	11,45	7,02 ± 4,56	496,97	307,91 ± 136,01
12	1	26	432,0	2,69		685,18	
12	2	24	431,8	1,07		153,34	
12	3	27	414,0	3,12		168,06	
12	4	26	441,1	~ LOQ		21,43	
12	5	25	431,5	1,23		186,23	
12	6	26	426,6	19,35	2,03 ± 1,03	788,13	242,85 ± 255,68
24	1	26	449,9	> LOD		~ LOQ	
24	2	27	457,7	> LOD		~ LOQ	
24	3	27	458,4	0,15		40,49	
24	4	22	420,2	> LOD		~ LOQ	
24	5	24	443,7	> LOD		~ LOQ	
24	6	23	410,8	> LOD	0,15	~ LOQ	40,49
48	1	34	446,5	< LOD		> LOD	
48	2	34	455,4	< LOD		> LOD	
48	3	30	455,0	< LOD		> LOD	
48	4	29	449,0	< LOD		> LOD	
48	5	26	437,2	< LOD		> LOD	
48	6	24	450,5	< LOD	0	> LOD	0

In Tabelle 26. sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Messzeitpunkte zusammengefasst. Alle grau gekennzeichneten Einzelergebnisse wurden aus der Bildung des Mittelwerts ausgeschlossen, da es sich dabei um typische Ausreißer bei Tierstudien handelt. Mit den Ergebnissen wurden die entsprechenden Zeit-Konzentrations-Kurven (Abb. 21) erstellt.

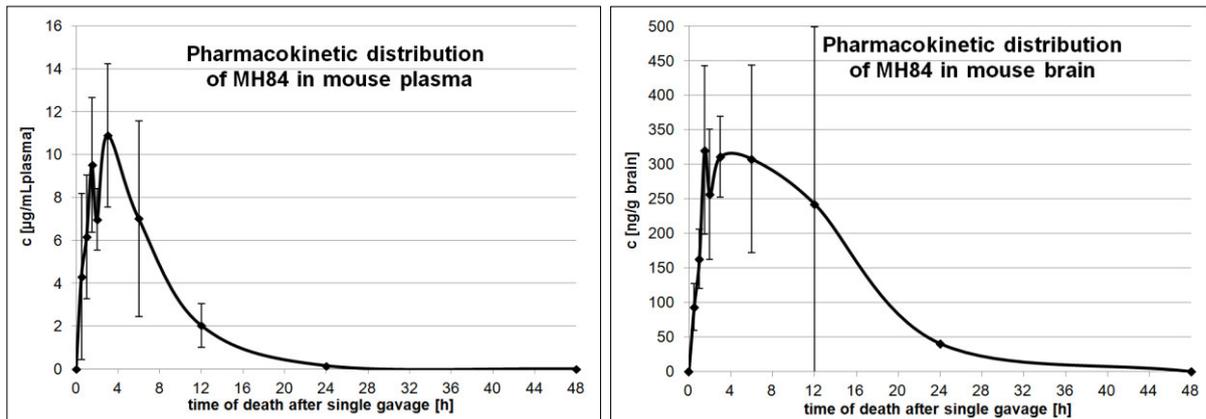


Abb. 21: Pharmakokinetische Profile von MH84 in Plasma und Hirngewebe nach Einmalgabe von MH84 (12 mg/Kg)

Die so erhaltenen pharmakokinetischen Profile unterscheiden sich deutlich in ihrem zeitlichen Verlauf. Während der MH84-Gehalt im Plasma rasch ansteigt und nach 3 h ein Maximum erreicht ($C_{\max} = 10,90 \mu\text{g/mL}$) um anschließend rasch wieder abzusinken (nach 12 h weniger als 20% von C_{\max}), steigt der MH84-Gehalt im Hirn ebenfalls rasch an, bleibt bis 6 h nach der Schlundierung konstant (307,91-320,64 ng/mL) um dann deutlich verlangsamt das Hirngewebe wieder zu verlassen (nach 12 h noch ca. 75% von C_{\max}). Nach 24 h lagen 5 der 6 Messwerte knapp unterhalb des LOQ, also bei ca. 15-20 ng/g Hirn, während ein Wert bei 40,49 ng/mL lag. Auch bei den Plasmaproben war das Ergebnis dieses untersuchten Tieres noch quantifizierbar (150 ng/mL Plasma), während alle anderen Proben deutlich unterhalb des LOQs lagen aber noch über dem LOD. Beide quantifizierbaren Werte gingen als Einzelwerte direkt in die Erstellung des pharmakokinetischen Profils ein.

Mit Hilfe des pharmakokinetischen Profils von MH84 im Plasma wurden die pharmakokinetischen Daten bestimmt. Dafür wurde das Programm PKSolver2.0 (China, [164]) verwendet. Dies ist ein frei verfügbares Add-In für Microsoft Excel®.

Tab. 27: Pharmakokinetische Parameter von MH84 in Mäuseplasma

Plasma	
AUC _{48h} [µg h/mL]	89.58
AUMC _{48h} [µg h ² /mL]	560.73
MRT _{48h} [h]	6.26
t _{1/2} [h]	3.24
CL [mL/min/Kg]	2.23
Vd [L/Kg]	0.63

Die pharmakokinetischen Daten im Plasma verdeutlichen, dass MH84 aufgrund der kurzen Dauer bis zum Anfluten der Wirkstoffkonzentration, in erheblichen Mengen wahrscheinlich im Magen resorbiert wird. Eine Halbwertszeit von über drei Stunden stellt einen guten Ausgangspunkt für eine weitere Untersuchung des Wirkstoffkandidaten dar. Die deutlich länger anhaltende Präsenz von MH84 im ZNS, welche im Kinetikprofil gezeigt werden konnte, bekräftigt dieses Resultat.

Die Pharmakokinetik kann sich jedoch sowohl bei erkrankten Mäusen als auch im Menschen durch eine krankheitsbedingte, eventuelle Schädigung der Bluthirnschranke [165], [166] und die fehlende Möglichkeit die Ergebnisse von Tiermodellen direkt auf den menschlichen Organismus zu übertragen, deutlich unterscheiden. Weiterführende Untersuchungen diesbezüglich könnten von Interesse für die weitere Substanzcharakterisierung sein.

VI.4 ZNS-Akkumulationsstudie

Unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Gunter P. Eckert wurden sowohl die Akkumulationsstudie als auch die Pharmakodynamik-Studien von Maximilian Pohland am pharmakologischen Institut der Goethe-Universität experimentell durchgeführt.

Bei der ersten Studie wurde untersucht ob sich die geringen Mengen an MH84, die nach 24 h im Hirngewebe nachweisbar waren, über einen längeren Zeitraum durch die tägliche orale Gabe von MH84 im Hirngewebe anreichern. Parallel zur ersten Pharmakodynamik-Tierstudie wurde 8 Tieren täglich die bislang untersuchte Dosis von 12 mg/Kg mittels Schlundsonde für 21 Tage (Dauer der Pharmakodynamik-Studie) verabreicht.

Tab. 28: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung nach 21 tägiger Gabe von MH84 (12 mg/Kg/Tag), inkl. Körper- und Hirngewichten der Mäuse nach Beendigung der Tierstudie

Tier	Körpergewicht [g]	Hirngewicht [mg]	c [ng/mL Plasma]	c [ng/g Hirn]
1	21	406,3	85.04	35.19
2	26	443,0	353.57	< LOQ
3	27	409,3	< LOQ	< LOQ
4	23	426,8	55.55	29,65
5	20	398,6	54.94	22,58
6	24	462,7	50.96	20,65
7	26	420,2	162.89	24,17
8	21	442,2	< LOQ	21,40

Es konnten keine deutlich höheren Konzentrationen im Vergleich zur Einmalgabe im Plasma und im Hirn der Tiere nachgewiesen werden. Daraus resultiert die Annahme, dass es dort zu keinen Anreicherungseffekten von MH84 bei einer täglichen Dosis von 12 mg/Kg nach 21 Tagen kommt. Ob sich der Wirkstoff in anderen Organen der Tiere angereichert hat wurde bislang nicht untersucht.

Nach den drei Wochen konnten keine gesundheitlichen Auffälligkeiten bei den Mäusen festgestellt werden. Die Tiere waren sehr vital und es kam zu keinen nennenswerten Gewichtsverlusten.

VI.5 Pharmakodynamik-Studien

Während zwei jeweils drei-wöchigen Fütterungsstudien wurde die Wirksamkeit von MH84 an transgenen Thy1-APP751_{SL} Mäusen untersucht. MH84 (12 mg/Kg/Tag) wurde in beiden Studien durch orale Gabe per Schlundsonde verabreicht. Die erste Studie wurde an Mäusen durchgeführt, die aufgrund ihres Alters (9 Monate) einen fortgeschrittenen Krankheitsverlauf simulieren. In der zweiten Studie wurde die Wirkung von MH84 an jüngeren, 3 Monate alten, Mäusen untersucht. Dieses Alter stellt den Zeitpunkt dar, bei dem frühe pathologische Merkmale von AD auftreten, vor allem die mitochondriale Dysfunktion.

Beide Studien führten zu einer vollständigen Regenerierung der mitochondrialen Funktion (MMP, ATP, Atmungskettenkomplex IV) durch MH84. Die A β -Spiegel nahmen tendenziell etwas ab. Längere Behandlungsdauern könnten diesen Effekt wahrscheinlich verstärken.

In beiden Studien konnte zusätzlich zu den Verbesserungen der Mitochondrienfunktion auch eine erhöhte Biosynthese funktionsfähiger Mitochondrien festgestellt werden (erhöhte Citratsynthaseaktivität), wodurch es wahrscheinlich zu einer verbesserten ATP-Versorgung innerhalb der Neuronen kommt.

Die ausführlichen Ergebnisse dieser Tierstudien werden in der Dissertation von Maximilian Pohland dargestellt, der die Beeinflussung der Mitochondrienfunktion durch MH84 im Vorfeld auch *in vitro* charakterisiert hat.

VI.6 Diskussion der MH84 Tierstudien

Die pharmakokinetischen Profile von MH84 im Plasma und Hirngewebe konnten mit der neu-entwickelten, validierten Methode bestimmt werden. Nach einmaliger Gabe von 12 mg/Kg konnten maximale Konzentrationen von 10,90 $\mu\text{g/mL}$ (18 μM) im Plasma erreicht werden. Diese Konzentration ist ausreichend um periphere Effekte an PPAR γ ($\text{EC}_{50} = 11.0 \mu\text{M}$) außerhalb des ZNS auszulösen. Zu, daraus resultierenden, eventuellen zusätzlichen, positiven Effekten auf die krankheitsbedingten Veränderungen im ZNS gab es bei Untersuchungen zu den PPAR γ Agonisten, wie Rosiglitazon und Pioglitazon nur wenige Hinweise [87], [90].

Die Blut-Hirn-Schranke, die für die Adressierung AD-typischer Angriffspunkte durchquert werden muss, wurde von einem Teil von MH84 überwunden. Die maximale ZNS-Konzentration lag bei 307,91-320,64 ng/g, was bei einer angenommenen Dichte des Hirngewebes von 1 g/mL max. 0,53 μM entspricht. Dies ist deutlich weniger als für die Adressierung der γ -Sekretase ($\text{IC}_{50}(\text{A}\beta_{42}) = 6.0 \mu\text{M}$; $\text{EC}_{50}(\text{A}\beta_{38}) = 1.8 \mu\text{M}$) und PPAR γ ($\text{EC}_{50} = 11.0 \mu\text{M}$) benötigt wird.

Dennoch konnten deutliche positive Effekte auf das Krankheitsmodell in den pharmakodynamischen Tierstudien nachgewiesen werden. Die mit MH84 behandelten Tiere wirkten, vor allem in der ersten Studie mit 9 Monate alten Mäusen, nach der dreiwöchigen Behandlung deutlich vitaler und aktiver als die transgenen Kontrolltiere.

Die gezeigte tendenzielle Verringerung der A β -Spiegel könnte entweder aus einer leichten Modulation der γ -Sekretase oder aus der indirekten Reduzierung der β -Sekretase Aktivität, über eine Aktivierung von PPAR γ resultieren. Eigentlich sollte die gemessene ZNS-Konzentration dafür zu gering sein, aber MH84 konnte *in vitro* zusätzlich eine erhöhte Expression von PGC-1 α auch bei sehr kleinen Konzentrationen auslösen. Dies könnte die von MH84 verursachte PPAR γ Aktivierung durch eine erhöhte Rekrutierung des Coaktivators zusätzlich verstärken. Die *in vitro* Charakterisierung der PPAR γ Aktivität erfolgt ohne Einfluss durch PGC-1 α , da dieser Coaktivator im verwendeten Assay nicht anwesend ist. Die reale PPAR γ Aktivität von MH84 könnte demnach durch die positiven Effekte auf PGC-1 α deutlich höher sein als im *in vitro* Assay bestimmt werden konnte. Der Effekt der erhöhten mitochondrialen Biosynthese unterstützt die Hypothese für eine erhöhte Expression von PGC-1 α auch während der Pharmakodynamik-Studien.

Es bleibt zusätzlich ungewiss, ob es bei einer AD-typischen Schädigung der Blut-Hirn-Schranke in transgenen Tieren, wie denen in der Pharmakodynamik-Studie, eventuell zu höheren Konzentrationen im ZNS kommt.

Die deutlichsten *in vivo* Verbesserungen konnten bezüglich der mitochondrialen Dysfunktion nachgewiesen werden. Dies bestätigt die guten Ergebnisse der *in vitro* Testungen, die zeigten, dass MH84 schon bei einer Konzentration von 30 nM zu einer Verbesserung der geschädigten Mitochondrienfunktion führt. Die bestimmte ZNS Konzentration ist somit über eine weite Zeitspanne ausreichend, um zu einer positiven Wirkung an den Mitochondrien zu führen. Im Vergleich zu nicht behandelten transgenen Mäusen zeigten die 3 und 9 Monate alten Mäuse nach 21 Tagen oral verabreichtem MH84 eine vollständige Regenerierung der mitochondrialen Funktion (MMP, ATP, Atmungskettenkomplex IV). Diese Effekte wurden begleitet durch eine erhöhte Biosynthese der Mitochondrien (Bestimmung anhand der Citratsynthaseaktivität).

VII Analytische Methodenentwicklung für MH163

VII.1 Entwicklung der HPLC-Trennmethode

Ausgehend von ähnlich lipophilen Eigenschaften von MH163 im Vergleich zu MH84 konnte die gleiche MulthoHigh 100 RP 18-5 μ (125 x 4 mm) Säule für die HPLC-Trennung verwendet werden. Ein Fließmittelgemisch von 88,5% MeOH/ 11,5 % Ameisensäure (0,1%) bei einem Fluss von 1 mL/min führte zu einer Retentionszeit von 6,2 min, was eine Abtrennung von Matrixrückständen ermöglicht.

VII.2 Bestimmung eines internen Standards

Sowohl MH41 (siehe Abb.15), der interne Standard der MH84 Methode, als auch verschiedene Zimtsäurederivate aus der hausinternen Substanzbibliothek wurden als interner Standard getestet, da sich die LC-Methode nur unwesentlich von der LC-Methode für MH84 unterscheidet. Zu den getesteten Zimtsäurederivaten zählten DF13, DF42 und DF22 (Abb.22). Während MH41 mit MH163 koeluierte und auch eine chemisch deutlich verschiedene Struktur aufweist, eluierten die Zimtsäurederivate DF13 und DF42 deutlich zu spät (bei 11 und 14 min). DF22 zeigte eine geeignete Retention mit einer Retentionszeit von 7,0 min und konnte somit als interner Standard verwendet werden.

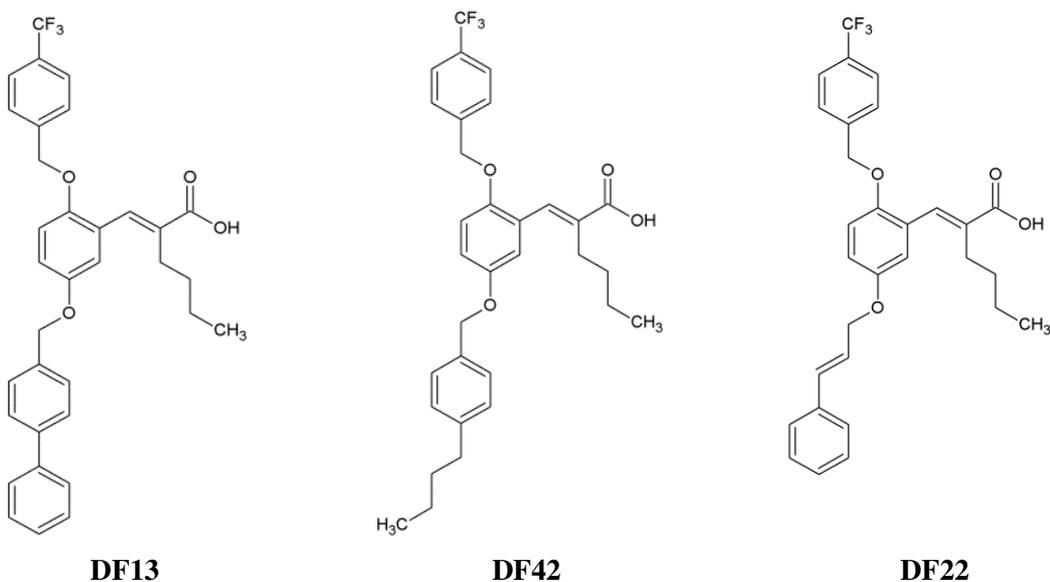


Abb. 22: Interne Standards für die Testung auf Eignung für die MH163 Analytik-Methode

VII.3 APCI- und MS-Parameteroptimierung

Ausgegangen wurde von einer Methode im positiv-Modus unter Verwendung der APCI-Ionenquelle. Es war dabei auffällig, dass statt der zu erwarteten Masse von $m/z = 553,2$ eine Masse von $m/z = 535,1$ nachgewiesen wurde. Diese Masse ergibt sich durch eine H_2O -Abspaltung vom Molekül nach vorheriger Übertragung eines H^+ durch die Ionisierung.

Die Umstellung der Methode auf den negativ-Modus der APCI-Ionisierung zu einer eventuellen Verbesserung der Empfindlichkeit führte zu einem Signal bei $m/z = 551,2$ mit einer ca. doppelt so hohen Intensität im Vergleich zum Signal im positiv-Modus. Der interne Standard DF22 ($m/z = 509,2$) konnte mit diesen Parametern ebenfalls dargestellt werden. Der LOQ für MH163 bei Verwendung eines Injektionsvolumens von 50 μL lag bei dieser Methode bei 4,4 ng/mL und der LOD bei 1,3 ng/mL.

Tab. 29: Ausgangsparameter der APCI-Methode für MH163 im negativ-Modus

Capillary	4000 V
Corona	2000 nA
Nebuliser	2.0 Bar
Dry Gas	5,0 L/min
Dry Temp.	200°C
Vapor. Temp.	450°C
Ion Energy	5 eV
Collision Energy	10 eV
Collision RF	250 Vpp

Bei der Methodenentwicklung wurde ein sehr kleiner zweiter Peak auf der Massenspur von MH163 mit etwas höherer Retentionszeit von 7 min sichtbar. Durch die vorliegende Doppelbindung im MH163-Molekül handelt es sich wahrscheinlich um das Z-Isomer. Dieses scheint thermodynamisch stabiler zu sein als das E-Isomer, da das Integral dieses Peaks mit zunehmender Zeit im Tageslicht größer wird und sich somit das Gleichgewicht zwischen den beiden Peaks auf die Seite des Z-Isomers verschiebt.

Um die beiden Peaks besser analysieren zu können und die Beeinflussung verschiedener Parameter auf die einzelnen Peaks besser beurteilen zu können, wurden diese durch eine Erhöhung des Ameisensäure-Anteils im Fließmittel auf 12% stärker voneinander getrennt.

Die Retentionszeiten betragen dadurch für das ursprüngliche Isomer 6,6 min und für das neu hinzugekommene Isomer 7,5 min ohne eine vollständige Basislinientrennung zu erzielen, um zusätzlich die Gesamtfläche beider Isomere bei der Integration bestimmen zu können. Die Retentionszeit des internen Standards erhöhte sich auf 7,6 min. Durch Belichtung einer methanolischen MH163- Lösung konnte ein Zustand realisiert werden, bei dem die Intensität des Z-Peaks sogar deutlich größer wurde als die Intensität des ursprünglichen vorliegenden E-Peaks. Der Belichtungszeit-abhängige Übergang zum Z-Isomer konnte durch die Injektion nach verschiedenen Zeitabständen in die LC-MS verfolgt werden. Je nach Exposition im Licht, bei geschlossenen Autosampler oder unter normalen Lichtbedingungen im Labor, wurde nach unterschiedlichen Zeiten ein Zustand erreicht bei dem der Z-Peak doppelt so hoch war als der E-Peak. Bei normalen Laborbedingungen in einem farblosen Eppendorf-Gefäß (1,5 mL) wurde dieser Zustand bereits nach 5 Stunden erreicht. In einem Braunglasvial im Autosampler konnte nach 24 h der gleiche Zustand nachgewiesen werden (Abb.23). Für die weitere Methodenentwicklung wurden stets frische Lösungen verwendet, die möglichst wenig dem Tageslicht ausgesetzt wurden. Dafür wurden alle Gefäße mit Aluminium-Folie umwickelt.

Zusätzlich wurde versucht die Isomerisierung durch Variation des pH-Wertes zu beeinflussen. Dies führte zu keiner Verbesserung zugunsten eines der beiden Isomere oder einer vollständigen Verhinderung der Isomerisierung zum Z-Isomer. Aus diesem Grund wurde bei der quantitativen Analyse von MH163 stets eine Gesamtintegration beider Peaks vorgenommen.

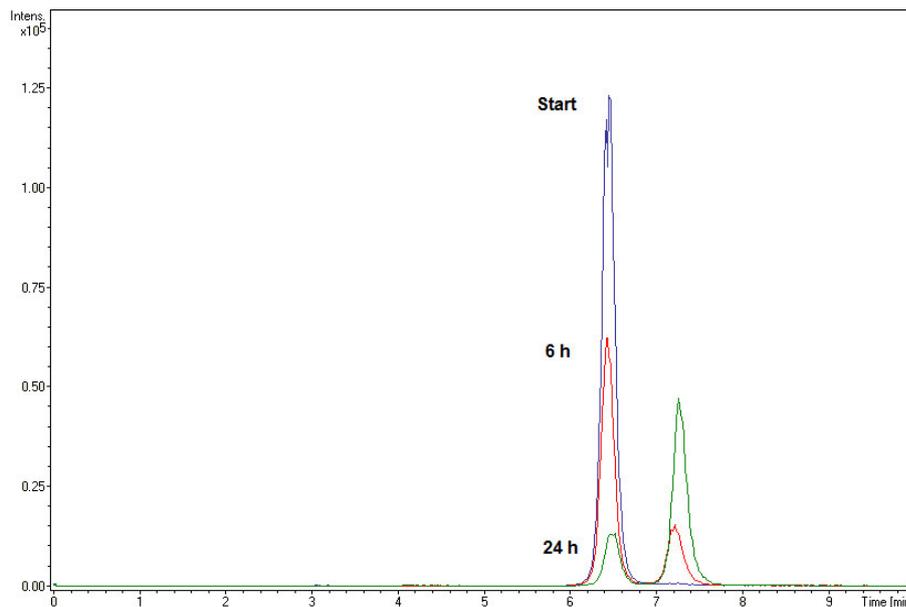


Abb. 23: Isomerisierungsverlauf von MH163 in einem Braunglasvial im Autosampler; im Tageslicht wird der hier gezeigte Zustand nach 24 h bereits nach 5 h erreicht; alle Signale zeigen die Massenspur $m/z = 551,2$

Um die Empfindlichkeit der Methode bezogen auf das Gesamtintegral beider Isomere wurden folgende Parameter getestet und die optimalen, hervorgehobenen Werte kombiniert (Tab.31). Die Spraybedingungen wurden von der MH84 Methode übernommen, da die in die APCI gelangende Lösung ein nahezu identisches Fließmittelgemisch aufweist.

Tab. 30: Parameteroptimierung der MH163 APCI-Methode im positiv-Modus

Capillary	3000; 3500 ; 4000; 4500; 5000 eV
Corona	2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; 10000 ; 15000 ; 20000 ; 25000 ; 30000 nA
Ion Energy	1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 ; 4,5; 5; 5,5; 6 eV
Collision Energy	6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10 eV
Collision RF	250; 300; 350 ; 400; 450; 500; 550; 600 Vpp

Zusammenfassend ergeben sich folgende optimierte APCI-MS-Einstellungen für die MH163-Methode.

Tab. 31: Zusammenfassung der optimierten APCI-MS-Parameter für MH163

Capillary	3500 V
Corona	25000 nA
Nebuliser	2.0 Bar
Dry Gas	3,0 L/min
Dry Temp.	350°C
Vapor. Temp.	400°C
Ion Energy	4 eV
Collision Energy	10 eV
Collision RF	350 Vpp

Diese Methode ergab bei identischem Injektionsvolumen von 50 µL einen LOQ von 1,1 ng/mL und einen LOD von 0,3 ng/mL und war somit um den Faktor 4 empfindlicher im Vergleich zur Ausgangsmethode.

Um weitere Hinweise auf die Stabilität von MH163 zu erhalten, wurden zunächst die Lösungen einer Kalibriergerade nach 24 h nochmals in die LC/MS-Anlage injiziert. Dabei fiel auf, dass zusätzlich die Gesamtfläche der MH163 Peaks deutlich abgenommen hat.

Zur Bestimmung dieser Zeitabhängigkeit wurde eine Lösung ($c = 200 \text{ ng/mL}$) von frisch gelöstem MH163 untersucht. Bereits nach 5 Stunden konnten nur noch ca. 77% des anfänglich gefundenen Gesamtintegrals beider Isomere wiedergefunden werden (Abb.24). Dieses Zeitfenster ist deutlich zu kurz um die Probenaufarbeitung aus verschiedenen Matrices durchführen zu können. Nach 24 h wurde ein Gehalt von ca. 54% im Vergleich zum Ausgangsgehalt nachgewiesen. Diese zeitabhängige Abnahme des Gesamtflächenintegrals wies somit auf eine zusätzliche Instabilität von MH84 hin.

Um eventuell typische Instabilitäten der Substanzklasse der Zimtsäuren ausfindig zu machen, wurde eine Literaturrecherche diesbezüglich durchgeführt. Es wird einschlägig beschrieben, dass Zimtsäuren über eine [2+2] Cycloaddition an der Doppelbindung unter Ausbildung eines Cyclobutanringes dimerisieren können [167]. Diese Reaktivität findet jedoch hauptsächlich im festen Zustand statt und es ist fraglich ob dies die Ursache für die Flächenabnahme des Gehaltes an MH163 in der Lösung ist.

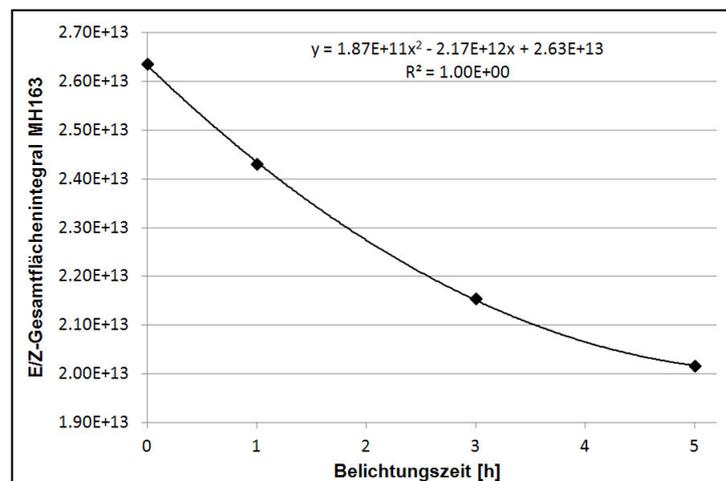


Abb. 24: Zeitlicher Gehaltsverlust von MH163 im analytisch kritischen Zeitfenster von 5 h, gemessen anhand des Gesamtintegrals des E- und Z-Isomers

VII.4 Strukturaufklärung des Umlagerungsproduktes

Zur Aufklärung der Substanzveränderung, die zur Abnahme des Gesamtintegrals der MH163-Isomere führt, wurden 200 mg MH163 in 200 mL Methanol gelöst und für einen Monat unter Laborbedingungen ins Tageslicht gestellt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zum Umlagerungsprodukt zu realisieren. Eine DC nach Beendigung des Belichtungsprozesses zeigte folgendes Bild im Vergleich zu einer DC aus frisch gelöster Substanz (Laufmittel Hexan/Essigester 3:1):

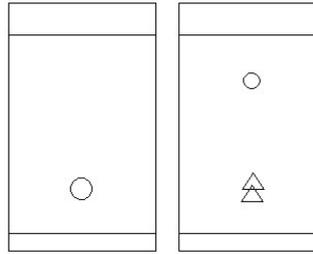


Abb. 25: Vergleich zweier DCs von MH163-Lösungen, links: frisch gelöst; rechts: nach 1-monatiger Belichtung im Tageslicht

Da mittels der oben beschriebenen HPLC-Methode gezeigt werden konnte, dass das E- und Z-Isomer lediglich ein leicht verschiedenes, aber nah beieinander liegendes Retentionsverhalten auf der RP-Phase zeigen, bestand die Vermutung, dass die unteren beiden Signale auf der DC der belichteten Probe den Isomeren zuzuordnen sein könnte. Der obere Punkt erscheint erst durch die Belichtung, da er bei einer Vergleichs-DC aus frisch gelöster Substanz nicht auftaucht.

Unklar war ob ein Dimer wirklich ein so stark verschiedenes Retentionsverhalten aufweisen kann, da durch die [2+2] Cycloaddition an der Doppelbindung der Zimtsäure kaum eine Veränderung der Moleküleigenschaften zu erwarten ist. Die im Monomer bestehenden funktionellen Gruppen liegen auch im Dimer vor. Deswegen ist ein so stark abweichendes Retentionsverhalten nicht zu erwarten.

Zur Aufklärung der Identität der einzelnen Signale wurde das Substanzgemisch durch Säulenchromatographie auf der Normalphase (NP) präparativ getrennt. Es konnten drei Fraktionen erhalten werden, die auf ihre Masse hin untersucht wurden.

Sowohl die unterste als auch die leicht nach oben verschobene Fraktion wiesen die Molmasse von MH163 (552,2 g/mol) auf. Dies bestätigte die Annahme, dass es sich um das E- und Z-Isomer von MH163 handelt. In den Massenspektren dieser beiden Fraktionen konnte ebenfalls jeweils eine Masse von 1104,2 nachgewiesen werden.

Das bedeutet, dass die jeweiligen Dimere der MH163 Isomere kein von den Monomeren verschiedenes chromatisches Retentionsverhalten aufweisen und somit auch nicht abgetrennt werden konnten. Ob die Dimere bereits vor dem Lösen im Feststoff vorhanden waren, während der Belichtung der Lösung entstanden sind oder lediglich bei der Ionisierung im Massenspektrometer gebildet wurden, bleibt ungewiss. Der zusätzliche, neu entstandene Spot resultiert demnach nicht von den dimerisierten Isomeren von MH163.

Die Bestimmung der Masse, der nun unbekanntes Fraktion gestaltete sich als schwierig. Bei den normalen ESI-Bedingungen der Auftrags-MS-Messung wurden Spektren mit sehr vielen,

verschiedenen Signalen erhalten. Aufgrund des Wissens, dass es sich nur um eine Substanz handeln kann (präzise Trennung über die NP-Säulenchromatographie) wurde angenommen, dass die Substanz nicht hinreichend stabil ist und während der Ionisierung im Massenspektrometer zerstört wird. Verschiedene Versuche wurden unternommen um die Masse dennoch zu bestimmen. Schonendere ESI-Bedingungen und Maldi-Messungen in DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) führten nach mehreren Versuchen schließlich und in Übereinstimmung zueinander zu einer Masse von 376,1 g/mol.

Durch Strukturüberlegungen zum Ausgangsmolekül von MH163 ergab sich die Vermutung, dass es zu einer Umlagerung zu einem Coumarin-Derivat gekommen sein könnte. Die gefundene Masse (376,1 g/mol) entspricht der exakten Masse (376,13 g/mol) des unten gezeigten vermuteten Coumarinderivates (Abb.26).

Eine Strukturumwandlung von einer Zimtsäure zu einem Coumarinderivat wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Lediglich die Koexistenz in den diversen Zimtarten wurde nachgewiesen. Dabei zeigten günstigere asiatische Zimtarten, auch als Cassia bekannt (z.B. *Cinnamomum burmannii* aus Indonesien) höhere Coumaringehalte [168], welche eventuell aus den dortigen klimatischen Bedingungen resultieren könnten. Die hier vorgeschlagene Umlagerungsreaktion könnte aber auch während günstiger Trocknungsprozesse des Zimts im Sonnenlicht stattgefunden haben.

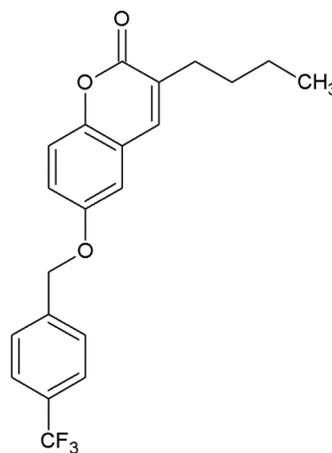


Abb. 26: Mögliches Coumarinderivat nach Umlagerungsreaktion von MH163 im Sonnenlicht

Der Umlagerungsprozess könnte nach dem potentiellen Mechanismus stattfinden, der in Abb. 27 dargestellt ist. Unter kurzzeitiger Aufhebung der Aromatizität, eventuell durch die Energiezufuhr in Form des Lichtes, kommt es zum Ringschluss. Durch Abspaltung der Seitenkette (R) und der Re-Aromatisierung des Zwischenzustandes bildet sich das

Coumarinderivat. Ob andere Energieformen, wie Erwärmung die Reaktion ebenfalls auslösen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

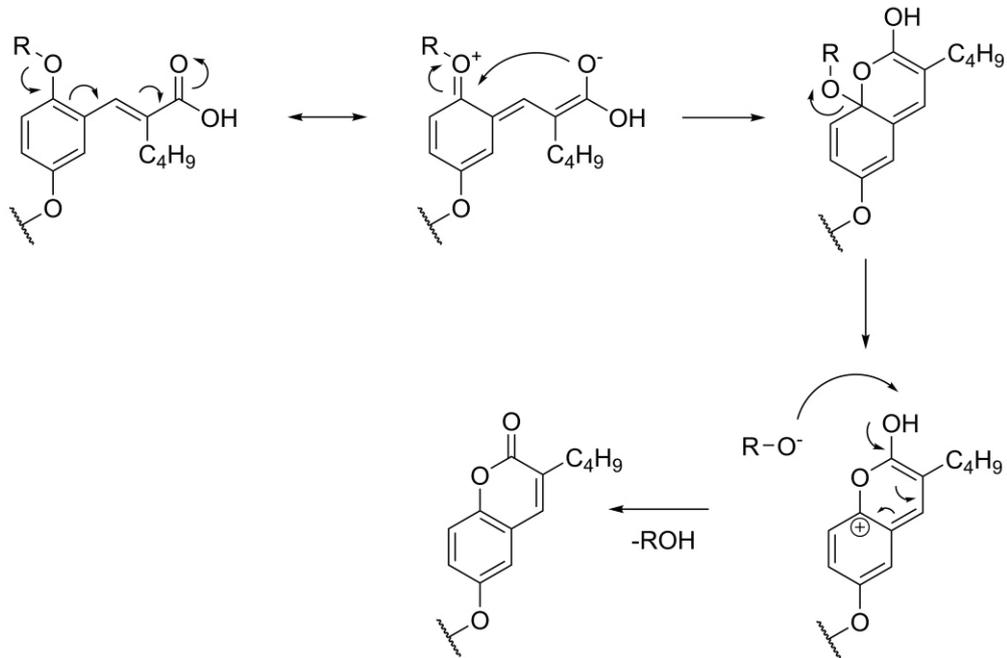


Abb. 27: Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung des Coumarin-Derivates, als mögliches Umlagerungsprodukt von MH163

Zur Identitätsaufklärung des Umlagerungsproduktes wurden, neben den massenspektrometrischen Untersuchungen, ^1H und ^{13}C -NMR-Spektren der unbekanntenen Verbindung aufgenommen und mit den Spektren von frisch gelöstem MH163 verglichen. Zusätzlich wurden NMR Spektren für das vermutete Coumarin-Derivat simuliert.

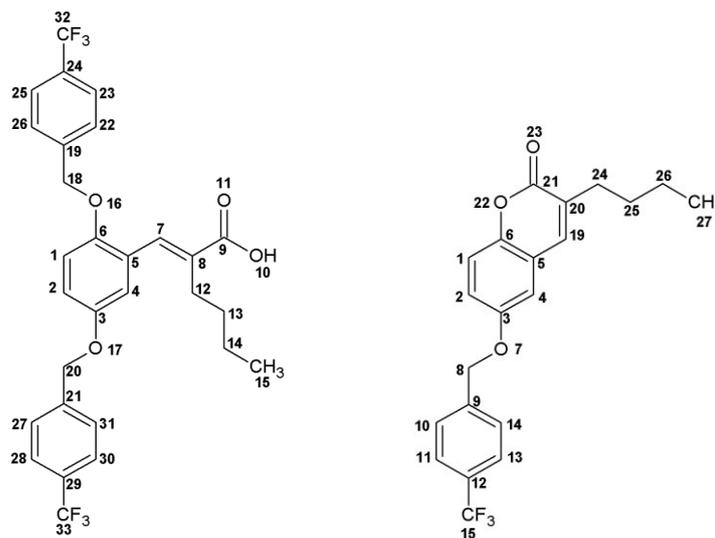


Abb. 28: Nummerierung der Atome von MH163 und des Coumarinderivates für die Auswertung der NMR-Spektren

Der Vergleich der ^1H -Spektren von unbelichteter Probe und des isolierten Umlagerungsproduktes zeigte folgende Unterschiede: Das Integral des Singulett der Protonen an Position 18 und 20 im MH163 Molekül mit einer chemischen Verschiebung von 5,23 ppm (unbelichtet) bzw. an Position 8 im Coumarinderivat bei 5,28 ppm verringert sich von 4 auf 2 Protonen. Durch die zwei vorhandenen Seitenketten an O16 und O17 im MH163 Molekül ergeben sich in der unbelichteten Probe 2 x 2 Protonen an C18 und C20. Bei der isolierten Umlagerungsstruktur sind nur noch zwei dieser Protonen an C8 nachzuweisen, was für die Abspaltung einer der Seitenketten spricht.

Im aromatischen Bereich kommt es ebenfalls zu Veränderungen. Das charakteristische Dublett bei einer chemischen Verschiebung von 6,90 ppm verschwindet. Dafür findet sich bei 7,34 ppm ein deutlich verschobenes Triplett. Dies spricht für eine erhöhte chemische Abschirmung des Protons an Position 4, welches sich durch das neue annelierte System, ergeben könnte.

Um zu bestätigen, dass es während der Umlagerung zu einem Ringschluss kommt, wurden 2D NMR Spektren aufgenommen und ausgewertet. Diese Auswertungen führten zu einer schlüssigen Zuordnung der Signale in den ^{13}C Spektren. Die signifikantesten Verschiebungen der Signale sind in Abb.28, durch eine Überlagerung der ^{13}C Spektren zwischen frisch gelöstem, unbelichtetem MH163 (blaues Spektrum) und dem isoliertem Umlagerungsprodukt (rotes-schwarzes Spektrum), dargestellt.

Das Signal des Kohlenstoffatom C7 aus MH163 Molekül verschiebt sich aufgrund einer größeren Abschirmung zu größeren chemischen Verschiebungen. Auch die Position vom C6-Signal verschiebt sich zu größeren ppm. Das Signal des Kohlenstoffatoms der Säuregruppe verschiebt sich im Gegenzug dazu zu kleineren chemischen Verschiebungen. All diese Veränderungen sprechen für eine neue chemische Umgebung an den beteiligten C-Atomen, die aus einem Ringschluss resultieren kann.

Die Auswertung der NMR Spektren unterstützt somit die Theorie, dass sich das vorgeschlagene Coumarinderivat gebildet hat.

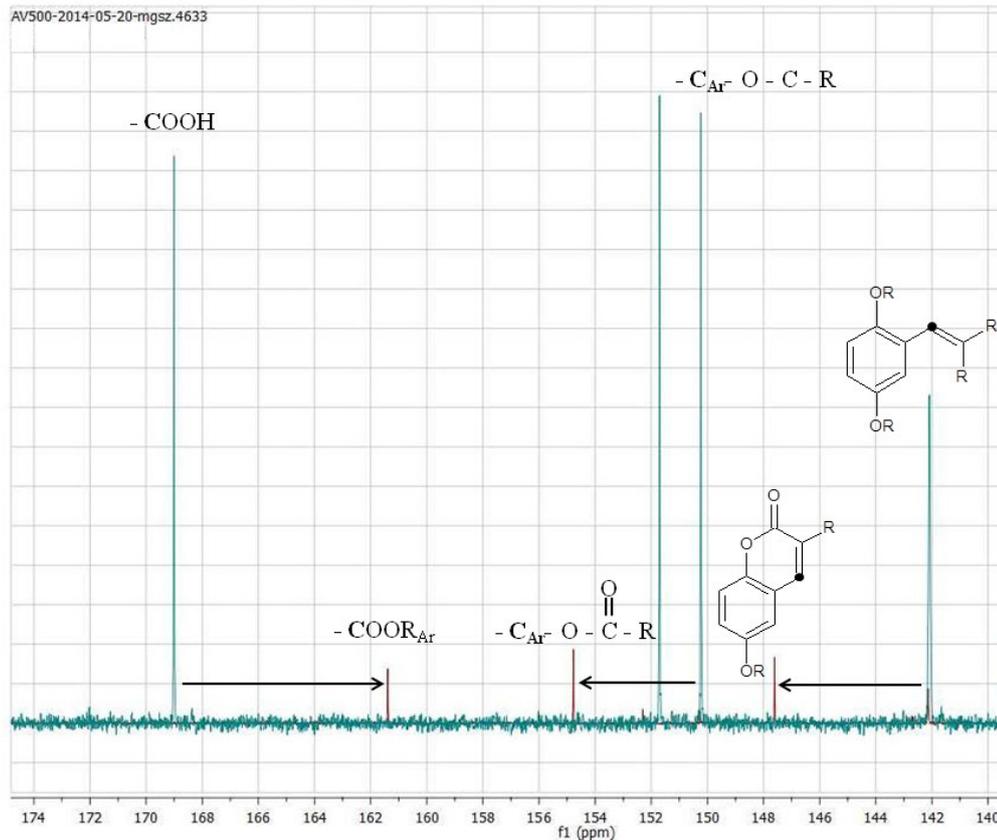


Abb. 29: Überlagerte ^{13}C -NMR Spektren von unbelichtetem MH163 (blaues Spektrum) und dem isolierten Umlagerungsprodukt nach einmonatiger Belichtung einer methanolischen MH163 Lösung (rotes Spektrum)

Die in den simulierten Spektren gezeigten Signale konnten alle, mit leichten Abweichungen in der chemischen Verschiebung, in den gemessenen Spektren wiedergefunden werden.

Zusätzlich existieren jedoch weitere Signale in den gemessenen NMR Spektren, die deutlich kleinere Intensitäten, als die eindeutig zuzuordnenden Signale, aufweisen. Woher diese Signale stammen konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Eine Vermutung ist, dass es auch an der entsprechenden Doppelbindung der Coumarine, zwischen C19 und C20, zu einer Dimerisierung kommen kann. Diese Dimere wären chromatographisch wiederum nicht vom Monomer trennbar und könnten somit, analog zu den Dimeren des Zimtsäurederivates MH163, in der isolierten Fraktion nach der NP-Säulenchromatographie enthalten sein und zu den zusätzlichen schwachen NMR Signalen führen. Aus diesem Grund wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um zu überprüfen ob es Erkenntnisse darüber gibt, ob auch Coumarin-Derivate an der erwähnten Doppelbindung dimerisieren können.

Die Literaturrecherche bestätigte die Vermutung zur photoinduzierten Dimerisierung von Coumarin-Derivaten [169]. Die entsprechende Masse konnte jedoch nicht in den, ohnehin

schwierig zu erhaltenen, Massenspektren gezeigt werden. Eine Ursache für die vielen kleinen, zusätzlichen Signale könnte eine mögliche Fragmentierung bei der Ionisierung im Massenspektrometer sein. Eventuell kann das Dimer, aufgrund schlechter Flugfähigkeiten, nicht mit dem verwendeten Massenanalysator detektiert werden. Die Instabilität des Moleküls könnte ebenfalls Ursache für die zusätzlichen NMR-Signale sein.

Die, aufgrund der Masse stattgefundenen Strukturüberlegung, die zum beschriebenen Coumarinderivat geführt hat, konnte durch NMR-spektrometrische Untersuchungen zusätzlich gestützt werden. Dass es sich um ein anderes Molekül handelt, welches eine identische, exakte Masse aufweist, sich ebenfalls chemisch vom Ausgangsmolekül MH163 ableiten lässt, aber eine andere Struktur aufweist, ist sehr unwahrscheinlich.

VII.5 Diskussion der Methodenentwicklung für MH163

Aufgrund der Erstellung von ersten Kalibriergeraden aus einer frisch bereiteten Stammlösung fielen die Instabilitäten zunächst nicht auf. Es konnte eine LC-MS-Methode entwickelt werden, die ausreichend empfindlich war. Der Vergleich erneuter Injektionen zwischen erster Messung und einer weiteren Messung nach 24 h zeigte Auffälligkeiten bezüglich einer deutlich geringeren Intensität der Signale und der Aufspaltung des Signals in zwei Peaks. Diese Veränderungen wurden anschließend ausgiebig untersucht.

Da die zwei Peaks, auf der gleichen Massenspur detektiert werden konnten musste es sich um eine veränderte Form des Moleküls mit der gleichen Masse handeln. Die E/Z-Isomerisierung an der Doppelbindung der Zimtsäuregruppe stellt demnach die wahrscheinlichste Ursache dafür dar.

Versuche beide Peaks durch eine fehlende Basislinientrennung gemeinsam zu integrieren um den Gehalt beider Moleküle zu erhalten und somit zumindest eine Quantifizierung der Gesamtmenge zu ermöglichen schlugen fehl, da das Gesamtintegral beider Isomere zusätzlich mit der Zeit abnahm. Es musste demnach noch ein weiterer Prozess in den untersuchten Lösungen stattfinden. Eine Literaturrecherche ergab den Hinweis auf einen photoinduzierten Dimerisierungs-Effekt von Zimtsäuren. Da auch die E/Z-Isomerisierung durch die Einwirkung von Licht beschleunigt wird, wurde eine Lösung mit 1 mg/mL MH163 in Methanol für einen Monat dem Tageslicht ausgesetzt um eine möglichst vollständige Umsetzung von MH163 in die vermuteten Umlagerungsprodukte zu erhalten.

Durch präparative chromatische Trennung wurden drei verschiedene Fraktionen erhalten und analysiert. Zwei Fraktionen führten zu einer identischen Masse. Diese Masse gehört zu den beiden Isomeren von MH163. In beiden Fraktionen konnten auch die Dimere von MH163 nachgewiesen werden. Ob diese, wie in der Literatur beschrieben bereits im Feststoff vor dem Lösen vorhanden waren, durch die Reaktion der Substanz in der belichteten Lösung auftrat oder einfach das Ergebnis des Ionisierungsprozesses bei der Massendetektion war, ist ungewiss.

Es wurde deutlich, dass die dritte Fraktion nicht einem Dimer von MH163 zugeordnet werden konnte. Die erhaltene Masse und eine davon ausgehende Strukturüberlegung führten zu einem wahrscheinlichen Coumarinderivat. NMR-spektrometrische Untersuchungen konnten den aufgezeigten Strukturvorschlag bekräftigen.

Aufgrund der kurzen Zeiten, die zum Abbau von MH163 führen ist es nicht eindeutig auszuschließen, dass die positiven *in vitro* Effekte auch von den Umlagerungsprodukten resultieren können bzw. es ist unklar welche der vorliegenden Formen das Testergebnis ausgelöst hat.

Eine valide Quantifizierung von MH163, die die Richtlinien der FDA Guideline erfüllt, ist in den sehr kurzen Zeitintervallen unter keinen Umständen denkbar.

In allen *in vitro* Testsystemen wurde eine starke Zelltoxizität von MH163 bei höheren Konzentrationen beschrieben. Diese könnte aus dem entstehenden Coumarinderivat resultieren, da eine Toxizität von manchen Vertretern dieser Substanzklasse auch im Menschen in der Literatur ausführlich beschrieben wird [170], [171], [172].

Aus all diesen Gründen schied die Verbindung MH163 aus der weiteren Methodenentwicklung und -Validierung aus und geplante *in vivo* Tierstudien wurden abgesagt.

VIII Zusammenfassung der vorliegenden Gesamtarbeit

Mit einer immer weiter steigenden Lebenserwartung, steigt auch die Anzahl der an Alzheimer erkrankten Patienten stetig an. Die Kosten für die Versorgung dieser Patienten sind für das Gesundheitssystem weltweit immens.

Bislang führten alle Therapiebemühungen zu mangelhaften Erfolgen. Die zurzeit zugelassenen Medikamente, die Acetylcholinesterase-Hemmer Donepezil, Rivastigmin und Galantamin und der Glutamat-Rezeptorantagonist Memantin, dienen ausschließlich der Behandlung der Symptome. Ein medikamentöses Eingreifen in den Krankheitsverlauf und die Beeinflussung der auslösenden Faktoren konnte, trotz eines hohen Forschungsaufwandes bislang nicht realisiert werden. Eine möglichst frühzeitige Therapie hat sich jedoch als essentiell herauskristallisiert. Vielversprechende neue Wirkstoffe konnten demnach im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf keine Wirkung zeigen. Die Entwicklung einer frühzeitigen Diagnosemöglichkeit ist demnach von enormer Bedeutung.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der quantitativen analytischen Charakterisierung zweier Substanzen, die sich auf drei relevante Bereiche auswirken, die für die Entwicklung und das Fortschreiten der Alzheimer Krankheit verantwortlich gemacht werden. Die γ -Sekretase, die an der Entstehung der toxischen A β -Peptide beteiligt ist, die dann durch Agglomerisierung zu den charakteristischen pathologischen A β -Plaques führen. Der nukleäre Rezeptor PPAR γ , welcher an der Genexpression vor allem inflammatorischer Faktoren im Gehirn beteiligt ist und weitere AD relevante Vorgänge wie den Abbau der A β -Peptide beeinflusst. Und schließlich die mitochondriale Dysfunktion, die zur verringerten Energieversorgung der Neuronen und schließlich zum Untergang von Synapsen und ganzer Neuronen führen kann. Diese drei Bereiche konnten *in vitro* durch die zwei untersuchten Substanzen MH84, einem Pirinixinsäurederivat und MH163, einem Zimstsäurederivat, positiv beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurden *in vivo* Studien zu beiden Verbindungen an Mäusen geplant, die die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Substanzen untersuchen sollten.

Im Vorfeld dieser Studien wurden analytische Methoden entwickelt um die Substanzen aus den biologischen Proben bestimmen zu können. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf einer besonders hohen Empfindlichkeit um auch sehr kleine Konzentrationen, die sich im Hirngewebe der Tiere ergeben können, zweifelsfrei bestimmen zu können.

Diese Anforderung wurde gestellt, da die Substanzen auf ihre ZNS Bioverfügbarkeit getestet werden sollten. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranken ist von essentieller Bedeutung für Substanzen, die bei Alzheimer wirken sollen. Dies haben gescheiterte Therapiebemühungen zu den Wirkstoffen Rosiglitazon und Pioglitazon gezeigt, die aufgrund der geringen ZNS-Konzentrationen zu keinen signifikanten Verbesserungen der AD Symptomatik führten.

Die Entwicklung der Analytik-Methode für MH84 führte zu einer validen LC-MS-Methode. Dabei wurde eine MultoHigh 100 RP 18-5 μ , 125 x 4 mm HPLC Säule verwendet. Die Trennung erfolgte isokratisch mit einer Flussrate von 1 mL/min und einer Fließmittelzusammensetzung von 89% Methanol und 11% Ameisensäure (0,1%). Die Detektion erfolgte über ein MicroTOF-QII Massenspektrometer unter Verwendung einer APCI-Quelle zur Ionisierung von MH84.

Bei einem Injektionsvolumen von 100 μ L zur Analyse von aufgearbeiteten Hirnproben ergab sich ein LOQ von 0,76 ng/mL und ein LOD von 0,23 ng/mL. Aufgrund der höheren erwarteten Konzentrationen im Plasma wurde für die Entwicklung der Methode für die Plasmaaufarbeitung zur Schonung der LC-MS Anlage ein Injektionsvolumen von 50 μ L festgelegt. Der LOQ lag bei diesen Messungen bei 1,44 ng/mL und der LOD bei 0,43 ng/mL. Die Probenaufarbeitung aus dem Plasma und Hirnhomogenat erfolgte mit Hilfe einer Flüssig-Flüssig-Extraktion an der Festphase, nach vorheriger Proteinfällung mit Aceton.

Die entwickelte, empfindliche Methode für die Quantifizierung von MH84 wurde anschließend nach der FDA Guideline für bioanalytische Methodenentwicklung validiert. Für sämtliche Untersuchungen wurden Kalibriergeraden in den Matrices verwendet, um Matrix-Einflüsse auf die Ergebnisse ausschließen zu können.

Aufgrund von einer nicht ausreichenden Menge an Leermatrix der Maus, die für die Validierung zur Verfügung stehen muss, wurden Ersatzmatrices verwendet. Anstelle von Mausplasma wurde Rattenplasma verwendet und anstelle von Mäusehirn konnte die Validierung mit einem Homogenat aus Schweinehirn durchgeführt werden. Dieses Ausweichverfahren wurde durch eine Crossvalidierung auf dessen uneingeschränkte Eignung untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Matrices festgestellt werden.

Alle Validierungsparameter bezüglich der Stabilität von MH84 und der messtechnischen Parameter der analytischen Methode inklusive der Probenaufarbeitung, konnten den Anforderungen der FDA Guideline nach einer maximalen Abweichung des Analyseergebnisses von 15% vom wahren Wert gerecht werden.

Die validierte Analytik-Methode konnte anschließend für die Quantifizierung von MH84 aus dem Plasma und dem Hirn der Mäuse aus einer Pharmakokinetik-Studie verwendet werden. Dabei wurde den Tieren einmalig 12 mg/Kg MH84 in PEG400 mittels Schlundsonde oral verabreicht. Pro untersuchtem Zeitpunkt wurden 6 Tiere verwendet um das gesamte pharmakokinetische Profil zwischen 0,5 h und 48 h ausreichend genau zu bestimmen. MH84 ist oral verfügbar und gelangt sehr schnell ins Blut. Die maximale Plasma-Konzentration lag bei 10,90 µg/mL und wurde nach drei Stunden erreicht. Im Gehirn stieg die Konzentration ebenfalls schnell an aber blieb in einem Zeitbereich zwischen 1,5 und 6 Stunden nahezu konstant. Die maximale Konzentration in diesem Zeitraum lag bei 320,64 ng/g. Während die Konzentration von MH84 relativ schnell im Blut abnimmt und nach 12 h nur noch weniger als 20% der maximalen Menge nachgewiesen werden konnten, verlief die Konzentrationsabnahme im Gehirn deutlich zeitverzögert. Nach 12 h konnten noch ca. 75% des maximal bestimmten MH84 quantifiziert werden. Dieses veränderte pharmakokinetische Verhalten beweist die ZNS-Gängigkeit von MH84.

Aufgrund geringer Mengen an MH84, die nach 24h noch im ZNS nachweisbar waren, wurde eine ZNS-Akkumulationsstudie durchgeführt um eventuelle Anreicherungseffekte bei 3-wöchiger, täglicher Gabe von 12 mg/Kg zu untersuchen. Es konnte jedoch keine Anreicherung gezeigt werden, da die bestimmten Konzentrationen nach den drei Wochen im vergleichbaren Bereich zur Pharmakokinetik-Studie lagen.

In zwei 3-wöchigen pharmakodynamischen Studien an transgenen, Thy1-APP_{SL} Mäusen wurde die Wirksamkeit von MH84 bezüglich des verwendeten Krankheitsmodells untersucht. In beiden Studien konnte eine geringe Tendenz bezüglich der Verringerung der A β -Spiegel durch MH84 gezeigt werden.

Zusätzlich wurden in diesen Studien Parameter untersucht, die die Funktion der Mitochondrien charakterisieren. Diese Parameter waren das mitochondriale Membranpotential (MMP), die ATP-Spiegel und die Aktivität der einzelnen Komplexe der Atmungskette. In beiden Studien konnten diese Parameter im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrolltieren vollständig wieder hergestellt werden.

Die Methodenentwicklung der zweiten, ausgewählten Substanz MH163 konnte ebenfalls mit Hilfe der MultoHigh 100 RP 18-5 μ , 125 x 4 mm HPLC Säule durchgeführt werden. Ein isokratisches Fließmittelgemisch von 88,5% Methanol und 11,5% Ameisensäure (0,1%) führte bei einer Flussrate von 1 mL/min zu einer Retentionszeit, die mögliche Matrix-Reste nach der Probenaufarbeitung vom MH163-Peak abtrennt und eine Basislinientrennung zum ausgewählten internen Standard DF22 ermöglicht. Als Detektor wurde wiederum das MicroTOF-QII Massenspektrometer unter Verwendung einer APCI-Quelle zur Ionisierung verwendet.

Die Empfindlichkeit der neuen Methode lag mit einem Injektionsvolumen von 50 μ L bei einem LOQ von 1,1 ng/mL und einem LOD von 0,3 ng/mL. Leider konnte diese Empfindlichkeit nur unter Verwendung von frisch gelöstem Analyten bestimmt werden. Nach kurzer Zeit kam es unter Lichteinfluss zur E/Z-Isomerisierung und somit zu zwei verschiedenen MH163 Peaks. Der neu entstandene Peak des Z-Isomers koeluierte mit dem internen Standard. Ein Versuch die Quantifizierung über das Gesamtintegral beider Peaks zu ermöglichen schlug fehl, da sich dieses zusätzlich zeitabhängig abnahm.

Eine Literaturrecherche führte zu der Vermutung, dass sich photo-induzierte Dimere der Zimtsäure gebildet haben könnten. Eine Untersuchung der abgetrennten, unbekanntes Fraktion konnte jedoch zeigen, dass diese nicht aus den vermuteten Dimeren bestand. Stattdessen konnten die Massen der Dimere in den Fraktionen der Monomere der E/Z-Isomere nachgewiesen werden.

Die Masse des unbekanntes Umlagerungsproduktes konnte durch schonende Parameter bei der ESI- und Maldi-messung bestimmt werden. Ausgehend vom MH163-Molekül wurden Strukturüberlegungen unternommen, die zu einem Molekül mit der identifizierten Masse geführt haben könnten. Ein Coumarinderivat wies die exakte Masse auf und konnte durch NMR-spektrometrische Untersuchungen als wahrscheinliches Umlagerungsprodukt identifiziert werden.

Viele verschiedene Moleküle könnten also während der *in vitro* Testungen ausgehend von MH163 vorgelegen haben und die Effekte in den Testsystemen verursacht haben. Eine valide Quantifizierung von MH163 in einem für die Probenaufarbeitung und –messung benötigten Zeitrahmen ist nicht möglich, da die Umlagerung bereits innerhalb der ersten 5 Stunden nach der Herstellung zu einem Verlust von etwa 23% der Menge an MH163 führt.

Die nachgewiesenen Stabilitätsprobleme führten schließlich zu einer Aufgabe der weiteren Methodenentwicklung und –validierung sowie zu einer Verwerfung der geplanten *in vivo* Tierstudien zu MH163.

IX Anhang

IX.1 Abkürzungen

$\alpha 7nChR$	$\alpha 7$ nikotinischer Acetylcholinrezeptor
Abb.	Abbildung
ABCA1	ATP-Binding Cassette A1
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer's Disease
ADP	Adenosin-Diphosphat
AICD	APP-intrazelluläre Domäne
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APH-1	Anterior Pharynx-Defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid- β Precursor Protein
ATP	Adenosin-Triphosphat
AUC	Area under the curve
BACE1	beta-site APP cleaving enzyme 1
CaMK-II	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
CBP	CREB Binding Protein
Cdk5	Cyclin-abhängige (dependent) Kinase 5
CTF _(α, β)	Carboxyterminales Fragment
C_{max}	maximale Konzentration
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CypD	Cyclophilin D
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Drp1/Dlp1	Dynamamin-related/like Protein 1
EC ₅₀	Konzentration bei der eine halbmaximale Aktivierung stattfindet
EE	Essigester
EIC	extracted ion chromatogram
ER	endoplasmatisches Reticulum

ESI	Electrospray Ionization
EtAc	Ethylacetat
E/Z-Isomerisierung	E bedeutet entgegen stehend , Z zusammen stehend
FDA	Food and Drug Administration
Fis1	Fission 1 Protein
GSI	Gamma Sekretase Inhibitor
GSK-3 β	Glycogen-Synthase-Kinase 3 β
GSM	Gamma Sekretase Modulator
GTPase	Guanosintriphosphat bindendes Protein
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein, entspricht GTPase
HCl _{conc}	konzentrierte Salzsäure
HEK-293	Human Embryonic Kidney- Zelllinie
Hex	Hexan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Konzentration bei der eine halbmaximale Inhibierung stattfindet
IDE	Insuling-Degrading Enzyme
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IS	Interner Standard
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
KGDH	α - Ketoglutarat-Dehydrogenase
Konz.	Konzentration
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LXR	Liver X Rezeptor
MAM	Mitochondrien-assozierten ER-Membran
MAP	Mikrotubuli-assoziertes Protein
MeOH	Methanol
Mfn1,2	Mitofusin 1,2
Miro	Mitochondrial Rho GTPase
MMP	Mitochondriales Membranpotential
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
MS/MS	Kopplung zweier Massenanalysatoren zur Fragmentierung

mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis, beschreibt die Massenspur
N-CoR	Nuclear receptor Corepressor
NCT	Nicastrin
NFκB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NFT	Neurofibrillary Tangle
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Sickstoffmonoxid
NP	Normal-Phase
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
Opal	Optic Atrophy 1
PBP	PPAR-Bindendes Protein
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEG400	Polyethylenglycol 400
PEN-2	Presenilin Enhancer 2
PGC-1α	PPARγ Coaktivator 1α
PhDyn	Pharmakodynamik
PHF	Paired Helical Filament
PhKin	Pharmakokinetik
PKA	Protein Kinase A
PP(1, 2A, 2B, 5)	Protein Phosphatase 1, 2A, 2B, 5
PPAR(α,γ,δ)	Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PS	Presenilin
QCs	Qualitätskontroll-Proben
R ²	Korrelationskoeffizient
ROS	Reactive Oxygen Spezies
RP	Reverse-Phase
rpm	rounds per minute
RSD	Relative Standard Deviation
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Rezeptor
SD	Standard Deviation

SF	Straight Filament
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor
SNP	Sodium Nitroprusside
SOD	Superoxiddismutase
SRC1	Steroid-Rezeptor Coaktivator
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time-of-Flight
TOM	Translocase of the Outer Membrane
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZDs	Thiazolidinedione
UV	Ultra Violett
VIS	Visible, sichtbar
Vpp	Differenz zwischen pos. und neg. Spitzenspannung (Peak to Peak)
wtAPP	wildtyp-APP
ZNS	Zentrales Nervensystem

IX.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bedeutung der (bio-) analytischen Untersuchungen im Gesamtprozess der universitären Wirkstoffentwicklung zum Krankheitsbild von Morbus Alzheimer, phKin = Pharmakokinetik, PhDyn = Pharmakodynamik.....	7
Abb. 2: MH84, ausgewähltes Pirinixinsäurederivat für <i>in vivo</i> Studien	10
Abb. 3: MH163, ausgewähltes Zimtsäurederivat für <i>in vivo</i> Studien	10
Abb. 4: Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg der APP-Prozessierung, nach [13]	12
Abb. 5: Auswahl bislang untersuchter γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) und γ -Sekretase-Modulatoren (GSM).....	15
Abb. 6: Genexpression durch die Aktivierung von PPAR, nach [46].....	16
Abb. 7: NSAIDs und TZDs mit PPAR γ -agonistischen Eigenschaften	18
Abb. 8: Störung der Stabilität der Mikrotubuli durch hyperphosphoryliertes Tau [105].....	22
Abb. 9: Mitochondriale Atmungskette, nach [126]	25
Abb. 10: Dynamische Fusion- (a) und Fission-Prozesse (b) der Mitochondrien [131]	26
Abb. 11: Übersicht über die Ionisierungsvorgänge in der ESI- (links) und APCI-Quelle (rechts), nach [162]....	34
Abb. 12: Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers (Abb. nach Bruker)	35
Abb. 13: Vergleich zwischen dem UV Chromatogramm und dem Chromatogramm der Massenspur von MH84 (m/z = 603.2) nach APCI-Parameteroptimierung, c = 20 ng/mL; der Peak bei 5,5 min stammt von MH41 (UV-Signal vom IS, Massenspur nicht eingeblendet).....	36
Abb. 14: Kommerzielle Substanzen, die auf ihre Eignung als IS für die MH84-Methode untersucht wurden	39
Abb. 15: Strukturell ähnliche Substanzen für die Testung als IS der MH84-Methode.....	41
Abb. 16: Empfindlichkeitsvorteil für MH84 im Vergleich zu MH41 (IS), beide Substanzen mit gleicher Konzentration c = 100 ng/mL in aufgearbeiteter Hirnmatrix (Injektionsvolumen: 100 μ L)	44
Abb. 17: Ablaufschema der Probenaufarbeitung von MH84 aus Plasma und Hirnhomogenat	48
Abb. 18: Quadratische Kalibrierfunktion zu Beginn der Methodenentwicklung für MH84.....	50
Abb. 19: Leichte Verbesserung der Linearität der Kalibrierfunktion von MH84	50
Abb. 20: Optimierte Kalibriergeraden aus der entsprechenden Matrix; links: 2 – 25 ng/mL im Hirnhomogenat, rechts: 20 – 250 ng/mL im Plasma	51
Abb. 21: Pharmakokinetische Profile von MH84 in Plasma und Hirngewebe nach Einmalgabe von MH84 (12 mg/Kg)	70
Abb. 22: Interne Standards für die Testung auf Eignung für die MH163 Analytik-Methode.....	75
Abb. 23: Isomerisierungsverlauf von MH163 in einem Braunglasvial im Autosampler; im Tageslicht wird der hier gezeigte Zustand nach 24 h bereits nach 5 h erreicht; alle Signale zeigen die Massenspur m/z = 551,2	77
Abb. 24: Zeitlicher Gehaltsverlust von MH163 im analytisch kritischen Zeitfenster von 5 h, gemessen anhand des Gesamtintegrals des E- und Z-Isomers	79
Abb. 25: Vergleich zweier DCs von MH163-Lösungen, links: frisch gelöst; rechts: nach 1-monatiger Belichtung im Tageslicht	80
Abb. 26: Mögliches Coumarinderivat nach Umlagerungsreaktion von MH163 im Sonnenlicht	81
Abb. 27: Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung des Coumarin-Derivates, als mögliches Umlagerungsprodukt von MH163	82

Abb. 28: Nummerierung der Atome von MH163 und des Coumarinderivates für die Auswertung der NMR-Spektren.....	82
Abb. 29: Überlagerte ¹³ C-NMR Spektren von unbelichtetem MH163 (blaues Spektrum) und dem isolierten Umlagerungsprodukt nach einmonatiger Belichtung einer methanolischen MH163 Lösung (rotes Spektrum) ...	84

IX.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die <i>in vitro</i> Daten von vorausgewählten Kandidaten für potentielle <i>in vivo</i> Studien	9
Tab. 2: Übersicht über Tau-regulierende Therapieansätze in der klinischen Entwicklung	24
Tab. 3: Ausgangsparameter der APCI für die MH84-Methode.....	42
Tab. 4: Optimierung der APCI-Parameter für die MH84 Analytik-Methode.....	42
Tab. 5: Optimierte Einstellung des Massenspektrometers für die MH84-Methode	43
Tab. 6: Zusammenfassung der optimierten APCI-MS-Parameter für MH84	43
Tab. 7: Endgültige APCI-MS-Bedingungen zur Durchführung der Methodvalidierung und zur Auswertung der präklinischen Tierstudien von MH84	44
Tab. 8: Nachweisgrenzen für MH84 aus Plasma und Hirnhomogenat; links: LOQ, rechts: LOD; abs. = absolut in der Messlösung enthaltene Menge nach der Aufarbeitung, Hochrechnung pro mL Plasma und g Hirn	51
Tab. 9: Stabilität von MH84 in 50%igem Methanol (c = 5, 100, 200 ng/mL) nach 24 und 48 h	52
Tab. 10: Stabilität der DMSO-Stammlösungen von MH84 (c = 250 µg/mL) für 1 und 2 Monate.....	53
Tab. 11: Stabilität der QCs nach Aufarbeitung von MH84 aus Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL).....	54
Tab. 12: Stabilität der QCs nach Aufarbeitung von MH84 aus Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)	55
Tab. 13: Ergebnisse der Langzeitstabilität für MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)	56
Tab. 14: Ergebnisse der Langzeitstabilität für MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL).....	57
Tab. 15: Ergebnisse der Auftaustabilität von MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL).....	58
Tab. 16: Ergebnisse der Auftaustabilität von MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL)	58
Tab. 17: Übersicht der Untersuchungen zur Stabilität von MH84	59
Tab. 18: Ergebnisse des Intraday-Assay für MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)	60
Tab. 19: Ergebnisse des Intraday-Assay für MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL).....	61
Tab. 20: Ergebnisse des Interday-Assay für MH84 aus dem Plasma (c = 20, 100, 200 ng/mL)	62
Tab. 21: Ergebnisse des Interday-Assay für MH84 aus dem Hirnhomogenat (c = 5, 20, 100 ng/mL).....	62
Tab. 22: Zusammenfassung der Richtigkeits- und Präzisionsbestimmungen in Plasma und Hirnhomogenat	63
Tab. 23: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindung aus Plasma (c = 20, 100 und 200 ng/mL)	64
Tab. 24: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindung aus Hirnhomogenat (c = 5, 20 und 100 ng/mL).....	65
Tab. 25: Ergebnisse der Crossvalidierung zwischen Maus- und Rattenplasma (links) und Maus- und Schweinehirn (rechts).....	66
Tab. 26: Einzelergebnisse der Pharmakokinetik-Studie von MH84 an gesunden C57Bl/6JRj-Mäusen.....	68
Tab. 27: Pharmakokinetische Parameter von MH84 in Mäuseplasma	70
Tab. 28: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung nach 21 tägiger Gabe von MH84 (12 mg/Kg/Tag), inkl. Körper- und Hirngewichten der Mäuse nach Beendigung der Tierstudie.....	71

Tab. 29: Ausgangsparameter der APCI-Methode für MH163 im negativ-Modus 76
Tab. 30: Parameteroptimierung der MH163 APCI-Methode im positiv-Modus 78
Tab. 31: Zusammenfassung der optimierten APCI-MS-Parameter für MH163 78

IX.4 Literaturverzeichnis

- [1] G.S. Bloom, Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis, *JAMA Neurol* 71 (2014) 505–508.
- [2] X. Zhang, W. Song, The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation, *Alzheimers Res Ther* 5 (2013) 46.
- [3] W. Zhou, W. Hu, Anti-neuroinflammatory agents for the treatment of Alzheimer's disease, *Future Med Chem* 5 (2013) 1559–1571.
- [4] V. García-Escudero, P. Martín-Maestro, G. Perry, J. Avila, Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease, *Oxid Med Cell Longev* 2013 (2013) 162152.
- [5] FDA Guideline, www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf.
- [6] S.H. Eckert, J. Eckmann, K. Renner, G.P. Eckert, K. Leuner, W.E. Müller, Dimebon ameliorates amyloid- β induced impairments of mitochondrial form and function, *J. Alzheimers Dis.* 31 (2012) 21–32.
- [7] C. Stockburger, V.A.M. Gold, T. Pallas, N. Kolesova, D. Miano, K. Leuner, W.E. Müller, A Cell Model for the Initial Phase of Sporadic Alzheimer's Disease, *J. Alzheimers Dis.* (2014).
- [8] Y. Yoshiyama, V.M.Y. Lee, J.Q. Trojanowski, Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 84 (2013) 784–795.
- [9] J. Hort, J.T. O'Brien, G. Gainotti, T. Pirttila, B.O. Popescu, I. Rektorova, S. Sorbi, P. Scheltens, EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease, *Eur. J. Neurol.* 17 (2010) 1236–1248.
- [10] X.-L. Li, N. Hu, M.-S. Tan, J.-T. Yu, L. Tan, Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease, *Biomed Res Int* 2014 (2014) 927804.
- [11] A. Serrano-Pozo, M.P. Frosch, E. Masliah, B.T. Hyman, Neuropathological alterations in Alzheimer disease, *Cold Spring Harb Perspect Med* 1 (2011) a006189.
- [12] K.A. Jellinger, C. Bancher, Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update, *J. Neural Transm. Suppl.* 54 (1998) 77–95.
- [13] C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, S. Sisodia, Trafficking and proteolytic processing of APP, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (2012) a006270.
- [14] C. Haass, M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature* 359 (1992) 322–325.
- [15] T.E. Golde, X.D. Cai, M. Shoji, S.G. Younkin, Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APPS linked to familial Alzheimer's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695 (1993) 103–108.
- [16] Y. Gu, H. Misonou, T. Sato, N. Dohmae, K. Takio, Y. Ihara, Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35235–35238.
- [17] F. Zhou, K. Gong, B. Song, T. Ma, T. van Laar, Y. Gong, L. Zhang, The APP intracellular domain (AICD) inhibits Wnt signalling and promotes neurite outgrowth, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1233–1241.
- [18] M.S. Wolfe, W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, D.J. Selkoe, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature* 398 (1999) 513–517.
- [19] A. Weihofen, B. Martoglio, Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 71–78.
- [20] D. Edbauer, E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, C. Haass, Reconstitution of gamma-secretase activity, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 486–488.

- [21] A. Sandberg, L.M. Luheshi, S. Söllvander, T. Pereira de Barros, B. Macao, T.P.J. Knowles, H. Biverstål, C. Lendel, F. Ekholm-Petterson, A. Dubnovitsky, L. Lannfelt, C.M. Dobson, T. Härd, Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 15595–15600.
- [22] R. Roychaudhuri, M. Yang, M.M. Hoshi, D.B. Teplow, Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4749–4753.
- [23] I. Benilova, E. Karran, B. de Strooper, The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 349–357.
- [24] M.D. Kirkitadze, G. Bitan, D.B. Teplow, Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies, *J. Neurosci. Res.* 69 (2002) 567–577.
- [25] N. Suzuki, T.T. Cheung, X.D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, C. Eckman, T.E. Golde, S.G. Younkin, An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants, *Science* 264 (1994) 1336–1340.
- [26] R.E. Tanzi, The genetics of Alzheimer disease, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (2012).
- [27] H. Du, L. Guo, S.S. Yan, Synaptic mitochondrial pathology in Alzheimer's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 1467–1475.
- [28] P.H. Reddy, M.F. Beal, Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease, *Trends Mol Med* 14 (2008) 45–53.
- [29] M. Rapoport, H.N. Dawson, L.I. Binder, M.P. Vitek, A. Ferreira, Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 6364–6369.
- [30] M.A. Chabrier, M. Blurton-Jones, A.A. Agazaryan, J.L. Nerhus, H. Martinez-Coria, F.M. LaFerla, Soluble a β promotes wild-type tau pathology in vivo, *J. Neurosci.* 32 (2012) 17345–17350.
- [31] B. de Strooper, W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, R. Kopan, A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain, *Nature* 398 (1999) 518–522.
- [32] C.J. Crump, S.V. Castro, F. Wang, N. Pozdnyakov, T.E. Ballard, S.S. Sisodia, K.R. Bales, D.S. Johnson, Y.-M. Li, BMS-708,163 targets presenilin and lacks notch-sparing activity, *Biochemistry* 51 (2012) 7209–7211.
- [33] S. Weggen, J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde, E.H. Koo, A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity, *Nature* 414 (2001) 212–216.
- [34] S. Weggen, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, C.U. Pietrzik, V. Ozols, A. Fauq, T.E. Golde, E.H. Koo, Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31831–31837.
- [35] J.L. Eriksen, S.A. Sagi, T.E. Smith, S. Weggen, P. Das, D.C. McLendon, V.V. Ozols, K.W. Jessing, K.H. Zavitz, E.H. Koo, T.E. Golde, NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 440–449.
- [36] M.S. Wolfe, γ -Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 120 Suppl 1 (2012) 89–98.
- [37] T.E. Golde, E.H. Koo, K.M. Felsenstein, B.A. Osborne, L. Miele, γ -Secretase inhibitors and modulators, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 2898–2907.
- [38] C.J. Crump, D.S. Johnson, Y.-M. Li, Development and mechanism of γ -secretase modulators for Alzheimer's disease, *Biochemistry* 52 (2013) 3197–3216.
- [39] C. Nagy, E. Schuck, A. Ishibashi, Y. Nakatani, B. Rege, V. Logovinsky, E2012, a novel gamma-secretase modulator, decreases plasma amyloid-beta (A β) levels in humans, *Alzheimer's & Dementia* 6 (2010) S574.
- [40] Y. Yu, V. Logovinsky, E. Schuck, J. Kaplow, M.-K. Chang, T. Miyagawa, N. Wong, J. Ferry, Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel γ -secretase modulator, E2212, in healthy human subjects, *J Clin Pharmacol* (2013).
- [41] C. Dreyer, G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, W. Wahli, Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, *Cell* 68 (1992) 879–887.

- [42] S. Mandrekar-Colucci, G.E. Landreth, Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease, *Expert Opin. Ther. Targets* 15 (2011) 1085–1097.
- [43] C.N. Palmer, M.H. Hsu, H.J. Griffin, E.F. Johnson, Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 16114–16121.
- [44] N.J. McKenna, B.W. O'Malley, Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators, *Cell* 108 (2002) 465–474.
- [45] J.N. Feige, L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne, W. Wahli, From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 120–159.
- [46] F.A. Monsalve, R.D. Pyarasani, F. Delgado-Lopez, R. Moore-Carrasco, Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases, *Mediators Inflamm.* 2013 (2013) 549627.
- [47] H. Yki-Järvinen, Thiazolidinediones, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1106–1118.
- [48] D.L. Feinstein, A. Spagnolo, C. Akar, G. Weinberg, P. Murphy, V. Gavriluk, C. Dello Russo, Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 177–188.
- [49] C.K. Combs, D.E. Johnson, J.C. Karlo, S.B. Cannady, G.E. Landreth, Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ agonists, *J. Neurosci.* 20 (2000) 558–567.
- [50] B.A. in 't Veld, A. Ruitenber, A. Hofman, L.J. Launer, C.M. van Duijn, T. Stijnen, M.M. Breteler, B.H. Stricker, Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 1515–1521.
- [51] M. Etminan, S. Gill, A. Samii, Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies, *BMJ* 327 (2003) 128.
- [52] F. Landi, M. Cesari, G. Onder, A. Russo, S. Torre, R. Bernabei, Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) use and Alzheimer disease in community-dwelling elderly patients, *Am J Geriatr Psychiatry* 11 (2003) 179–185.
- [53] J. Rogers, L.C. Kirby, S.R. Hempelman, D.L. Berry, P.L. McGeer, A.W. Kaszniak, J. Zalinski, M. Cofield, L. Mansukhani, P. Willson, Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease, *Neurology* 43 (1993) 1609–1611.
- [54] J.B. Rich, D.X. Rasmusson, M.F. Folstein, K.A. Carson, C. Kawas, J. Brandt, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease, *Neurology* 45 (1995) 51–55.
- [55] I.R. Mackenzie, D.G. Munoz, Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging, *Neurology* 50 (1998) 986–990.
- [56] J.M. Lehmann, J.M. Lenhard, B.B. Oliver, G.M. Ringold, S.A. Kliewer, Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3406–3410.
- [57] C. Jiang, A.T. Ting, B. Seed, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature* 391 (1998) 82–86.
- [58] R. Luna-Medina, M. Cortes-Canteli, M. Alonso, A. Santos, A. Martínez, A. Perez-Castillo, Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21453–21462.
- [59] M.T. Heneka, D.L. Feinstein, E. Galea, M. Gleichmann, U. Wüllner, T. Klockgether, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase, *J. Neuroimmunol.* 100 (1999) 156–168.
- [60] N.C. Inestrosa, J.A. Godoy, R.A. Quintanilla, C.S. Koenig, M. Bronfman, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling, *Exp. Cell Res.* 304 (2005) 91–104.
- [61] Z. Cai, Y. Zhao, B. Zhao, Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res* 9 (2012) 864–879.
- [62] M. Medina, J. Avila, New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease, *Expert Opin. Ther. Targets* 18 (2014) 69–77.

- [63] M.T. Heneka, M. Sastre, L. Dumitrescu-Ozimek, A. Hanke, I. Dewachter, C. Kuiperi, K. O'Banion, T. Klockgether, F. van Leuven, G.E. Landreth, Acute treatment with the PPAR γ agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice, *Brain* 128 (2005) 1442–1453.
- [64] M. Sastre, I. Dewachter, G.E. Landreth, T.M. Willson, T. Klockgether, F. van Leuven, M.T. Heneka, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9796–9804.
- [65] M. Sastre, I. Dewachter, S. Rossner, N. Bogdanovic, E. Rosen, P. Borghgraef, B.O. Evert, L. Dumitrescu-Ozimek, D.R. Thal, G. Landreth, J. Walter, T. Klockgether, F. van Leuven, M.T. Heneka, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPAR γ , *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 443–448.
- [66] S. Rossner, M. Sastre, K. Bourne, S.F. Lichtenthaler, Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease, *Prog. Neurobiol.* 79 (2006) 95–111.
- [67] M.T. Heneka, M. Sastre, L. Dumitrescu-Ozimek, I. Dewachter, J. Walter, T. Klockgether, F. van Leuven, Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice, *J Neuroinflammation* 2 (2005) 22.
- [68] M. Yamanaka, T. Ishikawa, A. Griep, D. Axt, M.P. Kummer, M.T. Heneka, PPAR γ /RXR α -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice, *J. Neurosci.* 32 (2012) 17321–17331.
- [69] R.A. Daynes, D.C. Jones, Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 748–759.
- [70] M. Ricote, A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, C.K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* 391 (1998) 79–82.
- [71] L. Arnaud, N.K. Robakis, M.E. Figueiredo-Pereira, It may take inflammation, phosphorylation and ubiquitination to 'tangle' in Alzheimer's disease, *Neurodegener Dis* 3 (2006) 313–319.
- [72] O. Wirths, K. Thelen, H. Breyhan, B. Luzón-Toro, K.-H. Hoffmann, P. Falkai, D. Lütjohann, T.A. Bayer, Decreased plasma cholesterol levels during aging in transgenic mouse models of Alzheimer's disease, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 220–224.
- [73] W.G. Wood, L. Li, W.E. Müller, G.P. Eckert, Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis, *J. Neurochem.* 129 (2014) 559–572.
- [74] C. Reitz, Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease, *Curr Atheroscler Rep* 15 (2013) 307.
- [75] A. Chawla, W.A. Boisvert, C.H. Lee, B.A. Laffitte, Y. Barak, S.B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P.A. Edwards, L.K. Curtiss, R.M. Evans, P. Tontonoz, A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis, *Mol. Cell* 7 (2001) 161–171.
- [76] Q. Xu, A. Bernardo, D. Walker, T. Kanegawa, R.W. Mahley, Y. Huang, Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus, *J. Neurosci.* 26 (2006) 4985–4994.
- [77] R. Deane, A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M.B. Finn, D.M. Holtzman, B.V. Zlokovic, apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 4002–4013.
- [78] D.M. Holtzman, In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology, *J. Mol. Neurosci.* 23 (2004) 247–254.
- [79] S.E. Wahrle, H. Jiang, M. Parsadanian, J. Kim, A. Li, A. Knoten, S. Jain, V. Hirsch-Reinshagen, C.L. Wellington, K.R. Bales, S.M. Paul, D.M. Holtzman, Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 671–682.
- [80] A. Ott, R.P. Stolk, F. van Harskamp, H.A. Pols, A. Hofman, M.M. Breteler, Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study, *Neurology* 53 (1999) 1937–1942.
- [81] L. Frölich, D. Blum-Degen, P. Riederer, S. Hoyer, A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893 (1999) 290–293.
- [82] D.G. Cook, J.B. Leverenz, P.J. McMillan, J.J. Kulstad, S. Ericksen, R.A. Roth, G.D. Schellenberg, L.-W. Jin, K.S. Kovacina, S. Craft, Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele, *Am. J. Pathol.* 162 (2003) 313–319.

- [83] Q. Quan, J. Wang, X. Li, Y. Wang, Ginsenoside Rg1 decreases A β (1-42) level by upregulating PPAR γ and IDE expression in the hippocampus of a rat model of Alzheimer's disease, *PLoS ONE* 8 (2013) e59155.
- [84] W. Qin, V. Haroutunian, P. Katsel, C.P. Cardozo, L. Ho, J.D. Buxbaum, G.M. Pasinetti, PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia, *Arch. Neurol.* 66 (2009) 352–361.
- [85] S. Austin, J. St-Pierre, PGC1 α and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders, *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 4963–4971.
- [86] E. Hondares, O. Mora, P. Yubero, M. La Rodriguez de Concepción, R. Iglesias, M. Giral, F. Villarroya, Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation, *Endocrinology* 147 (2006) 2829–2838.
- [87] W.A. Pedersen, P.J. McMillan, J.J. Kulstad, J.B. Leverenz, S. Craft, G.R. Haynatzki, Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice, *Exp. Neurol.* 199 (2006) 265–273.
- [88] M.E. Risner, A.M. Saunders, J.F.B. Altman, G.C. Ormandy, S. Craft, I.M. Foley, M.E. Zvartau-Hind, D.A. Hosford, A.D. Roses, Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease, *Pharmacogenomics J.* 6 (2006) 246–254.
- [89] Y. Maeshiba, Y. Kiyota, K. Yamashita, Y. Yoshimura, M. Motohashi, S. Tanayama, Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs, and monkeys, *Arzneimittelforschung* 47 (1997) 29–35.
- [90] P. Papadopoulos, P. Rosa-Neto, J. Rochford, E. Hamel, Pioglitazone improves reversal learning and exerts mixed cerebrovascular effects in a mouse model of Alzheimer's disease with combined amyloid- β and cerebrovascular pathology, *PLoS ONE* 8 (2013) e68612.
- [91] http://www.arznei-telegramm.de/html/1997_12/9712127_06.html.
- [92] http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/09/news_detail_001119.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1.
- [93] <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/ucm143349.htm>.
- [94] <http://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2011/rhb-pioglitazon2.html>.
- [95] E.M. Mandelkow, J. Biernat, G. Drewes, N. Gustke, B. Trinczek, E. Mandelkow, Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules, *Neurobiol. Aging* 16 (1995) 355–62; discussion 362–3.
- [96] R. Brandt, G. Lee, Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 3414–3419.
- [97] M. Kolarova, F. García-Sierra, A. Bartos, J. Ricny, D. Ripova, Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease, *Int J Alzheimers Dis* 2012 (2012) 731526.
- [98] R.V. Barkus, O. Klyachko, D. Horiuchi, B.J. Dickson, W.M. Saxton, Identification of an axonal kinesin-3 motor for fast anterograde vesicle transport that facilitates retrograde transport of neuropeptides, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 274–283.
- [99] A.-L. Ström, J. Gal, P. Shi, E.J. Kasarskis, L.J. Hayward, H. Zhu, Retrograde axonal transport and motor neuron disease, *J. Neurochem.* 106 (2008) 495–505.
- [100] A. Ebner, R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek, E. Mandelkow, Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 777–794.
- [101] B.T. Hyman, J.C. Augustinack, M. Ingelsson, Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1739 (2005) 150–157.
- [102] J. Avila, I. Santa-María, M. Pérez, F. Hernández, F. Moreno, Tau phosphorylation, aggregation, and cell toxicity, *J. Biomed. Biotechnol.* 2006 (2006) 74539.
- [103] Z. Berger, H. Roder, A. Hanna, A. Carlson, V. Rangachari, M. Yue, Z. Wszolek, K. Ashe, J. Knight, D. Dickson, C. Andorfer, T.L. Rosenberry, J. Lewis, M. Hutton, C. Janus, Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy, *J. Neurosci.* 27 (2007) 3650–3662.

- [104] K. Iqbal, C.-X. Gong, F. Liu, Hyperphosphorylation-induced tau oligomers, *Front Neurol* 4 (2013) 112.
- [105] K.R. Brunden, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies, *Nat Rev Drug Discov* 8 (2009) 783–793.
- [106] L. Martin, X. Latypova, F. Terro, Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 58 (2011) 458–471.
- [107] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (1986) 4913–4917.
- [108] E. Köpke, Y.C. Tung, S. Shaikh, A.C. Alonso, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 24374–24384.
- [109] F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C.-X. Gong, Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 1942–1950.
- [110] C.-X. Gong, K. Iqbal, Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 2321–2328.
- [111] W.-H. Zheng, S. Bastianetto, F. Mennicken, W. Ma, S. Kar, Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures, *Neuroscience* 115 (2002) 201–211.
- [112] F. García-Sierra, N. Ghoshal, B. Quinn, R.W. Berry, L.I. Binder, Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 5 (2003) 65–77.
- [113] C.M. Wischik, M. Novak, P.C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, R.A. Crowther, Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 4884–4888.
- [114] F. García-Sierra, C.M. Wischik, C.R. Harrington, J. Luna-Muñoz, R. Mena, Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease, *J. Chem. Neuroanat.* 22 (2001) 65–77.
- [115] A. Abraha, N. Ghoshal, T.C. Gamblin, V. Cryns, R.W. Berry, J. Kuret, L.I. Binder, C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease, *J. Cell. Sci.* 113 Pt 21 (2000) 3737–3745.
- [116] D.J. Irwin, T.J. Cohen, M. Grossman, S.E. Arnold, S.X. Xie, V.M.-Y. Lee, J.Q. Trojanowski, Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies, *Brain* 135 (2012) 807–818.
- [117] H.-C. Tai, A. Serrano-Pozo, T. Hashimoto, M.P. Frosch, T.L. Spires-Jones, B.T. Hyman, The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system, *Am. J. Pathol.* 181 (2012) 1426–1435.
- [118] A. Macdonald, K. Briggs, M. Poppe, A. Higgins, L. Velayudhan, S. Lovestone, A feasibility and tolerability study of lithium in Alzheimer's disease, *Int J Geriatr Psychiatry* 23 (2008) 704–711.
- [119] H. Hampel, M. Ewers, K. Bürger, P. Annas, A. Mörtberg, A. Bogstedt, L. Frölich, J. Schröder, P. Schönknecht, M.W. Riepe, I. Kraft, T. Gasser, T. Leyhe, H.-J. Möller, A. Kurz, H. Basun, Lithium trial in Alzheimer's disease: a randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study, *J Clin Psychiatry* 70 (2009) 922–931.
- [120] P.N. Tariot, L.S. Schneider, J. Cummings, R.G. Thomas, R. Raman, L.J. Jakimovich, R. Loy, B. Bartocci, A. Fleisher, M.S. Ismail, A. Porsteinsson, M. Weiner, C.R. Jack, L. Thal, P.S. Aisen, Chronic divalproex sodium to attenuate agitation and clinical progression of Alzheimer disease, *Arch. Gen. Psychiatry* 68 (2011) 853–861.
- [121] C.M. Wischik, P. Bentham, D.J. Wischik, K.M. Seng, O3-04-07: Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks, *Alzheimer's & Dementia* 4 (2008) T167.
- [122] C.M. Wischik, C.R. Harrington, J.M.D. Storey, Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease, *Biochem. Pharmacol.* 88 (2014) 529–539.
- [123] B. Bulic, M. Pickhardt, E. Mandelkow, Progress and developments in tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 4135–4155.

- [124] W. Wang, L. Fan, D. Xu, Z. Wen, R. Yu, Q. Ma, Immunotherapy for Alzheimer's disease, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 44 (2012) 807–814.
- [125] A. Boutajangout, E.M. Sigurdsson, P.K. Krishnamurthy, Tau as a therapeutic target for Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res* 8 (2011) 666–677.
- [126] F. Horn, *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 2nd ed., Thieme, Stuttgart, New York, 2003.
- [127] K. Itoh, K. Nakamura, M. Iijima, H. Sesaki, Mitochondrial dynamics in neurodegeneration, *Trends Cell Biol.* 23 (2013) 64–71.
- [128] G. Twig, A. Elorza, A.J.A. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, O.S. Shirihai, Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy, *EMBO J.* 27 (2008) 433–446.
- [129] R.J. Youle, A.M. van der Bliek, Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science* 337 (2012) 1062–1065.
- [130] Y. Kageyama, Z. Zhang, R. Roda, M. Fukaya, J. Wakabayashi, N. Wakabayashi, T.W. Kensler, P.H. Reddy, M. Iijima, H. Sesaki, Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage, *J. Cell Biol.* 197 (2012) 535–551.
- [131] H. Chen, D.C. Chan, Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics, *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 (2006) 453–459.
- [132] Z. Song, M. Ghochani, J.M. McCaffery, T.G. Frey, D.C. Chan, Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion, *Mol. Biol. Cell* 20 (2009) 3525–3532.
- [133] P.H. Reddy, T.P. Reddy, M. Manczak, M.J. Calkins, U. Shirendeb, P. Mao, Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases, *Brain Res Rev* 67 (2011) 103–118.
- [134] M.F. Galindo, J. Jordán, C. González-García, V. Ceña, Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria, *Br. J. Pharmacol.* 139 (2003) 797–804.
- [135] B. DuBoff, M. Feany, J. Götz, Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease, *Trends Neurosci.* 36 (2013) 325–335.
- [136] A. Bobba, G. Amadoro, D. Valenti, V. Corsetti, R. Lassandro, A. Atlante, Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively, *Mitochondrion* 13 (2013) 298–311.
- [137] R.S. Balaban, S. Nemoto, T. Finkel, Mitochondria, oxidants, and aging, *Cell* 120 (2005) 483–495.
- [138] Y. Kushnareva, A.N. Murphy, A. Andreyev, Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state, *Biochem. J.* 368 (2002) 545–553.
- [139] Z. Chen, C. Zhong, Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies, *Prog. Neurobiol.* 108 (2013) 21–43.
- [140] R.A. Velliquette, T. O'Connor, R. Vassar, Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis, *J. Neurosci.* 25 (2005) 10874–10883.
- [141] M.B. Abdurrahman, O.K. el Sheikh, A.T. Elidrissy, W.M. al Kahtani, A. Lambourne, Proteinuria selectivity index in Saudi children with nephrotic syndrome, *Ann. Clin. Biochem.* 26 (Pt 6) (1989) 492–495.
- [142] M. Manczak, M.J. Calkins, P.H. Reddy, Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 2495–2509.
- [143] M. Frank, S. Duvezin-Caubet, S. Koob, A. Occhipinti, R. Jagasia, A. Petcherski, M.O. Ruonala, M. Priault, B. Salin, A.S. Reichert, Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 2297–2310.
- [144] H. Oakley, S.L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, L. van Eldik, R. Berry, R. Vassar, Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation, *J. Neurosci.* 26 (2006) 10129–10140.

- [145] G.K. Gouras, J. Tsai, J. Naslund, B. Vincent, M. Edgar, F. Checler, J.P. Greenfield, V. Haroutunian, J.D. Buxbaum, H. Xu, P. Greengard, N.R. Relkin, Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 15–20.
- [146] E.H. Koo, S.L. Squazzo, Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 17386–17389.
- [147] P.F. Pavlov, B. Wiehager, J. Sakai, S. Frykman, H. Behbahani, B. Winblad, M. Ankarcróna, Mitochondrial γ -secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein, *FASEB J.* 25 (2011) 78–88.
- [148] A.Y. Lai, J. McLaurin, Mechanisms of amyloid-Beta Peptide uptake by neurons: the role of lipid rafts and lipid raft-associated proteins, *Int J Alzheimers Dis* 2011 (2010) 548380.
- [149] N. Alikhani, M. Ankarcróna, E. Glaser, Mitochondria and Alzheimer's disease: amyloid-beta peptide uptake and degradation by the presequence protease, hPreP, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 447–451.
- [150] C. Caspersen, N. Wang, J. Yao, A. Sosunov, X. Chen, J.W. Lustbader, H.W. Xu, D. Stern, G. McKhann, S. Du Yan, Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease, *FASEB J.* 19 (2005) 2040–2041.
- [151] H. Du, S.S. Yan, Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta, *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (2010) 198–204.
- [152] D.N. Drechsel, A.A. Hyman, M.H. Cobb, M.W. Kirschner, Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau, *Mol. Biol. Cell* 3 (1992) 1141–1154.
- [153] N. Gustke, B. Trinczek, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, Domains of tau protein and interactions with microtubules, *Biochemistry* 33 (1994) 9511–9522.
- [154] K. Iijima-Ando, M. Sekiya, A. Maruko-Otake, Y. Ohtake, E. Suzuki, B. Lu, K.M. Iijima, Loss of axonal mitochondria promotes tau-mediated neurodegeneration and Alzheimer's disease-related tau phosphorylation via PAR-1, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002918.
- [155] G.P. Eckert, K. Renner, S.H. Eckert, J. Eckmann, S. Hagl, R.M. Abdel-Kader, C. Kurz, K. Leuner, W.E. Müller, Mitochondrial dysfunction--a pharmacological target in Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.* 46 (2012) 136–150.
- [156] R.S. Doody, S.I. GavriloVA, M. Sano, R.G. Thomas, P.S. Aisen, S.O. Bachurin, L. Seely, D. Hung, Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study, *Lancet* 372 (2008) 207–215.
- [157] P.R. Bharadwaj, K.A. Bates, T. Porter, E. Teimouri, G. Perry, J.W. Steele, S. Gandy, D. Groth, R.N. Martins, G. Verdile, Latrepirdine: molecular mechanisms underlying potential therapeutic roles in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases, *Transl Psychiatry* 3 (2013) e332.
- [158] S. Sung, Y. Yao, K. Uryu, H. Yang, V.M.-Y. Lee, J.Q. Trojanowski, D. Praticò, Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease, *FASEB J.* 18 (2004) 323–325.
- [159] C. Mancuso, R. Siciliano, E. Barone, P. Preziosi, Natural substances and Alzheimer's disease: from preclinical studies to evidence based medicine, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 616–624.
- [160] O.B. Villaflora, Y.-J. Chen, C.-P. Chen, J.-M. Yeh, T.-Y. Wu, Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents, *Taiwan J Obstet Gynecol* 51 (2012) 515–525.
- [161] <https://www.iqwig.de/de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen/ginkgo-biloba-bei-alzheimer-demenz-studienlage-uneinheitlich.2354.html>.
- [162] <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>.
- [163] Karen Reising, Bioanalytik von Keto-Boswelliasäuren und Untersuchung der Modulation des P-Glykoproteins durch Weihrauch und seine Inhaltsstoffe: Dissertation, 2006.
- [164] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie, PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel, *Comput Methods Programs Biomed* 99 (2010) 306–314.
- [165] R.D. Bell, B.V. Zlokovic, Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.* 118 (2009) 103–113.

- [166] S. Takeda, N. Sato, R. Morishita, Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy, *Front Aging Neurosci* 6 (2014) 171.
- [167] M. Bertmer, R.C. Nieuwendaal, A.B. Barnes, S.E. Hayes, Solid-state photodimerization kinetics of alpha-trans-cinnamic acid to alpha-truxillic acid studied via solid-state NMR, *J Phys Chem B* 110 (2006) 6270–6273.
- [168] Y.-H. Wang, B. Avula, N.P.D. Nanayakkara, J. Zhao, I.A. Khan, Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 4470–4476.
- [169] J.A.K. Howard, M.F. Mahon, P.R. Raithby, H.A. Sparkes, Trans-cinnamic acid and coumarin-3-carboxylic acid: experimental charge-density studies to shed light on [2 + 2] cycloaddition reactions, *Acta Crystallogr., B* 65 (2009) 230–237.
- [170] D. Ratanasavanh, D. Lamiable, M. Biour, Y. Guédès, M. Gersberg, E. Leutenegger, C. Riché, Metabolism and toxicity of coumarin on cultured human, rat, mouse and rabbit hepatocytes, *Fundam Clin Pharmacol* 10 (1996) 504–510.
- [171] S.P. Felter, J.D. Vassallo, B.D. Carlton, G.P. Daston, A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 462–475.
- [172] K. Abraham, F. Wöhrlein, O. Lindtner, G. Heinemeyer, A. Lampen, Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data, *Mol Nutr Food Res* 54 (2010) 228–239.

X Danksagung

XI Lebenslauf

Name: Maren Pellowska

Geburtsdatum: 29.08.1983

Geburtsort: Dessau

Familienstand: ledig

Werdegang

April 2010 – Oktober 2014

Doktorandin am Institut für pharmazeutische
Chemie der Goethe Universität Frankfurt;
Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec;
Pharmazeutische Analytik von organischen
Wirkstoffmolekülen aus biologischen Matrices

Veröffentlichungen

Pharmacokinetic properties of MH84, a γ -secretase modulator with PPAR γ agonistic activity, M. Pellowska , C. Stein , M. Pohland , D. Merk, J. Klein, G.P. Eckert, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, article in press, Online seit 13.10.2014

Advances in personalized medicine - medicinal chemistry and pharmacology of vemurafenib and ivacaftor, Pellowska M, Merk D, Schubert-Zsilavec M., Pharmazie. 2013 Jul;68(7):484-91.

Molecular pharmacological profile of a novel thiazolinone-based direct and selective 5-lipoxygenase inhibitor, Hofmann B, Rödl CB, Kahnt AS, Maier TJ, Michel AA, Hoffmann M, Rau O, Awwad K, Pellowska M, Wurglics M, Wacker M, Zivković A, Fleming I, Schubert-Zsilavec M, Stark H, Schneider G, Steinhilber D., Br J Pharmacol. 2012 Apr;165(7):2304-13

A pirinixic acid derivative (LP105) inhibits murine 5-lipoxygenase activity and attenuates vascular remodelling in a murine model of aortic aneurysm, Revermann M, Mieth A, Popescu L, Paulke A, Wurglics M, Pellowska M, Fischer AS, Steri R, Maier TJ, Schermuly RT, Geisslinger G, Schubert-Zsilavec M, Brandes RP, Steinhilber D., Br J Pharmacol. 2011 Aug;163(8):1721-32

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation zum Thema

„Analytische Methoden zur Bestimmung der ZNS-Bioverfügbarkeit von Pirinixinsäure- und Zimtsäurederivaten als potentielle Wirkstoffe zur Therapie von Morbus Alzheimer“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)



Pharmacokinetic properties of MH84, a γ -secretase modulator with PPAR γ agonistic activity

M. Pellowska^a, C. Stein^b, M. Pohland^b, D. Merk^a, J. Klein^b, G.P. Eckert^b,
M. Schubert-Zsilavecz^a, M. Wurglics^{a,*}

^a Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University, Max-von-Laue Str. 9, D-60438 Frankfurt, Germany

^b Department of Pharmacology, Goethe-University, Max-von-Laue Str. 9, D-60438 Frankfurt, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2014

Received in revised form

30 September 2014

Accepted 1 October 2014

Available online 13 October 2014

Keywords:

Alzheimer's disease

PPAR γ agonist

γ -Secretase modulator

Pharmacokinetics

CNS bioavailability

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. Since no causative treatment is available, new therapeutic options are utmost needed. Several pirinixic acid derivatives, including MH84 (2-((4,6-bis(4-(trifluoromethyl)phenethoxy)pyrimidin-2-yl)thio)hexanoic acid), have shown promising *in vitro* results as γ -secretase modulators as well as PPAR γ activators as potential pharmacological compounds against AD.

Using a newly developed and validated sensitive LC–MS (APCI–qTOF mass analyzer) method, the pharmacokinetic and long-term accumulating properties as well as the blood–brain–barrier permeability of MH84 were evaluated in a preclinical animal study. MH84 was administered to mice by oral gavage with a dose of 12 mg/kg. Nine time points from 0.5 to 48 h with 6 animals per point were investigated. Additionally 6 animals were fed daily, for 21 days with an identical dose to determine possible long-term accumulation in plasma and brain tissue.

The sample preparation was performed by a liquid–liquid extraction on Extrelut[®] columns whereas the LC separation was operated on a MultoHigh 100 RP 18–5 μ column (125 \times 4 mm) using an isocratic mobile phase of formic acid (0.1% (v/v))–methanol mixture (11:89 (v/v)) at a flow rate of 1 ml/min. The validation confirmed the new LC–MS method to be precise, accurate and reliable. After oral application, C_{max} and T_{max} of unmetabolized MH84 was determined to be 10.90 μ g/ml and 3 h in plasma. In brain tissue a constant level of 300 to maximum 320.64 ng/g was found after 1.5–6 h. Daily gavage for 21 days did not lead to a long-term drug accumulation in the brain. The efficacy of the obtained MH84 levels needs to be investigated in further preclinical pharmacodynamic animal studies.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last three decades enormous efforts were made to understand the neurobiological mechanisms of Alzheimer's disease (AD). Besides the typical well characterized pathological hallmarks of extracellular amyloid- β deposits and intracellular tau tangles, many other changes were found in the brain of Alzheimer's patients. These changes comprise inflammatory responses, insulin

deficiency and activated microglia leading to synaptic dysfunction and neural loss [1,2]. The identification of the interplay between these alterations is a main current topic of research.

The investigated compound MH84 is a small molecule, which shows a dual activity concerning two important neurobiological targets of Alzheimer's disease: γ -secretase and PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). MH84 was chosen based on the most desirable *in vitro* activity (γ -secretase: $IC_{50}(A\beta_{42})=6.0 \mu$ M; $EC_{50}(A\beta_{38})=1.8 \mu$ M and PPAR γ : $EC_{50}=11.0 \mu$ M, max. activation: 112%) of a small in-house synthesized SAR library [3].

Along with β -secretase, γ -secretase is responsible for the amyloidogenic cleavage of amyloid- β precursor protein (APP) producing A β 37–43 peptides and cell signaling peptides in normal and pathological pathways [4,5]. It is an aspartyl protease complex with presenilin in the catalytic center. In AD the cleavage process is altered leading to an excessive formation of A β_{42} . This

* Corresponding author. Tel.: +49 6979829432; fax: +49 6979829332.

E-mail addresses: pellowska@pharmchem.uni-frankfurt.de (M. Pellowska), ch.stein@em.uni-frankfurt.de (C. Stein), maximilian.pohland@nutritional-neuroscience.com (M. Pohland), merk@pharmchem.uni-frankfurt.de (D. Merk), klein@em.uni-frankfurt.de (J. Klein), g.p.eckert@em.uni-frankfurt.de (G.P. Eckert), wurglics@pharmchem.uni-frankfurt.de (M. Schubert-Zsilavecz), schubert-zsilavecz@pharmchem.uni-frankfurt.de (M. Wurglics).

peptide has a high tendency to form oligomers and fibrils [6], which are toxic in neuronal cell cultures [7]. Due to interferences with the physiological Notch signaling pathway, the pharmacological use of γ -secretase inhibitors is limited [8]. Therefore γ -secretase modulators that shift the APP cleavage from A β 42 to shorter more soluble and less toxic A β 38, which do not alter the Notch signaling pathway, might be more desirable [9].

PPAR γ , a nuclear receptor regulating lipid and carbohydrate metabolism represents another promising target for AD therapy [10]. Agonists of PPAR γ directly influence the APP cleavage by suppressing the transcription of APP processing enzyme BACE1 (β -secretase) thus leading to decreased A β levels [11]. Besides the alteration of A β production, the clearance of pre-existing excessive A β by microglia and IDE (insulin-degrading enzyme) is affected by PPAR γ . In AD microglia are chronically activated leading to a continuous microglial-driven inflammation [12]. The chronic inflammation has a negative impact on microglial clearance functions and leads to cytotoxic effects. It was reported that the stimulation by PPAR γ agonists (DSP-8658 and pioglitazone) enhances the degradation of A β by microglia [12] and inhibits proinflammatory gene expression [13,14]. Additionally, inflammation is proposed to be the link to the formation of neurofibrillary tangles by changing the substrate specificity of kinases/phosphatases leading to tau phosphorylation [15].

Currently, there is a controversial discussion, if elevated serum cholesterol levels increase the incidence of AD [16]. Obviously, several genes regulating the cholesterol homeostasis are linked to AD. The best described are ApoE (Apolipoprotein E) and ABCA1 (ATP-binding cassette A1). The ApoE4 allele is proven to be the principal genetic risk factor for the sporadic late-onset variant of the disease [17]. The activation of PPAR γ and Liver X receptors (LXRs) can increase brain ApoE and ABCA1 levels. This improves A β degradation and leads to reduced A β levels and plaque formation [18,19].

The risk of developing AD in patients with type 2 diabetes is twice as high in healthy patients [20]. Brain insulin receptor signaling is significantly decreased in AD according to insulin resistance [21]. IDE, which is reduced in the brain of late-onset AD patients, degrades extracellular A β [22]. PPAR γ agonists increase IDE expression and its proteolytic activity resulting in decreased extracellular A β levels [23].

Thus, MH84 with its action on both γ -secretase and PPAR γ , represents a promising pharmacological compound for further pre-clinical and clinical investigations. We determined MH84 in plasma and brain tissue and thereby obtained the pharmacokinetic profiles using a newly developed and validated sensitive LC–MS method.

2. Experimental

2.1. Materials

MH84 and its internal standard (MH41) were obtained by in-house synthesis. The purity was proven by NMR and MS spectra as well as elementary analysis. The Extrelut[®] liquid–liquid separation columns were purchased by VWR international. PALL GHP Acrodisc syringe filters (45 μ m GHP membrane) were obtained from Analytix shop.com (Altmann Analytik). Methanol (LC–MS), formic acid (0.1%; LC–MS), tert-butylmethylether (HPLC) and TRIS ultra quality (\geq 99.9%) for buffer preparation were purchased by Carl Roth Germany. Water used for the buffer preparation and water-methanol (50:50, v/v) mixture was obtained by additional distilling of water obtained by a purifying system (ELGA, Purelab Ultra[®]).

2.2. Solution and sample preparation

2.2.1. Preparation of stock solutions

A freshly weight amount of MH84 (500–1000 μ g) was dissolved in 1 ml DMSO and further diluted with DMSO to obtain DMSO stock solution (250 μ g/ml). This solution was further diluted with methanol–water mixture (50:50, v/v) for spiking solutions. The maximum content of DMSO at the spiked calibration point is 0.1% (at a concentration of 250 ng/ml in mouse plasma). The internal standard solution ($c = 1 \mu$ g/ml) was obtained by the same procedure.

2.2.2. Preparation of calibration curves and QC solutions from plasma

MH84 from solutions in methanol–water (50:50, v/v) was spiked to 30 μ l of rat plasma to concentrations between 20 and 250 ng/ml to get a matrix-assisted calibration curve. Therefore, an amount of 370 μ l water, 100 μ l of internal standard solution (1 μ g/ml) and 400 μ l of acetone for protein precipitation were added (total volume 1 ml). The QC samples were obtained in the same manner to get low QC (20 ng/ml), mid QC (100 ng/ml) and high QC (200 ng/ml) solutions. The equivalence of rat and mouse plasma (samples from the application study) was proven in a cross-validation measurement. The plasma from the application study was obtained by centrifugation at only 900 \times g for 10 min to prevent centrifugation deficiency (induced by high molecular weight of MH84) observed during method development. Samples from the application study, which exceeded the calibration range were diluted with rat plasma to quantify the amount by recalculation. For pharmacokinetic values obtained after 24 and 48 h, a calibration curve in the upper concentration range (up to 2 ng/ml) was used to quantify small concentrations of MH84.

2.2.3. Preparation of calibration curves and QC solutions from brain tissue

A homogenate of pig brain (188.9 g) in TRIS buffer (5 mM, pH = 7.4) was obtained preparing 10% (w/w) brain to TRIS buffer in an ultra-turrax homogenating step (3 min, 10,000 rpm). Aliquots of this homogenate were frozen at -20°C and used for calibration curves and QC samples. The homogenates from samples of the application studies were obtained by ultra-turrax procedure (20 s, 8000 rpm) in 10% (w/w) mouse brain to TRIS buffer. The homogenation time and rate gave comparable results due to different amounts of brain used for the homogenate. The equivalence of pig brain and mouse brain homogenate was proven in a cross-validation measurement. For the preparation of calibration curves, QC samples and samples from the application study, 400 μ l brain tissue homogenate was used. Two different calibration curves had to be utilized to meet validation criteria of precision and accuracy. Therefore MH84 was spiked from solution in methanol–water (50:50, v/v) in a concentration range 2–20 ng/ml (low concentration calibration curve) and 20–150 ng/ml (high concentration calibration curve). Additionally, 100 μ l internal standard solution ($c = 1 \mu$ g/ml in methanol–water (50:50, v/v)) and 400 μ l of acetone for protein precipitation were added (total volume 1 ml). The QC samples were prepared by the same procedure to get low QC (5 ng/ml), mid QC (20 ng/ml) and high QC (100 ng/ml) due to the expected concentration range of the application study.

2.2.4. Sample preparation

For every calibration point, QC sample and sample from the application study, 1 ml of matrix–solvent mixture containing MH84 and the internal standard was obtained (see Sections 2.2.2 and 2.2.3). The mixtures including brain homogenate were centrifuged for 10 min at 900 \times g. Afterwards 850 μ l were taken from the supernatant (brain homogenate) or matrix–solvent mixture (plasma)

and were given on Extrelut® liquid–liquid extraction columns. After 15 min 7 ml of tert-butylmethylether were given on the extraction columns to elute MH84 and the internal standard. The ether was dried in a nitrogen flow of a heating device at 40 °C. The dry residue was resolved in 500 µl of a methanol–water (50:50, v/v) mixture. Therefore all samples were treated with ultrasound for 15 min. Afterwards the solutions were filtered by syringe filters and collected in the vials for the LC–MS autosampler.

2.2.5. Preparation of the solution for the oral application study

MH84 (42.0 mg) was dissolved in polyethylenglycol 400 (PEG400, density 1.13 g/ml, added to a mass of 22.6 g) to a concentration of 2.1 mg/ml. The concentration was calculated by assuming that the maximum weight of mice is supposed to be 35 g. For a dose of 12 mg/kg the mice would receive an application volume of 200 µl. Most mice had a weight of 24–30 g allowing a lower volume to be used (mass dependent: 140–170 µl). The solution was aliquoted for each day of animal study and frozen at –20 °C to ensure fresh solution quality.

2.3. LC–MS analysis

The chromatographic separation was performed on a Multo-High 100 RP 18-5 µ column (125 × 4 mm). This column showed best results in retention time, sensitivity and HPLC back pressure. Other tested columns were Inertsil ODS-2 5 µm (150 × 2.1 mm), Nucleodur 100-5 C18 ec (125 × 4 mm), LiChrospher 100 RP 18-5 µ EC (125 × 4 mm) and Multospher 120 RP 18 HP-5 µ (125 × 4 mm). The isocratic mobile phase consisted of formic acid (0.1%)–methanol (11/89, v/v) and was used at a flow rate of 1 ml/min. The extracted ion chromatograms (EICs) of MH84 $m/z = 603.2$ and internal standard $m/z = 439.2$ were obtained via APCI ionization in positive ion mode and q-TOF mass spectrometer from Bruker® (microTOF-Q II). Both molecules were analyzed by molecule peak $M+H^+$. The total duration of the HPLC run was 12 min with a retention time of 8.3 min for MH84 and 5.5 min for the internal standard. For MS analysis, three segments were defined to separate possible matrix residues, which elute near the injection peak (segment 1: 0–4.5 min, segment 2: 4.5–11 min and segment 3: 11–12 min). The APCI parameters in the detection segment were optimized for MH84 leading to increased sensitivity in comparison to the higher concentration of the internal standard (Fig. 1: chromatogram of processed brain tissue with 100 ng/ml of IS and 5 ng/ml of MH84). Besides the chromatogram obtained by MS detection, a chromatogram via UV detection was recorded simultaneously at a wave-length of 258 nm. The injection volume was 50 µl for plasma samples and 100 µl for brain tissue samples.

2.4. Analytical method validation

The validation was performed according to the guideline of the United States Food and Drug Administration (FDA) for bioanalytical method validation revision 1, September 2013 [24].

The method was validated for linearity, precision and accuracy, extraction recovery, selectivity, matrix effects, lower limit of quantification (LLOQ), lower limit of detection (LOD) and stability of the investigated substance.

2.4.1. Linearity

To achieve maximum precision and accuracy freshly made calibration curves were processed with QC samples in the validation procedure and during sample measurements from the application study. For the determination of small amounts of MH84 (e.g. from brain tissue analysis) a separate calibration curve was prepared in the lower concentration range (2–20 ng/ml). Calibration curves were plotted using the ratio of the peak areas of MH84 to IS against

MH84 concentrations. A linear regression was used to fit the calibration curves and prove linearity.

2.4.2. Selectivity, LLOQ and LLOD

To ensure the selectivity of the LC–MS method, the extracted ion chromatograms of the molecule peaks $M+H^+$ MH84 and the internal standard were used. Possible matrix effects were eliminated by using matrix-assisted calibration curves. All calibration points were subjects to the conditions of the sample preparation procedure.

The lowest calibration concentrations were analyzed for the determination of LLOQ and LLOD. LLOQ was accepted to be the tenfold signal to noise ratio whereas the LLOD was defined to be the threefold signal-to noise-ratio.

2.4.3. Precision and accuracy

Intraday-assay precision and accuracy were determined by twofold processing of calibration curves and 5 QC samples for each concentration on 1 day (total n per concentration = 10). The precision was calculated as relative standard deviation (RSD%) from the mean of the 10 replications. The accuracy is given by comparison of the mean measured concentration and the spiked concentration (measured conc. × 100%/spiked conc.). Interday-assay precision and accuracy were determined by processing calibration curve and 5 QC samples for each concentration on two different days (total n per concentration = 10). Precision and accuracy were calculated as for intraday-assay.

2.4.4. Extraction recovery and cross-validation

The extraction recovery ($n = 6$ for each QC) was analyzed by comparing the peak area ratio MH84/IS, which was obtained after extraction with the ratio MH84/IS spiked after sample processing. The internal standard was added before the extraction process to all calibration points, QCs and samples from the application study to detect systematic and random failures during sample processing and measurement. The extraction recovery of the single area of MH84 and IS was additionally determined.

Referring to the lack of blank matrix volume from mice, one concentration was used to compare the extraction recovery results between mouse and rat plasma as well as mouse brain tissue and pig brain tissue. This analysis should prove the equality of the used matrix species.

2.4.5. Stability

Stability measurements ($n = 3$ for Low QC, Mid QC and High QC) were performed to approve DMSO stock solution stability (2 months at RT), also matrix autosampler stability in processed solutions for 48 h compared to the start value and freeze–thaw–stability after three cycles and finally long-term stability (–20 °C, 3 months).

2.5. Animal studies

Pharmacokinetic and long-term accumulation studies were performed using young (3 months) male C57BL/6J mice obtained from Janvier Labs, France. MH84 diluted in polyethylene glycol 400 (PEG400) was given orally at a concentration of 12 mg/kg. In the pharmacokinetic study, the animals received MH84 by single gavage and were anesthetized with isofluran after the individual time point. Nine time points were chosen (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12, 24, 48 h) for the determination of the pharmacokinetic profile. The plasma was obtained by collecting the blood after decapitation in heparinized Eppendorf tubes and centrifugation for 15 min at 900 × g. The whole brain was removed and snap frozen in liquid nitrogen until transfer into the –20 °C freezer. For each time point 6 animals were used. For the accumulation study 6 animals were daily given MH84 by oral gavage for 21 days. These samples were collected

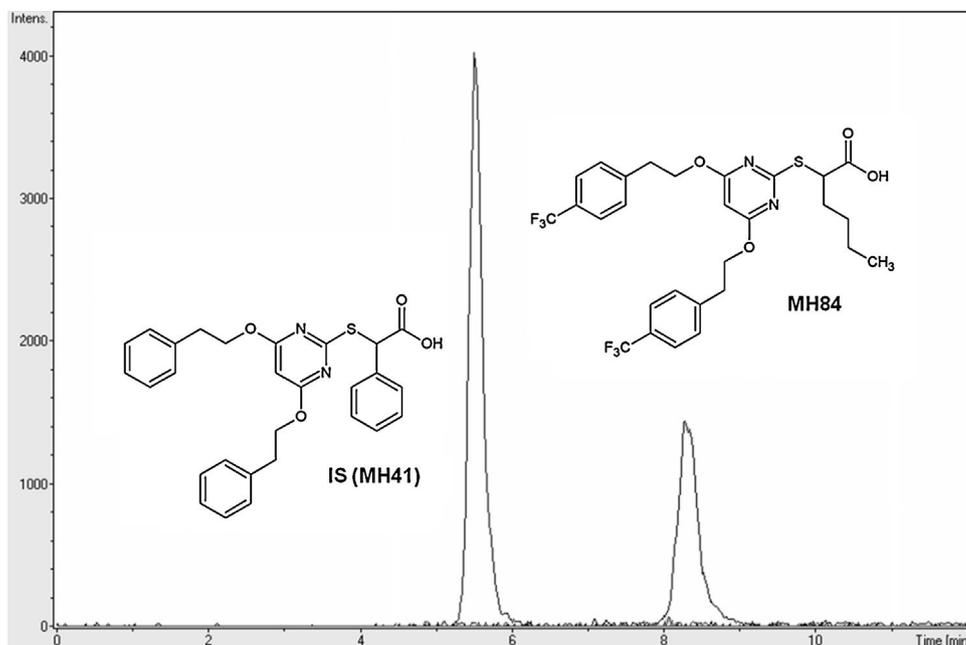


Fig. 1. EICs of IS ($c = 100$ ng/ml) and MH84 ($c = 5$ ng/ml) obtained by spiking MH84 and IS to pig brain tissue homogenate before sample processing overlaid by the blank chromatograms of both EICs from pig brain homogenate, all mass traces are not smoothed.

approximately 20 h after the last MH84 gavage in the same way as for the pharmacokinetic study.

Animals were handled according to the German guidelines for animal care; they had access to water and food *ad libitum* and were kept in a 12 h light/dark cycle.

All experiments were carried out by individuals with appropriate training and experience according to the requirements of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations and the European Communities Council Directive (Directive 2010/63/EU; permission ID: FU/1004).

3. Results

3.1. Analytical method validation

A sensitive and selective method for the quantification of MH84 from mouse plasma and brain tissue was developed.

A typical chromatogram of MH84 and IS showed a clearly separated retention of both analytes (Fig. 1).

All parameters of the analytical method validation such as linearity, precision and accuracy, extraction recovery, selectivity, matrix effects, lower limit of quantification (LLOQ), lower limit of detection (LLOD) and stability of the investigated substance fulfilled the requirements of the FDA guideline [24] and are described in detail below.

3.1.1. Linearity

Concentration dependent matrix-assisted calibration curves were used concerning the lack of consistent linearity over the whole quantification range. The curves were obtained by spiking the individual amount of MH84 and IS to the matrix–solvent–mixture before sample processing procedure. For low concentrations a calibration curve from 2 to 20 ng/ml was used, whereas for higher concentrations another linear calibration curve from 20 to 250 ng/ml was available. Linearity was confirmed by a correlation coefficient >0.99 .

3.1.2. Selectivity, matrix effects, LLOQ and LLOD

The required selectivity of the method was achieved by analyzing the $M+H^+$ EICs of MH84 and the internal standard ($m/z = 603.2$ and 439.2). The APCI parameters were adjusted to obtain optimal sensitivity for MH84 in comparison to IS. This is obvious in Fig. 1 where the EICs of IS ($c = 100$ ng/ml) and MH84 ($c = 5$ ng/ml) are represented.

Additionally Fig. 1 includes the EICs of MH84 and IS of a blank pig brain sample. No interference in the EICs was found in all chromatograms of either blank plasma or blank brain homogenate.

The LLOQ and LLOD were determined by analyzing the signal-to-noise ratio of the EIC of MH84. A tenfold ratio was defined to be the LLOQ and a threefold ratio characterizes the LLOD, according to the regulations in the FDA guideline.

For plasma, the LLOQ of the method was found to be 1.44 ng/ml corresponding to 48.00 ng/ml plasma. The LLOD is 0.43 ng/ml, which is 14.33 ng/ml in plasma.

For brain, a LLOQ of 0.76 ng/ml was obtained, corresponding to 20.90 ng/g in brain tissue. The LLOD is 0.23 ng/ml, which is equal to 6.33 ng/g in brain tissue.

3.1.3. Precision and accuracy

The determination of precision and accuracy serves as an indicator for the correctness and reliability of the used method. The FDA guideline gives a limit of max. 15% deviation in precision and accuracy.

In plasma the accuracy in intra- and interday-assay ranged between 96.39 and 102.12% with a precision between 5.94 and 10.36% (Table 1).

The results for the analysis of brain tissue homogenate were more precise (2.96–5.23% RSD) for intra- and interday assay due to the greater volume of matrix solution used for sample preparation (400 μ l compared to 30 μ l for plasma analysis). The accuracy ranged between 98.51 and 106.29% (Table 2).

Therefore, all results for plasma and brain covering low, mid and high QCs comply with the limitations of the FDA guideline.

Table 1
Results of precision and accuracy measurements of MH84 in rat plasma.

Precision and accuracy of intraday-assay and interday-assay for the quantification of MH84 in plasma							
Intraday-assay (n = 10)				Interday-assay (n = 10)			
	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Measured MH84 conc. [ng/ml]	Precision RSD% ^a	Accuracy % ^b	Measured MH84 conc. [ng/ml]	Precision RSD% ^a	Accuracy % ^b
Low QC	20	20.35	10.36	101.74	20.23	8.68	101.14
Mid QC	100	102.12	9.12	102.12	100.35	7.35	100.35
High QC	200	192.78	5.94	96.39	202.86	9.02	101.43

^a %RSD = (Standard Deviation/Mean) × 100%.^b % = Measured × 100%/Spiked.**Table 2**
Results of precision and accuracy measurements of MH84 in pig brain homogenate.

Precision and accuracy of intraday-assay and interday-assay for the quantification of MH84 in brain tissue							
Intraday-assay (n = 10)				Interday-assay (n = 10)			
	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Measured MH84 conc. [ng/ml]	Precision RSD% ^a	Accuracy % ^b	Measured MH84 conc. [ng/ml]	Precision RSD% ^a	Accuracy % ^b
Low QC	5	5.23	3.30	104.59	5.31	2.96	106.29
Mid QC	20	19.70	4.52	98.51	20.42	5.23	102.12
High QC	100	101.66	4.45	101.66	104.72	4.76	104.72

^a %RSD = (Standard Deviation/Mean) × 100%.^b % = Measured × 100%/Spiked.**Table 3**
Results of the determination of the extraction recovery of sample processing of MH84 in rat plasma and pig brain homogenate.

Extraction recovery of MH84/IS				
	Plasma (n = 6)		Brain tissue (n = 6)	
	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Extr. recovery MH84/IS [%]	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Extr. Recovery MH84/IS [%]
Low QC	20	96.36 ± 3.52	5	98.27 ± 4.93
Mid QC	100	99.45 ± 4.47	20	96.54 ± 1.88
High QC	200	98.51 ± 4.28	100	94.78 ± 3.96

3.1.4. Extraction recovery and cross-validation

The extraction recovery was analyzed to determine a possible loss of MH84 during sample preparation. The extracted area ratio of MH84/IS was 94.78–99.45% (Table 3), which indicated a conformity in extraction properties of MH84 and IS. The single areas of MH84 and IS in plasma and brain tissue homogenate ranged between 85 and 110% for each substance, concentration and matrix. No significant loss of MH84 or IS was found.

Extraction recovery was not essential during the validation process and sample analysis due to the usage of processes matrix-assisted calibration curves in each experiment. No reverse calculation using extraction recovery was therefore necessary.

We used rat plasma and pig brain homogenate, because of the lack of mouse blank matrices. A cross validation was necessary to show the comparability of the different species.

The extraction recovery of the area ratio MH84/IS was in the range of 99.08–103.77% in all cases (n = 3), which is in accordance

to the deviation from sample preparation and measurement (see Table 3). The single areas of MH84 and IS ranged between 90 and 110%. No difference in recovered areas could be found. Thus the usage of these alternate matrix species for calibration curves and QCs in the validation process is possible without constraints (Table 4).

3.1.5. Stability studies

MH84 showed no instabilities in all performed investigations. The DMSO stock solution was stable for at least 2 months at RT and local laboratory light conditions. Freeze–thaw cycles and long-term freezing did not affect the concentration of the QC samples. The processed plasma and brain samples were stable for at least 48 h in the autosampler of the LC–MS system (Table 5).

The stability recovery ranges between 94.80 and 103.04% with no obvious tendency for instability. This is in agreement with the acceptable deviation in sample analysis (see Section 3.2).

Table 4
Results of cross-validation between rat and mouse plasma and between pig brain and mouse brain homogenate (100 ng/ml; n = 3 for each matrix).

Extraction recovery of MH84/IS in different species				
	Plasma mouse (n = 3)		Plasma rat (n = 3)	
	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Extr. recovery MH84/IS [%]	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Extr. Recovery MH84/IS [%]
Mid QC	100	99.08 ± 6.57	100	98.58 ± 5.26

Extraction recovery of MH84/IS in different species				
	Brain mouse (n = 3)		Brain pig (n = 3)	
	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Extr. recovery MH84/IS [%]	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Extr. Recovery MH84/IS [%]
High QC	100	99.88 ± 8.79	100	103.77 ± 5.75

Table 5
Results of stability investigations of MH84 in rat plasma and pig brain homogenate (long-term and three freeze–thaw cycles at -20°C) as well as stability in DMSO stock solution and processed solutions in the autosampler (48 h).

DMSO Stock (2 months, RT, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		Spiked MH84 conc. [ng/ml] ($n=3$)			Measured MH84 conc. [ng/ml]			Stability recovery [%]	
Low QC		20			20.21 \pm 1.08			101.03	
Mid QC		100			96.08 \pm 2.48			96.08	
High QC		200			201.69 \pm 3.50			100.85	
Processed matrix (48 h, auto-sampler)	Plasma ($n=3$)				Brain tissue ($n=3$)				
		Spiked MH84 conc. [ng/ml]	MH84 conc. $t=0$ [ng/ml]	MH84 conc. $t=48\text{ h}$ [ng/ml]	Stability recovery [%]	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	MH84 conc. $t=0$ [ng/ml]	MH84 conc. $t=48\text{ h}$ [ng/ml]	Stability recovery [%]
Low QC		20	18.77 \pm 1.43	18.17 \pm 1.45	96.77	5	5.17 \pm 0.12	5.13 \pm 0.21	99.23
Mid QC		100	101.57 \pm 3.16	98.27 \pm 3.58	96.76	20	20.64 \pm 1.65	20.56 \pm 0.54	99.63
High QC		200	196.63 \pm 18.88	196.08 \pm 16.34	100.23	100	107.62 \pm 3.89	106.81 \pm 4.80	99.24
Freeze–thaw (3 cycles)	Plasma ($n=3$)				Brain tissue ($n=3$)				
		Spiked MH84 conc. [ng/ml]	MH84 conc. after freeze–thaw [ng/ml]	Stability recovery [%]	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	MH84 conc. after freeze–thaw [ng/ml]	Stability recovery [%]		
Low QC		20	20.40 \pm 1.80	102.02	5	4.91 \pm 0.09	98.29		
Mid QC		100	94.80 \pm 3.79	94.80	20	18.87 \pm 0.76	94.34		
High QC		200	199.24 \pm 18.21	99.62	100	103.04 \pm 6.24	103.04		
Long-term (-20°C , 3 months)	Plasma ($n=3$)				Brain tissue ($n=3$)				
		Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Long-term MH84 conc. [ng/ml]	Stability recovery [%]	Spiked MH84 conc. [ng/ml]	Long-term MH84 conc. [ng/ml]	Stability recovery [%]		
Low QC		20	20.31 \pm 0.22	101.54	5	4.85 \pm 0.13	96.98		
Mid QC		100	100.99 \pm 4.57	100.99	20	19.84 \pm 2.10	99.19		
High QC		200	200.75 \pm 9.70	100.37	100	101.50 \pm 3.47	101.50		

3.2. Animal study

3.2.1. Pharmacokinetic profile of MH84 in mouse plasma and brain tissue

The pharmacokinetic profile of MH84 in plasma and brain was compiled by plotting of the mean measured concentration against the investigated time point. Based on the concentration/time curves the pharmacokinetic parameters such as maximum concentration and time (C_{max} and T_{max}) for plasma and brain tissue as well as the area under the curve until 48 h ($\text{AUC}_{48\text{ h}}$), area under the first moment curve ($\text{AUMC}_{48\text{ h}}$) and others were calculated for plasma by non-compartmental analysis (Tables 6 and 7) using PKSolver2.0 (China) [25].

A clear difference between the two pharmacokinetic profiles can be seen (Fig. 2). In plasma, the MH84 concentration reaches the maximum concentration of 10.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3 h after gavage, followed

Table 6
 C_{max} and T_{max} of MH84 in mouse plasma (left) and appropriated mouse brain tissue (right) after single oral gavage of 12 mg/kg MH84.

Plasma		Brain	
C_{max} [$\mu\text{g}/\text{ml}$ plasma]	10.90	C_{max} [ng/g brain]	320.64
T_{max} [h]	3.00	T_{max} [h]	1.50–6.00

Table 7
Pharmacokinetic parameters of MH84 in plasma obtained by PKSolver2.0.

Plasma	
$\text{AUC}_{48\text{ h}}$ [$\mu\text{g h}/\text{ml}$]	89.58
$\text{AUMC}_{48\text{ h}}$ [$\mu\text{g h}^2/\text{ml}$]	560.73
$\text{MRT}_{48\text{ h}}$ [h]	6.26
$t_{1/2}$ [h]	3.24
CL [ml/min/kg]	2.23
Vd [l/kg]	0.63

by a permanent decrease to very low concentrations (150 ng/ml) at 24 h and almost zero at 48 h. In brain, a constant concentration of 300–320 ng/g was found between 1.5 and 6 h after oral gavage. The concentration decreases more slowly in comparison to the plasma levels. After 12 h approximately two-thirds of the maximum value was found and even after 48 h, MH84 was detectable, but not quantifiable, in the brain tissue.

3.2.2. Long-term accumulation study

The results of the pharmacokinetic study showed that the concentrations of MH84 in plasma and brain tissue were near LLOQ 24 h after oral gavage. In brain, the LLOD of MH84 was reached after 48 h. Therefore it was necessary to investigate whether these small concentrations would accumulate during long-term daily gavage. Six animals were treated with MH84 for 21 days by oral gavage of 12 mg/kg. This is consistent with the dose in the pharmacokinetic study.

At the end of the study, all animals were healthy, no side effects had been observed. No accumulation of MH84 was found in plasma or brain tissue after 21 days of oral gavage. The samples were collected approximately 20 h after the last oral dose. In most samples the MH84 concentration hardly exceeded the LLOQ. The measured concentrations were slightly higher than these obtained in the pharmacokinetic study after 24 h and in accordance to the reduced time to last oral gavage (Table 8).

4. Discussion

MH84 is known to modulate the γ -secretase and to activate PPAR γ *in vitro*, it was thus reasonable to determine the pharmacokinetic profile of this promising pharmacological compound in mice. Therefore, it was necessary to develop a sensitive bio-analytical method for the quantification of MH84 in plasma and

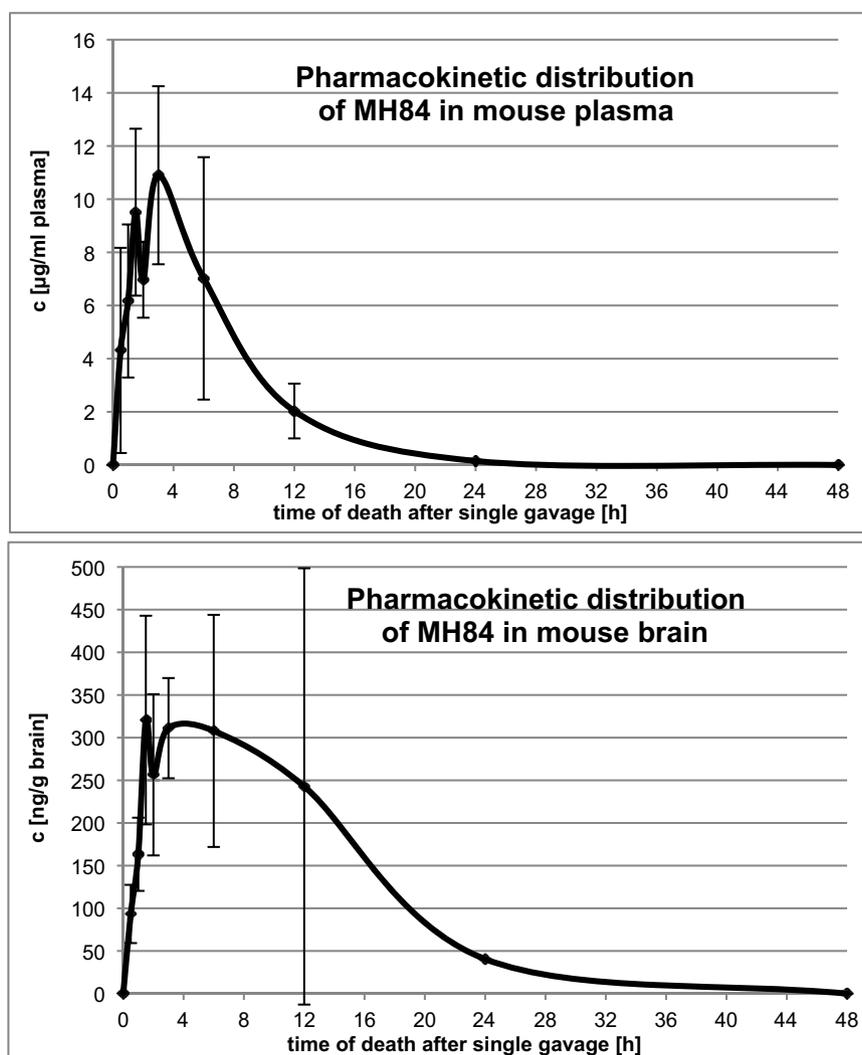


Fig. 2. Pharmacokinetic profiles of MH84 in mouse plasma (left) and corresponding mouse brain tissue (right) after a single oral gavage of 12 mg/kg MH84; for all time points between 0.5 and 6 h of the pharmacokinetic profile at least 5 of 6 animals were used for statistical analysis. The mean concentration at 12 h consists of 4 values for plasma and brain. After 24 h, only one animal reached the LLOQ for plasma and brain tissue analysis. The concentrations of the other animals were below the quantification limits, but above the LLOD.

brain tissue. The new LC–MS method was characterized by a low LLOQ in plasma (1.44 ng/ml) and brain tissue (0.76 ng/ml). Linearity was reached between 2 and 25 ng/ml as well as between 20 and 250 ng/ml. According to the FDA guideline for bioanalytical method validation, this method was investigated for accuracy and precision. As required, all results fulfilled a maximal deviation of 15%. A nearly quantitative mean value of 94–104% for all investigated concentrations was found by determining the extraction recovery. MH84 was tested for stability in stock solution, after processing, during long-term freezing and after repeated freeze–thaw cycles with no evidence for instability. The used LC–MS method including

sample processing procedure for plasma and brain tissue fulfilled all FDA requirements.

Essential for all drug candidates in AD treatment is the ability to reach the site of action; more precisely, to overcome the blood brain barrier and to reach the brain. Our investigation shows a fast absorption of MH84 into the circulating plasma after a single oral dose of 12 mg/kg resulting in maximum plasma concentrations of 10.90 µg/ml within 3 h (Fig. 3). Furthermore, we described target tissue levels of MH84 after oral application. Interestingly, we found a rapid increase in brain tissue concentrations, but, compared to plasma, the decrease was delayed. The results show that the MH84 reaches C_{max} quickly in the CNS and leaves the CNS rather slowly within 48 h. This raised the question, if MH84 can be expected to accumulate in the brain tissue. However, in a small cohort of 6 mice, no accumulation was found after 21 days when MH84 was administered daily by oral gavage at a concentration of 12 mg/kg.

The maximal CNS concentration of MH84 obtained in the pharmacokinetic profile was 320.64 ng/g brain tissue, which corresponds to 0.53 µM assuming a density of brain matrix of 1 g/ml. A direct comparison of the concentrations used in the *in vitro* pharmacological studies and our *in vivo* determined maximum plasma and brain concentrations of MH84 after oral administration shows

Table 8

Mouse plasma and appropriated brain tissue concentrations after 21 days of daily oral gavage of 12 mg/kg MH84.

Animal	c [ng/ml plasma]	c [ng/g brain]
1	85.04	35.19
2	55.55	29.65
3	54.94	22.58
4	50.96	20.65
5	162.89	24.17
6	<LLOQ	21.40

that the *in vivo* brain concentrations are not as high as the concentrations used *in vitro* MH84 (γ -secretase: $IC_{50}(A\beta_{42}) = 6.0 \mu M$; $EC_{50}(A\beta_{38}) = 1.8 \mu M$ and $PPAR\gamma$: $EC_{50} = 11.0 \mu M$, max. activation: 112%). Nevertheless, we must bear in mind, that we determined average concentrations of MH84 in the whole brain tissue. Local concentrations in different cerebral and cellular compartments might be even higher. The lipophilic properties of MH84 may allow an accumulation in different brain regions, but also in cell or nuclear membranes.

In summary, MH84, a new γ -secretase modulator and $PPAR\gamma$ activator, reaches different plasma and brain levels after a single dose oral application with significant differences in the pharmacokinetic behavior. The present data are the basis for further investigations concerning the efficacy of this compound in AD treatment.

5. Conclusion

The sensitive LC–MS method described here was developed and validated according to the FDA guideline for bioanalytical method validation. The method fulfilled all characteristics for accurate and precise sample measurement. MH84 remained stable in all determinations of the validation process. Due to these results it was possible to perform and analyze a first *in vivo* study for the determination of the pharmacokinetics and bioavailability of MH84 in the CNS after oral gavage of 12 mg/kg MH84. The presented method is suitable for the analysis of further preclinical and clinical studies. Therefore it is planned to perform a pharmacodynamic study to analyze the efficacy of MH84 in mouse brain.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. Brigitte Held (Goethe-University, Frankfurt) for English proof reading.

References

- [1] J. Rogers, L.F. Lue, Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 39 (2001) 333–340.
- [2] Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C.-X. Gong, Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes, *J. Pathol.* 225 (2011) 54–62.
- [3] M. Hieke, J. Ness, R. Steri, M. Dittrich, C. Greiner, O. Werz, K. Baumann, M. Schubert-Zsilavecz, S. Weggen, H. Zettl, Design, synthesis, and biological evaluation of a novel class of γ -secretase modulators with $PPAR\gamma$ activity, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 4691–4700.
- [4] C. Haass, M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature* 359 (1992) 322–325.
- [5] T.E. Golde, X.D. Cai, M. Shoji, S.G. Younkin, Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APPS linked to familial Alzheimer's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695 (1993) 103–108.
- [6] M. Cernescu, T. Stark, E. Kalden, C. Kurz, K. Leuner, T. Deller, M. Göbel, G.P. Eckert, B. Brutschy, Laser-induced liquid bead ion desorption mass spectrometry: an approach to precisely monitor the oligomerization of the β -amyloid peptide, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5276–5284.
- [7] K.E. Marshall, R. Marchante, W.-F. Xue, L.C. Serpell, The relationship between amyloid structure and cytotoxicity, *Prion* 8 (2014).
- [8] B. de Strooper, W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, R. Kopan, A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain, *Nature* 398 (1999) 518–522.
- [9] S. Weggen, J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde, E.H. Koo, A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity, *Nature* 414 (2001) 212–216.
- [10] S. Kersten, B. Desvergne, W. Wahli, Roles of PPARs in health and disease, *Nature* 405 (2000) 421–424.
- [11] S. Rossmner, M. Sastre, K. Bourne, S.F. Lichtenthaler, Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression—implications for Alzheimer's disease, *Prog. Neurobiol.* 79 (2006) 95–111.
- [12] M. Yamanaka, T. Ishikawa, A. Griep, D. Axt, M.P. Kummer, M.T. Heneka, $PPAR\gamma/RXR\alpha$ -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice, *J. Neurosci.* 32 (2012) 17321–17331.
- [13] C. Jiang, A.T. Ting, B. Seed, $PPAR$ -gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature* 391 (1998) 82–86.
- [14] M. Ricote, A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, C.K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* 391 (1998) 79–82.
- [15] L. Arnaud, N.K. Robakis, M.E. Figueiredo-Pereira, It may take inflammation, phosphorylation and ubiquitination to 'tangle' in Alzheimer's disease, *Neurodegener. Dis.* 3 (2006) 313–319.
- [16] W.G. Wood, L. Li, W.E. Müller, G.P. Eckert, Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis, *J. Neurochem.* 129 (2014) 559–572.
- [17] R. Deane, A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M.B. Finn, D.M. Holtzman, B.V. Zlokovic, apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 4002–4013.
- [18] A. Chawla, W.A. Boisvert, C.H. Lee, B.A. Laffitte, Y. Barak, S.B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P.A. Edwards, L.K. Curtiss, R.M. Evans, P. Tontonoz, A $PPAR$ gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis, *Mol. Cell.* 7 (2001) 161–171.
- [19] S.E. Wahrle, H. Jiang, M. Parsadanian, J. Kim, A. Li, A. Knoten, S. Jain, V. Hirsch-Reinschagen, C.L. Wellington, K.R. Bales, S.M. Paul, D.M. Holtzman, Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 671–682.
- [20] A. Ott, R.P. Stolk, F. van Harskamp, H.A. Pols, A. Hofman, M.M. Breteler, Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study, *Neurology* 53 (1999) 1937–1942.
- [21] L. Frölich, D. Blum-Degen, P. Riederer, S. Hoyer, A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893 (1999) 290–293.
- [22] D.G. Cook, J.B. Leverenz, P.J. McMillan, J.J. Kulstad, S. Eriksen, R.A. Roth, G.D. Schellenberg, L.-W. Jin, K.S. Kovachina, S. Craft, Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele, *Am. J. Pathol.* 162 (2003) 313–319.
- [23] Q. Quan, J. Wang, X. Li, Y. Wang, Ginsenoside Rg1 decreases $A\beta(1-42)$ level by upregulating $PPAR$ (and IDE expression in the hippocampus of a rat model of Alzheimer's disease, *PLoS ONE* 8 (2013) e59155.
- [24] FDA, www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf
- [25] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie, P.K. Solver, An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel, *Comput. Methods Programs Biomed.* 99 (2010) 306–314.