

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät  
für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-  
Universität München**



**Charakterisierung von Sterol-Biosynthese-Inhibitoren und  
Entwicklung von Methoden für die moderne Spurenanalytik**

Christoph Anton Müller

aus

Altötting

2013

### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. F. Bracher betreut.

### Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 14.11.2013

Christoph Müller

Dissertation eingereicht am 14.11.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Bracher
2. Gutachter: Prof. Dr. Franz Paintner

Mündliche Prüfung am 20.12.2013



„Mit viel Mühe haben wir gelernt, wie man destilliert, kristallisiert und rekristallisiert,  
und nun kommen sie daher und gießen das Zeug einfach durch ein kleines Rohr“

Heinrich Otto Wieland



*Meiner Familie*



# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Bracher für die stets großzügige Unterstützung und Förderung aller Projekte.

Ebenso gilt mein Dank den Mitgliedern der Prüfungskommission, insbesondere Herrn Prof. Dr. Franz Paintner für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt meinen „Analytik-Mentoren“ Florian Plöchl, Martin Giera und Günter Löffelmann.

Meinen Masteranden Verena Staudacher und Florian Vetter möchte ich danken, dass sie mich trotz gelegentlich sprachlicher Barrieren gut in meiner Arbeit unterstützt haben. Ich freue mich für sie, dass sie beide selbst gute Arbeiten abgeben konnten und ich sie für die Analytik begeistern konnte.

Danke auch an meine Kollegen, die mich immer fleißig mit Testsubstanzen versorgt haben (Marco Keller, Mathias König, Christoph Mayer, Jürgen Krauss, Sandra Hemmers, Annette Wolfgardt und Melanie Hass).

Ferner danke ich auch meinen lieben „Mitbewohnern“ des zweiten Stockes für all die lustigen Kaffeerunden und für eure rege Anteilnahme an Diskussionen (Katrin König, Mathias König, Florian Plöchl, Marco Keller, Loisl Plodek, Nicholas Bartl, Christian Aigner). Danke auch an die fleißigen technischen Angestellten, Martina Stadler, Tanja Höft, Uschi Kopp und Monika Klimt für die Durchführung des Agar-Diffusionstest und MTT-Test, sowie für das Einwiegen, Kopieren, Chemikalien holen, Spülen und Autoklavieren.

An dieser Stelle möchte ich auch all meinen Kooperationspartnern danken, die meine Arbeit mit unterschiedlichsten Fragestellungen bereicherten:

Prof. Dr. Peter Imming, Aline Horling und Richard Barthel von der pharmazeutischen Chemie der Universität Halle-Wittenberg,

Dr. Steffen Rupp, Dr. Ekkehard Hiller, Petra Keller und Isabel Engelhardt vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart,

Dr. Ulrike Binder und Elisabeth Maurer von der Sektion für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Innsbruck.

Prof. Dr. Elmar Richter vom Walther-Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie München,

Prof. Dr. Martin Biel, Prof. Dr. Christian Wahl-Schott und Christian Grimm vom Department Pharmazie Zentrum für Pharmaforschung und Center for Integrated Protein Science München.

Der ganzen Familie Lüftenegger/Rieger möchte ich danken, dass sie mich so herzlich in ihrer Familie aufgenommen haben und mich in allen Belangen unterstützten.

Für mein Leben möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. M. Führer und Frau Prof. Dr. C. Bender-Götze bedanken.

Einen besonderen Stellenwert haben meine Eltern, die sich in den schwierigsten Zeiten um mich kümmerten und dafür sorgen, dass aus ihrem Bua „was Vernünftiges“ wird.

Danke nochmals an alle die mich mit ihrer Hilfe, Unterstützung und ihrem Verständnis in den letzten Jahren begleitet haben (FCB-Freundealbum!).



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>STEROL-BIOSYNTHESE-TESTUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Entwicklung neuer Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren .....</b>	<b>18</b>
1.2.1	Oxidosqualencyclase-Inhibitoren, erste Generation .....	35
1.2.1.1	Zusammenfassung .....	35
1.2.1.2	Artikel.....	38
1.2.1.3	Beitrag am Artikel .....	45
1.2.2	Oxidosqualencyclase-Inhibitoren, zweite Generation .....	46
1.2.2.1	Zusammenfassung .....	46
1.2.2.2	Vortrag.....	47
1.2.2.3	Beitrag an den im Vortrag präsentierten Forschungsergebnissen .....	52
1.2.3	Oxidosqualencyclase-Inhibitoren, dritte Generation .....	53
1.2.3.1	Zusammenfassung .....	53
1.2.3.2	Poster .....	56
1.2.3.3	Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen .....	57
1.2.4	Inhibitoren der $\Delta^{24}$ -Reduktase .....	58
1.2.4.1	Zusammenfassung .....	58
1.2.4.2	Poster .....	60
1.2.4.3	Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen .....	61
1.2.5	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren von Mathias König .....	62
1.2.5.1	Zusammenfassung .....	62
1.2.5.2	Artikel.....	64
1.2.5.3	Beitrag am Artikel .....	83
1.2.6	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren von Melanie Krojer .....	84
1.2.6.1	Zusammenfassung .....	84
1.2.6.2	Artikel.....	86
1.2.6.3	Beitrag am Artikel .....	101
1.2.7	7-Dehydrocholesterolreduktase-Inhibitoren .....	102
1.2.7.1	Zusammenfassung .....	102
1.2.7.2	Artikel.....	104
1.2.7.3	Beitrag am Artikel .....	110
1.2.8	Diskussion zur Cholesterol-Biosynthese-Testung .....	111

<b>1.3</b>	<b>Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren.....</b>	<b>117</b>
1.3.1	Entwicklung eines Testsystems zur Charakterisierung von Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren .....	125
1.3.1.1	Zusammenfassung .....	125
1.3.1.2	Artikel.....	128
1.3.1.3	Beitrag am Artikel .....	139
1.3.2	Charakterisierung neuer Antimykotika.....	140
1.3.2.1	EMC120B12 als Inhibitor der C14-Demethylase und Identifizierung neuer Sterole in <i>Candida krusei</i> .....	140
2.3.2.1.1	EMC120B12 als Inhibitor der C14-Demethylase .....	140
2.3.2.1.1.1	Zusammenfassung.....	140
2.3.2.1.1.2	Poster .....	144
2.3.2.1.1.3	Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen.....	145
2.3.2.1.2	Identifizierung neuer Sterole in <i>Candida krusei</i> nach Inkubation mit EMC120B12 .....	146
2.3.2.1.2.1	Zusammenfassung.....	146
2.3.2.1.2.2	Poster .....	161
2.3.2.1.2.3	Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen.....	162
1.3.2.2	Inhibitoren der $\Delta^{14}$ -Reduktase und der $\Delta^{8/7}$ -Isomerase .....	163
1.3.2.2.1	Zusammenfassung .....	163
1.3.2.2.2	Artikel .....	166
1.3.2.2.3	Beitrag am Artikel .....	174
1.3.2.3	Antimykotisch aktive Imidazolderivate.....	175
1.3.2.3.1	Zusammenfassung .....	175
1.3.2.3.2	Artikel .....	178
1.3.2.3.3	Beitrag am Artikel .....	188
1.3.3	Einfluss von unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf das Sterolmuster von <i>Aspergillus spp.</i> .....	189
1.3.3.1	Zusammenfassung .....	189
1.3.3.2	Poster .....	191
1.3.3.3	Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen .....	192
1.3.4	Diskussion zur Ergosterol-Biosynthese-Testung.....	193



<b>2</b>	<b>STUDIEN ZU MATRIX-INDUZIERTEN EFFEKTEN IN DER GC .....</b>	<b>197</b>
<b>3</b>	<b>METHODENKONZEPTE FÜR DIE SPURENANALYTIK .....</b>	<b>207</b>
3.1	Einleitung .....	207
3.2	Bestimmung von Tabakalkaloiden in komplexen Matrices .....	215
3.2.1	Einleitung .....	215
3.2.2	Methodenkonzept: Festphasenmikroextraktion .....	218
3.2.2.1	Zusammenfassung .....	218
3.2.2.2	Artikel.....	221
3.2.2.3	Beitrag am Artikel .....	226
3.3	Bestimmung von Cholesterol in Mäuseleber .....	227
3.3.1	Einleitung .....	227
3.3.2	Methodenkonzept: Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	229
3.3.2.1	Zusammenfassung .....	229
3.3.2.2	Artikel.....	233
3.3.2.3	Beitrag am Artikel .....	233
3.4	Diskussion zur Spurenanalytik.....	234
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER GESAMTEN ARBEIT .....</b>	<b>237</b>
<b>5</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>241</b>
5.1	Abkürzungsverzeichnis .....	241
5.2	Literaturverzeichnis .....	245
<b>6</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>251</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>255</b>



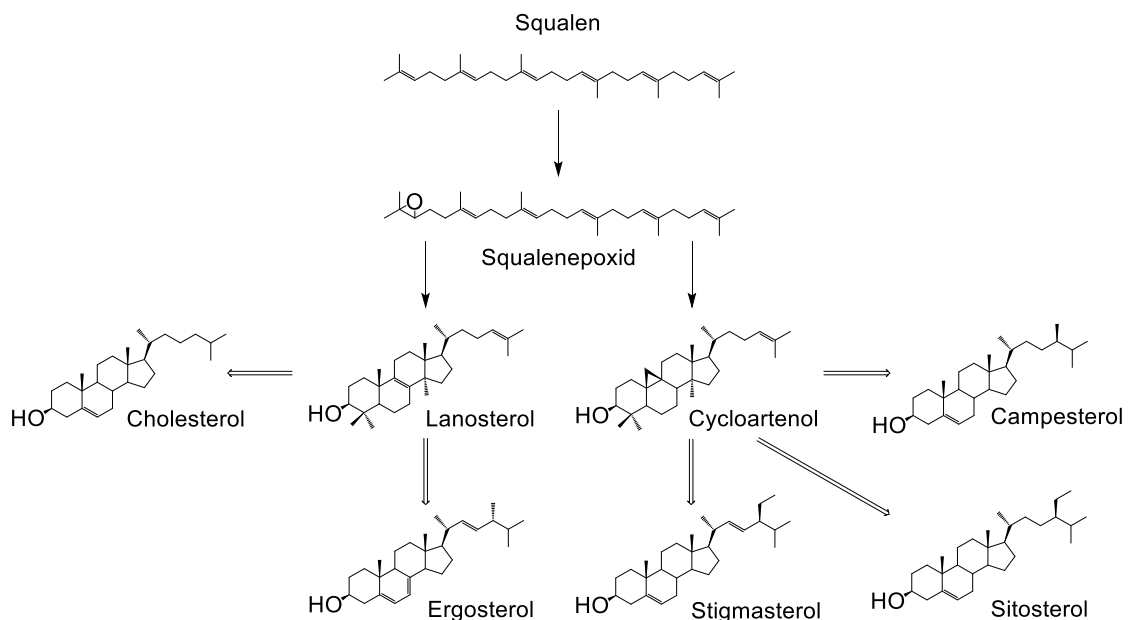
# 1 Sterol-Biosynthese-Testung

Das Kapitel 1, Sterol-Biosynthese-Testung, ist ein Teil der zwei großen Abschnitte meiner Arbeit, neben dem Kapitel 3. Das Kapitel ist in zwei große Teilbereiche untergliedert, Kapitel 1.2 behandelt die Identifizierung neuer Enzym-Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese anhand eines Testsystems, entwickelt von Martin Giera [1, 2]. Das Kapitel 1.3 befasst sich mit der Entwicklung eines neuen Testsystems zur Charakterisierung von Enzym-Inhibitoren des Post-Lanosterol-Abschnitts der Ergosterol-Biosynthese und dessen Anwendung. Beide Kapitel tragen einen wesentlichen Teil zur vollständigen Charakterisierung von Inhibitoren der Sterol-Biosynthese bei.

## 1.1 Einleitung

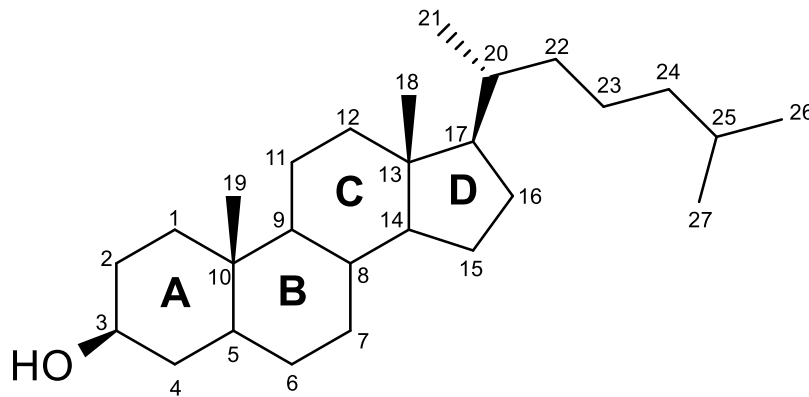
In allen eukaryotischen Organismen spielen Sterole eine wichtige physiologische Rolle. Eine Beeinflussung der Sterol-Biosynthese führt zwangsläufig zur Veränderung der Organismen.

Squalenepoxid, ein Triterpen, gebildet aus sechs aktivierten Isopreneinheiten, stellt die letzte gemeinsame Zwischenstufe in der Sterol-Biosynthese bei *Plantae* (Pflanzen) und *Mammalia/Fungi* (Säugetiere/Pilze) dar. Das letzte gemeinsame Sterol unter physiologischen Bedingungen ist bei Säugetieren und Pilzen das Lanosterol (siehe Abbildung 1) [3].



**Abbildung 1:** Sterol-Biosynthesewege in *Mammalia*, *Fungi*, *Plantae*.

Der Abschnitt „Sterol-Biosynthese-Testung“ befasst sich ausgiebig mit der Struktur von verschiedenen Sterolen und deren Modifikationen. Zum besseren Verständnis wird kurz auf die Nummerierung nach IUPAC und auf die Stereochemie des Sterol-Gerüsts am Beispiel Lanosterol eingegangen (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Nummerierung von Dihydrocholesterol nach IUPAC

Die vier Ringe des Sterol-Gerüsts sind *all-trans*-verknüpft. Die Cyclohexanringe A, B und C sind bei gesättigten Sterolen in der Sesselkonformation aneinander kondensiert. Durch die *trans*-Verknüpfung ist eine fast spannungsfreie All-Sessel-Konformation möglich. Die Hydroxy-Gruppe in Position C3, die Methyl-Gruppen an C10 und C13, sowie die Seitenkette ausgehend von C17 sind  $\beta$ -ständig. Es gibt 8 asymmetrische Kohlenstoffatome C3, C8, C9, C10, C13, C14, C17 und C20, dadurch sind theoretisch 256 verschiedene Stereoisomere möglich. Die Natur selbst synthetisiert nur ein bestimmtes, stereochemisch eindeutig definiertes Endprodukt in ihrer Biosynthese. Woodward et al. [4]schafften es, dies der Natur gleich zu tun. Sie konnten in den Jahren 1951/52 erstmals Cholesterol totalsynthetisch herstellen. Diese Leistung muss bis heute honoriert werden, nicht nur wegen der damaligen Laborausstattung, sondern auch aufgrund der komplexen Stereochemie. Die IUPAC Bezeichnung von Dihydrocholesterol (Trivialname) ist Cholestan-3 $\beta$ -ol. Da in allen physiologisch vorkommenden Sterolen die Hydroxygruppe in Position C3  $\beta$ -ständig ist, wird in der nachfolgenden Arbeit auf eine genauere Konfigurationsangabe der 3 $\beta$ -Hydroxygruppe verzichtet.

Pharmazeutisch relevante Gründe für die Entwicklung und Erforschung neuer Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren sind:

- Entwicklung neuer Cholesterol-/Lipidsenker (siehe Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3)
- Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Erforschung von Cholesterol-Biosynthese induzierten Pathogenesen (siehe Kapitel 1.2.4, 1.2.5, 1.2.7)
- Entwicklung von Chemotherapeutika (siehe Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3)

Die Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren hat folgende Gründe:

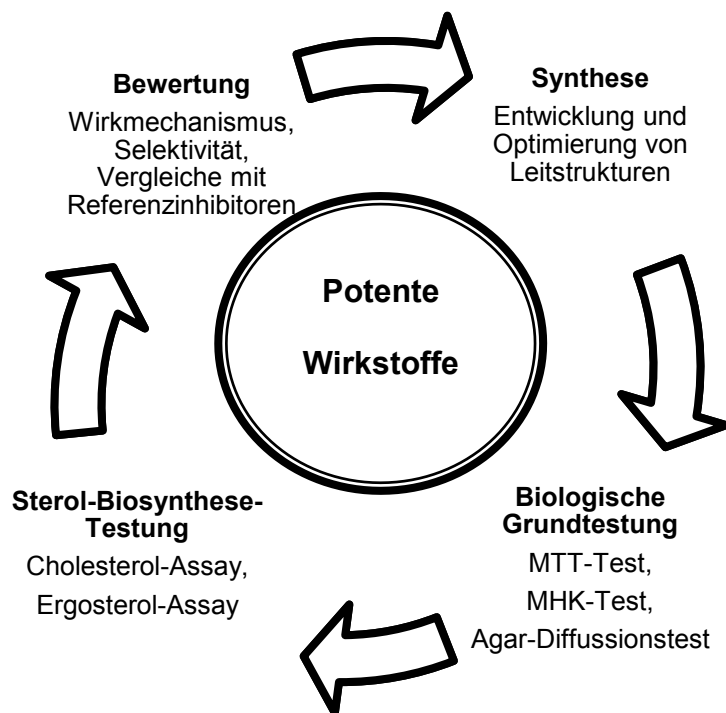
- Entwicklung neuer Antimykotika (siehe Kapitel 1.3.1, 1.3.2)
- Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Erforschung von Ergosterol-Biosynthese-Wegen in unterschiedlichen Pilzen bzw. unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (siehe Kapitel 1.3.3)

Die Gründe für die Entwicklung neuer Phytosterol-Inhibitoren sind:

- Entwicklung neuer Herbizide
- Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Erforschung von Phytosterol-Biosynthese-Wegen in unterschiedlichen Pflanzen bzw. unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Im Hinblick auf die pharmazeutische Verwendung von neu synthetisierten Substanzen und den schwierigen Anzuchtsbedingungen von Pflanzenzelllinien, war das eindeutige Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Charakterisierung neuer Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren.

Die Charakterisierung einer neu synthetisierten oder isolierten Verbindung erfolgte in meiner Arbeit immer in gleicher Weise (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Fließschema zur Entwicklung neuer Cholesterol bzw. Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren

Nach der Synthese der Substanzen (durchgeführt von Kollegen in unserem oder einem anderen Arbeitskreis) wurden diese zuerst einer biologischen Grundtestung unterworfen. Dabei diente ein MTT-Test an HL60-Zellen (humane promyelocytische Leukämie Zellen) zur Erkennung von zytotoxischen Effekten. Die Effekte gelten solange als unspezifisch bis ihr Wirkmechanismus geklärt ist, gleiches gilt für den MHK-Test und für den Agar-Diffusionstest. Auch diese beiden Tests dienen nur zur Erkennung einer Zytotoxizität. Wünschenswert bei der Entwicklung von neuen Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren ist, dass die Verbindungen eine geringe, idealerweise überhaupt keine Toxizität aufweisen. Im Gegensatz dazu sollten neu entwickelte Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren eine hohe fungale Toxizität gegenüber Pilzzellen mit einer geringen Zytotoxizität gegenüber menschlichen Zellen haben. Die MHK-Bestimmung (minimale Hemmkonzentration) wurde an drei verschiedenen Pilzzelllinien (*Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) durchgeführt. Dieser Test beruht auf einer DIN-Norm [5] und dient zur Erkennung und Einordnung einer vorerst noch nicht spezifizierten antimykotischen Aktivität. Der Agar-Diffusionstest wurde an Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas antimicrobia*, *Staphylococcus equorum*, *Streptococcus entericus*) und an Pilzen (*Aspergillus niger*, *Candida glabrata*, *Hyphopichia burtonii*, *Yarrowia lipolytica*) durchgeführt. Er dient ebenfalls zur Identifizierung von einer vorerst noch nicht spezifizierten antimykotischen und antibakterieller Aktivität. Anschließend wurden die Substanzen der Sterol-Biosynthese-Testung unterworfen, um in beiden Testsystemen die Aktivität und

Selektivität der Substanzen zu überprüfen. Ziel ist es, eine Substanz zu etablieren die entweder nur im Pilz oder nur an humanen Zellen wirkt. Nach dem allgemeinen Screening mit den Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese-Assays und der Identifizierung des inhibierten Enzyms oder der inhibierten Enzyme (sogenannte Multienzymhemmung) im Post-Squalen- (human) bzw. im Post-Lanosterol-Abschnitt (fungal), wurden die besten/interessantesten Substanzen einer quantitativen Bestimmung der biologischen Aktivität unterzogen. Dabei wurde geprüft wie stark das Vermögen einer Substanz ist, in einem zellulären System die Neubildung von Cholesterol bzw. Ergosterol zu unterdrücken.

Abschließend erfolgte die Bewertung der Substanz nach den aufgeführten Kriterien:

- Ist die Substanz ein Inhibitor der Sterol-Biosynthese?
- Hemmt die Substanz selektiv die Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese?
- Hemmt die Substanz selektiv ein bestimmtes Enzym?
- Ist die Selektivität auch in einem weitem Konzentrationsbereich gegeben?
- Wie hoch ist die Zytotoxizität der Substanz im MTT-Test, wenn nur ein Enzym im Cholesterol-Assay gehemmt wurde?
- Wie hoch ist die Zytotoxizität der Substanz im MHK-Test bzw. Agar-Diffusions-Test, wenn eine Hemmung im Ergosterol-Assay vorliegt?
- Gibt es bereits Inhibitoren die das gleiche Enzym inhibieren?
- Wo liegt der Nutzen der Substanz gegenüber Referenzinhibitoren?
- Können aus der Testung einer größeren Zahl strukturverwandter Substanzen Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden?

War die Bewertung einer Substanz aus einer (sehr) kleinen Substanzbibliothek abgeschlossen musste entschieden werden ob es lohnend ist, Strukturvariationen an der Substanz vorzunehmen.

Gründe hierfür sind:

- Neue chemische Klasse von Inhibitoren eines bestimmten Enzyms (siehe Kapitel 1.2.1, 1.2.2)
- Erster selektiver Inhibitor eines bestimmten Enzyms (siehe Kapitel 1.2.5)
- Stärkere Aktivität einer Substanz als bekannte Referenzinhibitoren (siehe Kapitel 1.2.3, 1.2.7, 1.3.2.1)
- Neue wirksame Substanz, wobei keine Überlegenheit gegenüber Referenzinhibitoren beobachtet wurde und die chemische Klasse von Wirkverbindungen bereits bekannt ist. Jedoch handelt es sich um noch unveröffentlichte Strukturvariationen und/oder um kostengünstige Synthesen (vgl. Kapitel 1.3.2.2, 1.3.2.3)

## 1.2 Entwicklung neuer Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren

*„Cholesterol is the most highly decorated small molecule in biology“*

M. Brown und J. Goldstein, Nobelpreis-Vortrag 1985

Francois Poulletier de La Salle beschrieb 1789 zum ersten Mal die Verbindung Cholesterol. Die Entdeckung wird jedoch meist dem französischen Chemiker M. E. Chevreul 1815 zugeschrieben. Er fand die Substanz in humanen Gallensteinen und benannte sie nach den griechischen Worten „*chole*“ für Galle und „*stereos*“ für starr. Noch zu Lebzeiten Chevreuls etablierte der österreichische Botaniker und Chemiker F. Reinitzer die empirische Formel  $C_{27}H_{46}O$  für Cholesterol (1888). Im Jahre 1932 konnten die deutschen Chemiker H. Wieland und E. Dane die korrekte Struktur bestimmen [3, 6].

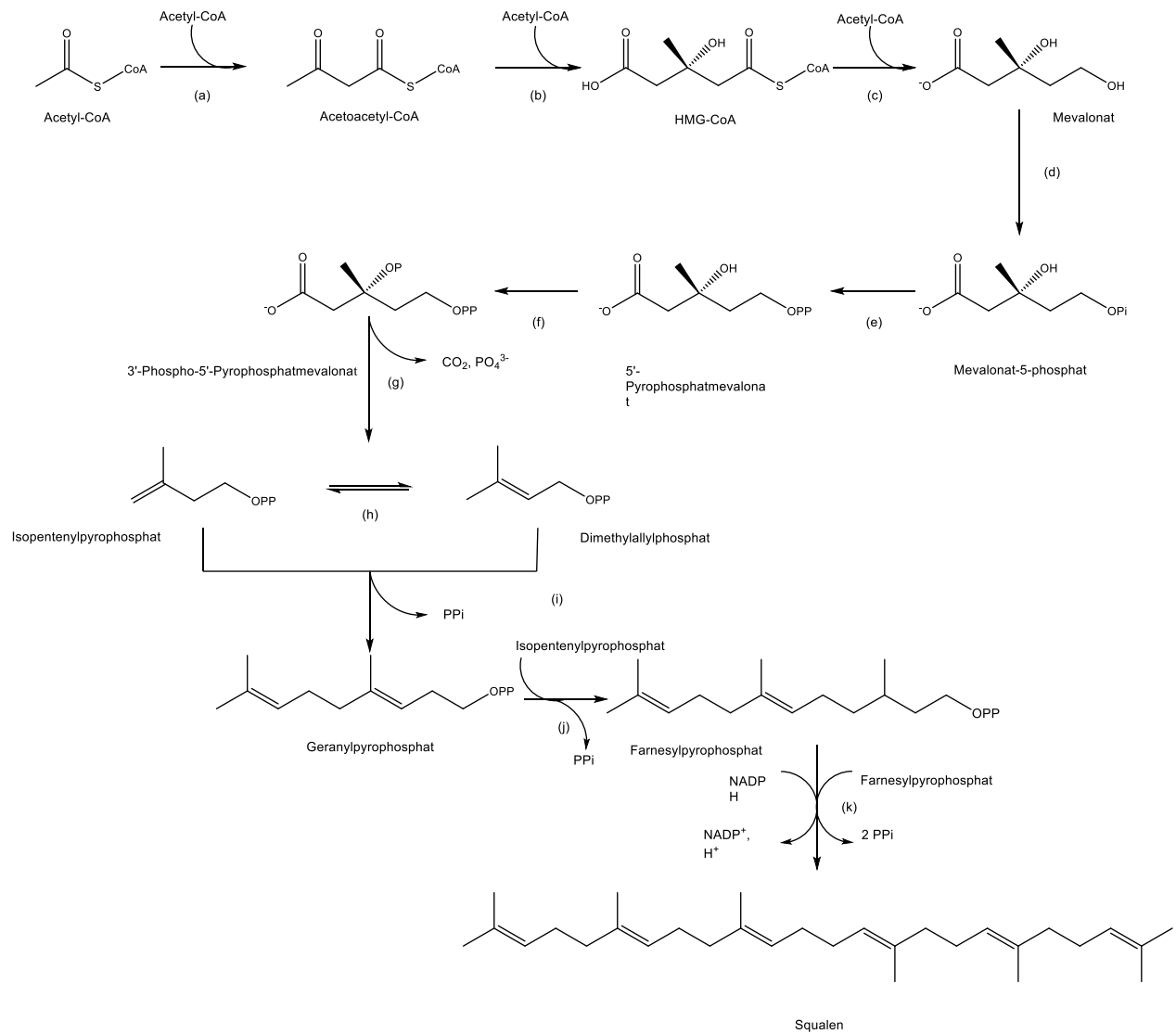
Cholesterol im menschlichen Organismus stammt entweder aus der Nahrung oder wird endogen synthetisiert. Von dem exogen zugeführten Cholesterol (500 mg pro Tag) gelangen ca. 40 % durch Resorption im Darm in den menschlichen Körper [7]. Cholesterol dient dabei als Baustein für die Zellmembran oder wird für die Hormon-/Gallensäuresynthese verwendet.

Ausgeschieden wird Cholesterol im Stuhl als unverändertes Cholesterol oder nach Oxidation als Gallensäuren, im Urin als Abbauprodukte von Nebennierenrinden-/Gonadenhormonen und über die Haut als Bestandteil der Zellmembran von abgestorbenen Hautzellen [7].

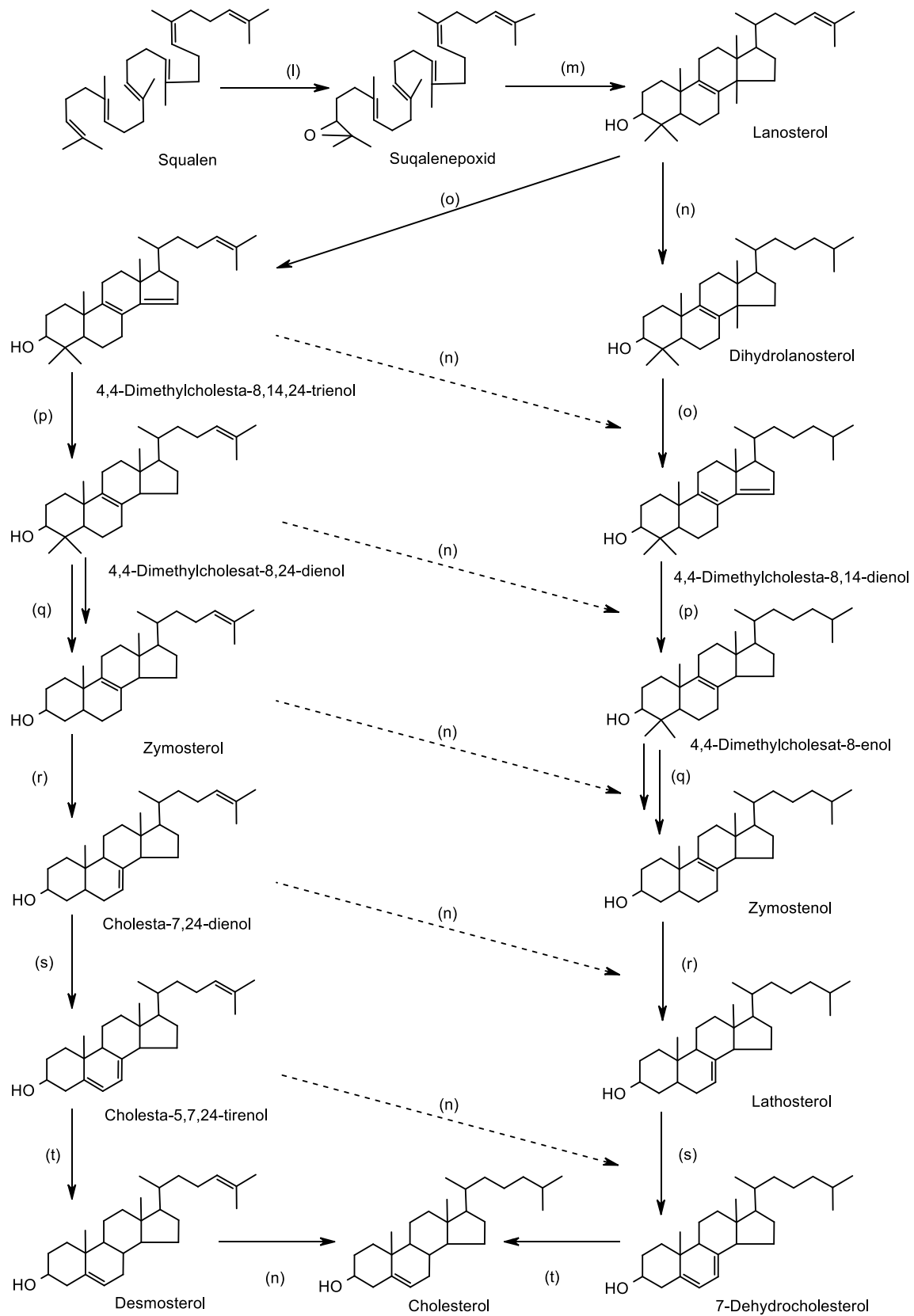
Das endogen gebildete Cholesterol wird aus 15-Acetat Einheiten über verschiedene Zwischenstufen hauptsächlich in der Leber gebildet [3]. Darüber hinaus wird Cholesterol noch in den Gonaden, im Gehirn und in der Darmschleimhaut synthetisiert [8]. Die Cholesterol-Biosynthese kann in zwei Teile aufgeteilt werden:

- Der erste Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese ist der Aufbau des Sterol-Grundgerüsts. Dieser Teil ist hinsichtlich der entstehenden Zwischenstufen mit der Ergosterol-Biosynthese in Pilzen identisch (Abbildung 4).
- Der zweite Teil der Biosynthese beschäftigt sich mit den Modifikationen des Sterol-Gerüsts, ausgehend von Squalen bis zum Endprodukt Cholesterol (Abbildung 5) [1, 9, 10].





**Abbildung 4:** Erster Abschnitt der Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese; beteiligte Enzyme siehe Tabelle 1



**Abbildung 5:** Zweiter Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese nach Giera [1]; beteiligte Enzyme siehe Tabelle 1

Abkürzung	Enzym	Assoziierte Krankheiten bei Defekt des Enzyms
(a)	Acetyl-CoA Acetyltransferase	-
(b)	HMG-CoA Synthase	-
(c)	HMG-CoA Reduktase	-
(d)	Mevalonatkinase	-
(e)	Mevalonatphosphatkinase	-
(f)	Mevalonatpyrophosphatkinase	-
(g)	Mevalonatpyrophosphatdecarboxylase	-
(h)	Isopentenylpyrophosphatisomerase	-
(i)	Geranylpyrophosphatsynthase	-
(j)	Farnesylphosphatsynthase	-
(k)	Squalensynthase	-
(l)	Squalenepoxidase	-
(m)	Oxidosqualencyclase (= Lanosterolsynthase)	-
(n)	$\Delta^{24}$ -Reduktase	Desmosterolose
(o)	Sterol-C14-Demethylase	Antley-Bixler-Syndrom
(p)	$\Delta^{14}$ -Reduktase	Greenberg- oder HEM-Dysplasie
(q)	C4-Demethylase Komplex	CHILD-Syndrom
(r)	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	CHILD-Syndrom, Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom (= CDPX2)
(s)	Lathosteroloxidase	Lathosterolose
(t)	7-Dehydrocholesterolreduktase	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom

**Tabelle 1:** Beteiligte Enzyme am Aufbau von Cholesterol und damit assoziierte Erbkrankheiten

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war die Charakterisierung von neuen Enzyminhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese. Insgesamt sind 9 verschiedene Enzyme an diesen Reaktionen beteiligt (siehe Tabelle 1, Enzyme l-t). Auf die Charakteristika der einzelnen Enzyme und deren Bedeutung als mögliche Targets wird im Folgenden kurz eingegangen.

## **BESCHREIBUNG DER ENZYME DES POST-SQUALEN-ABSCHNITTS DER CHOLESTEROL-BIOSYNTHESE:**

- **Squalenepoxidase (Enzym l)**

### Charakteristika:

Die Squalenepoxidase ist eine Epoxidase und lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum. Sie katalysiert die Oxidation von Squalen zum 2,3-Oxidosqualen (= Squalenepoxid; siehe Abbildung 5) [11, 12]. Für die Aktivität des Enzyms werden neben molekularem Sauerstoff, FAD (Flavinadenindinucleotid) und NADPH (= Nikotinamidadenindinucleotidphosphat) benötigt.

### Bedeutung:

Der Einsatz von Inhibitoren der Squalenepoxidase als Cholesterolsenker ist möglich. Eine hepatische Cholesterolsenkung und eine Verringerung der Gallensteinbildung konnte unter Einfluss von Inhibitoren beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil bei Inhibition dieses Enzyms liegt darin, dass die Squalenepoxidase (anders als viele andere Epoxidasen) nicht Cytochrom P450-abhängig ist und dass das akkumulierende Produkt Squalen für den Menschen als nicht toxisch (für Pilze ist es toxisch vgl. Terbinafin) und stabil gilt. Jedoch kam es unter Behandlung mit Squalenepoxidase-Inhibitoren zur Dermatitis, wahrscheinlich hervorgerufen durch Squalen-Einlagerung in Hautzellen. Neuropathien wurden ebenfalls diagnostiziert. Die Squalenepoxidase spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Cholesterol-Homöostase, da die Genexpression für dieses Enzym abhängig vom intrazellulären Sterolgehalt ist [11, 12, 13].

- **Oxidosqualencyclase (= Lanosterolsynthase, Enzym m)**

### Charakteristika:

Die Oxidosqualencyclase (OSC) ist ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysiert die Cyclisierungsreaktion von Squalenepoxid, einem linearen Triterpen, zum Lanosterol (siehe Abbildung 5). Der Ablauf der Reaktion kann in vier Phasen eingeteilt werden: a) korrekte Faltung des Squalenepoxids, b) durch Protonierung des Epoxidringes (=Oxiran) wird die Cyclisierungsreaktion initiiert, c) Bildung des Protosterolkations durch eine kaskadenartige Cyclisierungsreaktion und d) weitere Umlagerungsreaktionen unter Wanderung von Hydrid und Methylgruppen. Während der Reaktion bilden sich acht hochenergetische, carbokationische

Zwischenstufen, sogenannte *High Energy Intermediates* (HEI). Diese Zwischenstufen treten an C4, C8, C9, C10, C13, C14, C17 und C20 im fertigen Sterol auf (vgl. Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.5, 1.2.6) [13].

#### Bedeutung:

Die Oxidosqualencyclase ist nicht nur das Schlüsselenzym zwischen dem ersten und dem zweiten Teil der Cholesterol-Biosynthese, sondern sie katalysiert eine der bemerkenswertesten Monoenzymreaktionen überhaupt.

Die Gründe für die Entwicklung von Oxidosqualencyclase-Inhibitoren sind vielfältig. Am Anfang stand das Interesse an der Entwicklung neuer Cholesterol-senker im Vordergrund, da keine toxischen Sterole akkumulieren können, wie bei allen nachfolgenden Enzymen in der Cholesterol-Biosynthese. Bekannte Referenzinhibitoren zeigten a) eine Reduzierung des Gesamt-Cholesterol-Spiegels, b) eine Reduzierung der Gallensteinbildung, c) eine Hemmung bzw. eine „Down“ Regulierung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und d) eine Bildung von Epoxysterolen, welche für den Cholesterol-Efflux verantwortlich sind ohne dabei die Fettsäure-/Triglyceridsynthese zu aktivieren [13]. Als Nebenwirkungen traten eine erhöhte biliäre Phospholipidsekretion, Kataraktbildung, Hyperkeratose und Defekte in der enchondralen Ossifikation auf [11, 14]. Aufgrund des schlechten Nutzen-Risiko-Verhältnisses wurde spätestens 2005 die Entwicklung neuer OSC-Inhibitoren als Lipidsenker eingestellt.

Grinter et al. [15] führten 2011 Docking-Studien zur Identifizierung von „*small molecule*“ Rezeptortargets durch und stellten dabei fest, dass der OSC-Referenzinhibitor Ro 48-8071 als Wirkstoff für eine Krebstherapie in Frage kommen könnte. Folgende *in vitro* Untersuchungen (MTT-Test) an der humanen Brustkrebszelllinie BT-474 bestätigten dies [15]. Eine Arbeitsgruppe aus der Schweiz stellte 2012 in Kooperation mit der Pharmafirma F. Hoffmann-La Roche Ltd., welche früher OSC-Inhibitoren als Cholesterol-senker entwickelt hatte, OSC-Inhibitoren als neue Chemotherapeutika vor. Alleine und in Kombinationsgabe mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (Atorvastatin) waren insbesondere humane Glioblastome und tumorinduzierte angiogenetische Endothelzellen am sensitivsten [16]. Dadurch könnten die Heilungschancen von aggressiven Gehirntumoren oder anderen Krebsarten verbessert werden. Das bis dato bekannte Nebenwirkungsprofil von OSC-Inhibitoren könnte durch neu entwickelte Substanzen verbessert werden, zumal immer noch nicht genau geklärt ist, ob es sich um substanzspezifische oder klassenspezifische Nebenwirkungen handelt. Außerdem spielt ein schlechteres Nebenwirkungsprofil eine untergeordnete Rolle in der Tumorthherapie, solange der Tumor/Krebs effektiv behandelbar ist.

- **$\Delta^{24}$ -Reduktase** (Enzym n)

Charakteristika:

Die Reaktion von Lanosterol zu Dihydrolanosterol bzw. von Desmosterol zu Cholesterol wird von der  $\Delta^{24}$ -Reduktase katalysiert (siehe Abbildung 5), wobei Lanosterol eine höhere Affinität zum Enzym besitzt als Dihydrolanosterol. Die  $\Delta^{24}$ -Reduktase ist ebenfalls membranständig und Bestandteil einer FAD-abhängigen Oxidoreduktase. Die Reduktion der Doppelbindung erfolgt über die Addition eines Protons in Position C24, gefolgt von einer Hydridaddition aus NADPH in Position C25. Der Mechanismus folgt den Regeln von Markovnikov [1, 11].

Bedeutung:

Die Hemmung der  $\Delta^{24}$ -Reduktase ist selektiv auf Säugetierzellen, da dieses Enzym in Pilzen (Kapitel 1.3.1.2) und Pflanzen nicht vorkommt. Der Einsatz von  $\Delta^{24}$ -Reduktase-Inhibitoren als Chemotherapeutika gegenüber metastasierenden Melanomen mit hochregulierten  $\Delta^{24}$ -Reduktase-Genen ist vorstellbar [17]. Die Erbkrankheit Desmosterolose ist mit der Anreicherung von Desmosterol assoziiert, hervorgerufen durch eine nicht funktionstüchtige  $\Delta^{24}$ -Reduktase. Diese Erkrankung ist je nach Schweregrad perinatal tödlich (ein Fall von zwei bekannten Krankheitsfällen) oder postnatal zeichnet sich die Erkrankung durch Mikrozephalie und geistige Retardiertheit aus (zweiter Fall von zwei bekannten Krankheitsfällen). Eine gezielte Entwicklung von Inhibitoren als molekulartechnisches Werkzeug zur Erforschung der Desmosterolose ist nebensächlich, da bisher nur zwei erkrankte Patienten beschrieben sind [9, 11, 17].

- **Sterol-C14-Demethylase** (Enzym o)

Charakteristika:

Das Enzym ist ein Cytochrom P450 Enzym und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Es katalysiert die oxidative Abspaltung der Methylgruppe in Position C14 von Lanosterol und Dihydrolanosterol zu 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol bzw. zu 4,4-Dimethylcholesta-8,14-dienol (Abbildung 5). Die Reaktion läuft über die Bildung eines Alkohols an der Methylgruppe C14, gefolgt von einer Oxidation des Alkohols zum Aldehyd und dessen Abspaltung in Form von Ameisensäure ab. Dabei werden jeweils 3-mal Sauerstoff und NADPH verbraucht [1, 11, 18].

Bedeutung:

Die Sterol-C14-Demethylase dient meist als Target für die Entwicklung neuer Antimykotika mit Azolstruktur (siehe Kapitel 1.3.1, 1.3.2.1). Anwendungen gegen Protozoen sind beschrieben. Das Antley-Bixler-Syndrom Typ I, eine autosomale, rezessive Erbkrankheit, wird durch Funktionsunfähigkeit bzw. durch Fehlen des Enzyms hervorgerufen. Charakteristisch für dieses Syndrom sind Kraniosynostosen (frühe Verknöcherung der Schädeldecke), Hypoplasie des Mittelgesichts und Gelenkkontrakturen. Aleck und Bartley [19] berichten, dass es auch durch eine frühe Behandlung mit Fluconazol in der Schwangerschaft zum Auftreten des Syndroms gekommen ist. Es müssen keine speziellen Inhibitoren zur Erforschung des Syndroms entwickelt werden, da dafür aufgrund ihrer mangelnden Organismuselektivität Azolantimykotika eingesetzt werden können. Zudem sind nur 50 Fälle des Syndroms beschrieben [9, 11, 19].

- **$\Delta^{14}$ -Reduktase** (Enzym p)

Charakteristika:

Das Enzym katalysiert die Reduktion der Doppelbindung in Position C14/15. In einer NADPH-abhängigen Reaktion wird durch Protonierung an C15 zunächst als Zwischenstufe ein Allylkation (HEI) an C14 gebildet, dieses nimmt ein Hydrid aus dem NADPH auf. Es wird entweder 4,4-Dimethylcholesta-8,14-dienol zu 4,4-Dimethylcholesta-8-enol oder 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (FF-MAS; follicular fluid meiosis-activating sterol) zu 4,4-Dimethylcholesta-8,24-dienol (T-MAS; testis meiosis-activating sterol) (Abbildung 5) umgewandelt. Die Enzymreaktion kann von zwei verschiedenen Enzymen, codiert durch zwei unterschiedliche Gene, durchgeführt werden. Zum einen durch den Lamin B-Rezeptor (LBR) und zum anderen von der  $\Delta^{14}$ -Reduktase selbst. Der LBR ist ein bifunktionales Protein der inneren Kernmembran und mit zwei unterschiedlichen Domänen ausgestattet, eine für die Bindung von Lamin B und eine für die  $\Delta^{14}$ -Reduktase-Aktivität. Die Substrate besitzen jedoch eine höhere Affinität zum alleinigen Enzym [1, 11].

Bedeutung:

Greenberg et al. [20] beschrieb 1988 eine autosomal-rezessiv vererbte Skelettdysplasie, welche unter dem Namen *hydrops-ectopic calcification-moth-eaten* (HEM) Dysplasie oder nur als Greenberg Dysplasie bekannt ist. Derzeit sind weniger als 10 Fälle dokumentiert. Der Phänotyp der pränatal tödlichen Krankheit umfasst verkürzte Gliedmaßen, abnorme und disorganisierte Calcifizierung, Polydaktylie, sowie mottenfraß-artiges Aussehen der langen Knochen. Analysen des Knorpels zeigten erhöhte Cholesta-8,14-dienol- und Cholesta-8,14,24-trienol-Spiegel. Wassif et al. [21] zeigten, dass die Dysplasie nicht durch eine fehlerhafte Cholesterol-Biosynthese unter Beteiligung der  $\Delta^{14}$ -Reduktase hervorgerufen wird, sondern

vielmehr durch eine Fehlfunktion des Lamin-B-Rezeptors. Es wurden erhöhte Spiegel von  $\Delta^{14}$ -Sterolen in Mäusegehirnen mit deaktivierter  $\Delta^{14}$ -Reduktase (*knock-out*) gefunden, jedoch nicht in der Leber. Kommt es also zu einer Hemmung der Reduktase, hat diese Hemmung einen höheren Einfluss auf die Hirnfunktionen als eine Hemmung des LBR, da die Konzentration von unphysiologischen  $\Delta^{14}$ -Sterolen steigt. Daher ist die Inhibition der  $\Delta^{14}$ -Reduktase kein geeignetes Target für die Entwicklung eines neuen Lipidsenkers, da eine Beeinflussung der Gehirnhomöostase weitreichende Folgen hat [9, 11, 21]. Die Entwicklung von Inhibitoren zur Untersuchung der Greenberg Dysplasie *in vitro* scheint aufgrund der Inzidenz nicht relevant.

- **C4-Demethylase-Komplex** (Enzym q)

Charakteristika:

Der membrangebundene C4-Demethylase-Komplex entfernt in einer mehrstufigen Reaktion die zwei Methylgruppen in Position C4. Dadurch wird 4,4-Dimethylcholesta-8-enol zu Zymostenol bzw. 4,4-Dimethylcholesta-8,24-dienol zu Zymosterol umgewandelt (Abbildung 5). Zuerst kommt es zu einer Monohydroxylierung einer Methylgruppe, gefolgt von der Oxidation zum entsprechenden Aldehyd, katalysiert durch die C4-Methyloxidase. Es folgt eine oxidative Decarboxylierung mit gleichzeitiger Eliminierung des  $3\alpha$ -Wasserstoffes. Das entstandene Enol tautomerisiert in einer nicht-enzymatischen Reaktion zum 3-Keto-Sterol. Die verbliebene Methylgruppe in Position C4 wird nun in gleicher Weise abgespalten. Im letzten Schritt wird die 3-Keto-Gruppe reduziert zur  $3\beta$ -Hydroxy-Gruppe durch die Sterol-3-Reduktase. Die Bildung der 4-Carboxy-Sterole ist Sauerstoff- und NADPH-abhängig, die Decarboxylierung ist Sauerstoff unabhängig. Die Reaktion benötigt insgesamt jeweils sechs Moleküle Sauerstoff und NADPH. Im Unterschied zur Sterol-C14-Demethylase werden die Methylgruppen als Kohlenstoffdioxid abgebaut und nicht als Ameisensäure [1, 3, 18].

Bedeutung:

Das *congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects syndrome* (CHILD-Syndrom) ist ein X-chromosomal dominant vererbtes Epidermalnaevus-Syndrom mit meist rechtsseitiger Erythrodermie. Der Gendefekt liegt im Defekt des NSDHL-Gens, welches für die Sterol-Dehydrogenase oder Sterol-Decarboxylase kodiert. Die betroffenen Enzyme in der Cholesterol-Biosynthese sind der C4-Demethylase-Komplex und die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Das Syndrom ist für männliche Embryonen meist letal, daher tritt es postnatal fast ausschließlich bei Frauen auf. Das klinische Bild reicht von vereinzelt bis zur kompletten Körperhälfte scharf begrenzten Ichthyosen mit wachsender Schuppung. Hinzu kommen noch Kleinwuchs, Epiphysenverkalkung im Kleinkindalter, Alopezie und Anomalien der inneren Organe (meist auf der Seite der Ichthyose). Die Behandlung der Erkrankung erfolgt symptomatisch, bisher sind circa 60 Fälle bekannt (siehe Kapitel 1.2.5.2) [9, 22]. Rozman et al. [11] bewertete die Entwicklung von C4-Demethylase-Komplex-Inhibitoren als lipidsenkende Wirkstoffe als nicht



sinnvoll. Die Erforschung der Pathomechanismen des Syndroms könnte jedoch mit derartigen Inhibitoren gelingen.

- **$\Delta^{8/7}$ -Isomerase** (Enzym r)

Charakteristika:

Das *Emopamil-Binding-Protein* (EBP) ist ein Calcium-Rezeptor, an dem der Antagonist Emopamil bindet und ein Enzym in der Cholesterol-Biosynthese. Es katalysiert die Verschiebung der Doppelbindung von Position C8/9 nach C7/8. Dadurch entsteht aus Zymostenol Lathosterol und aus Zymosterol Cholesta-7,24-dienol (Abbildung 5). Die Reaktion benötigt weder Sauerstoff noch sonstige Cofaktoren. Ein Proton aus einem Wassermolekül wird an Position C9 addiert, gefolgt von einer Eliminierung des C7 Protons. Als Zwischenstufe entsteht ein Carbokation (HEI) in Position C8 [1, 11].

Bedeutung:

EBP gehört zu derselben Rezeptorenklasse wie die im Gehirn lokalisierten Rezeptoren Sigma 1 und Sigma 2. Da die strukturelle Ähnlichkeit zwischen beiden Rezeptortypen sehr hoch ist, ist der EBP-Rezeptor ein schlechtes Target für die Entwicklung von neuen Lipidsenkern, außer es können sehr hoch selektive Inhibitoren hergestellt werden. Die Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase könnte außerdem den Phänotyp bestimmter Erkrankungen wie CHILD und CDPX2 (*X-linked dominant chondrodysplasia punctata*) hervorrufen. Das CHILD-Syndrom wurde bereits bei Enzym q, C4-Demethylase-Komplex erklärt. Das CDPX2-Syndrom, besser bekannt unter Conradi-Hünemann- oder Happle-Syndrom, weist einige Ähnlichkeiten zum CHILD-Syndrom auf. Persistierende Hautverletzungen und schwerwiegende Skelettfehlbildungen kommen hauptsächlich beim CHILD-Syndrom vor, Katarakte hingegen nur bei CDPX2. Die Inzidenz der Erkrankung lag im Jahr 2000 unter 100 bekannte Fälle. Für männliche Feten ist die Erkrankung tödlich, für weibliche Feten hingegen nicht. Die Behandlung erfolgt symptomatisch. Im Plasma konnten deutlich erhöhte Spiegel von  $\Delta^8$ -Sterolen nachgewiesen werden, was durch eine Fehlfunktion der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase hervorgerufen wird, auf genetischer Ebene konnte eine Mutation im EBP nachgewiesen werden [9, 22].

- **Lathosteroloxidase** (= C5-Desaturase, Enzym s)

Charakteristika:

Das mikrosomale, membrangebundene Enzym katalysiert die Einführung einer zweiten Doppelbindung im Ring B des Sterolgerüsts in Position C5. Somit wird aus Lathosterol 7-Dehydrocholesterol und aus Cholesta-7,24-dienol Cholesta-5,7,24-trienol (Abbildung 5).

Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch nicht ganz aufgeklärt. Die ablaufende Oxidase-Reaktion benötigt Sauerstoff, NADPH und eine Cytochrom-b5-Reduktase [18, 23].

#### Bedeutung:

Ob die Lathosteroloxidase als mögliches Ziel einer Cholesterol-senkenden Therapie einsetzbar ist, ist nicht ausreichend erforscht. Erstmals gelang es Giera et al. [23] 2008, selektive Inhibitoren für dieses Enzym zu synthetisieren, vorher gab es nur einen unspezifischen Inhibitor (Triarimol). Die Entwicklung weiterer Lathosteroloxidase-Inhibitoren könnte zur Aufklärung der genauen Enzymreaktion beitragen. Außerdem könnten die Pathomechanismen zur Aufklärung der Lathosterolose geklärt werden. Diese Erkrankung wurde erst 2002 beschrieben und zeigt einen SLOS-ähnlichen Phänotyp (siehe 7-Dehydrocholesterolreduktase und Kapitel 1.2.7.2). Die Enzymaktivität der Lathosteroloxidase lag bei den Erkrankten (erst zwei Fälle bekannt) bei 10 % der normalen Aktivität, was einen erhöhten Lathosterol-Spiegel im Plasma zur Folge hatte [9]. Darüber hinaus stellte Rodgers et al. [24] fest, dass es eine enge Verbindung zwischen der Replikation des Hepatitis C Virus und der Desmosterol-Homöostase im Wirtsorganismus gibt. Ob Lathosteroloxidase-Inhibitoren wirklich geeignet sind für eine antivirale Therapie, ist vorerst noch ungeklärt.

- **7-Dehydrocholesterolreduktase** (Enzym t)

#### Charakteristika:

Die 7-Dehydrocholesterolreduktase (7-DHCR) ist das letzte Enzym in der Cholesterol-Biosynthese im Kandutsch-Russell-Pathway (Abbildung 5, rechte Seite) bzw. das vorletzte Enzym im Bloch-Pathway (linke Seite). Es reduziert die Doppelbindung in Position C7/8, aus Lathosterol wird Cholesterol und aus Cholesta-5,7,24-trienol wird Desmosterol unter Verbrauch von NADPH. Die Enzymreaktion läuft nach Protonierung der Position C8 über die Bildung eines carbokationischen HEI in Position C7 und anschließendem Hydridtransfer, ebenfalls an C7, ab. Die 7-DHCR gehört wie die  $\Delta^{14}$ -Reduktase zu der Familie der Lamin-B-Rezeptoren. Das Enzym kommt vor allem in den Nebennieren, in der Leber, im Hoden und im Gehirn vor [1, 11, 18].

#### Bedeutung:

Das autosomal, rezessiv vererbte Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS) kommt mit einer Inzidenz, je nach ethnischer Rasse, von 1:10.000 bis 1:80.000 vor. SLOS ist die häufigste Erkrankung, welche auf einem Defekt in der Cholesterol-Biosynthese beruht. Über 100 verschiedene Mutationen der 7-Dehydrocholesterolreduktase (7-DHCR) sind bekannt. Das Enzym mit dem dazugehörigen Gen gehört zu den gründlichsten untersuchtesten Enzymen im Post-Squalen-Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese. Die Gründe hierfür liegen in der hohen Erkrankungsrate, nicht nur im Vergleich zu anderen Erkrankungen die auf einen Enzymdefekt

in der Cholesterol-Biosynthese beruhen. Mikroenzephalie, geistige Retardiertheit und Syndaktylie sind Merkmale des nur symptomatisch behandelbaren Syndroms. Durch pränatale Diagnose und dadurch veranlasste cholesterinreiche Diät können die Verlaufsformen frühzeitig abgemildert werden. Da SLOS durch eine defekte 7-DHCR auftritt und 7-Dehydrocholesterol-Abbauprodukte als toxisch gelten, ist die Entwicklung von DHCR-Inhibitoren als Cholesterolsenker total unbrauchbar, jedoch ist die Entwicklung von Inhibitoren als molekulartechnisches Werkzeug zur weiteren Erforschung von SLOS notwendig (siehe Kapitel 1.2.7) [11].

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.1) erwähnt, gibt es drei wichtige Gründe für die Entwicklung und Erforschung neuer Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren, die im Folgenden kurz erörtert werden.

- **Entwicklung neuer Cholesterol-/Lipidsenker [7, 11]**

Erhöhte LDL-Cholesterol- und Plasma-Cholesterol-Spiegel werden mit koronaren Herzerkrankungen in Verbindung gebracht. Eine cholesterol-arme Ernährung hat generell positive Effekte auf die Gesundheit, eine erniedrigte Mortalitätsrate ist die Folge. Die Therapie mit cholesterol-/lipidsenkenden Arzneistoffen bei zu hohem Cholesterol-Spiegel ist gut untersucht. Eine Wirkstoffgruppe, die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), stellen dabei den Goldstandard der Therapie dar. Neben den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren gibt es noch einige andere Vertreter, ihnen allen gemeinsam sind Nebenwirkungen, weswegen die Entwicklung von neuen Cholesterol-/Lipidsenkern mit anderem Wirkmechanismus/Nebenwirkungsprofil erstrebenswert ist:

## **BESCHREIBUNG DER SUBSTANZKLASSEN (WIRKSTOFFE) (Abbildung 6)**

- **Statine** (z.B. Atorvastatin, Simvastatin)

Wirkmechanismus: Hemmung der HMG-CoA-Reduktase in der Leber.

Nutzen: Senkung des Gesamt-Cholesterol-LDL- und VLDL-Spiegels und Senkung der Triglycerid-Konzentration bei leichter Erhöhung des HDL-Spiegels. Die Senkung der Mortalitätsrate und inflammatorischer Prozesse sind ebenfalls erwiesen. Nebenbei wirken sie noch antioxidativ, antithrombotisch, vaskuloprotektiv und begünstigen die Angiogenese.

Nebenwirkung: Myopathie, akute Rhabdomyolyse, Katarakt, Flatulenz und epigastrale Beschwerden zeichnen das Nebenwirkungsprofil von Statinen aus.

- **Fibrate** (Bezafibrat, Fenofibrat)

Wirkmechanismus: Aktivierung von nukleären PPAR $\alpha$ -Rezeptoren, die Stoffwechselwege von Lipoproteinen in Leberzellen beeinflussen.

Nutzen: Senkung des Triglycerid-Spiegels im Blut. Ein deutlicher Anstieg des HDL-Spiegels ist möglich, bei einer leichten Erniedrigung des Cholesterol-LDL-Spiegels.

Nebenwirkung: Als Nebenwirkung sind ebenfalls akute Rhabdomyolyse, vermehrte Bildung von Gallensteinen, Haarausfall, Impotenz und epigastrale Beschwerden beschrieben.

- **Ionenaustauscherharze** (Colestyramin)

Wirkmechanismus: Im Darm werden die Gallensäuren an kationischen Polymere gebunden und ausgeschieden (Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes). Neue Gallensäuren müssen daher aus Serum-Cholesterol nachsynthetisiert werden, wodurch es zur Senkung des Cholesterol-Spiegels im Blut kommt.

Nutzen: Senkung der Cholesterol- und LDL-Werte im Blut und leichter Anstieg von HDL im Plasma.

Nebenwirkung: Circa 50% aller Patienten leiden an Beschwerden des Gastrointestinaltraktes.

- **Nicotinsäure-Derivate** (Acipimox)

Wirkmechanismus: Inhibierung von intrazellulären Adenylatcyclasen und der cAMP-Synthese, dadurch kommt es zur Hemmung der Triglyceridlipase, was eine Verringerung von freien Fettsäuren im Plasma und eine verringerte Bildung von VLDL in der Leber zur Folge hat.

Nutzen: Senkung des Cholesterol- und Triglycerid-Spiegels. Deutliche Erhöhung der HDL-Konzentration mit starker Abnahme von VLDL.

Nebenwirkung: In Studien konnte keine Senkung der Mortalitätsrate nachgewiesen werden, dafür wurden folgende Nebenwirkungen beobachtet: Flush, Juckreiz, Durchfall, Übelkeit, Hyperglykämie und Lebertoxizität.

- **CETP-Inhibitoren** (Torcetrapib)

Wirkmechanismus: Hemmung des Cholesterester-Transportproteins. Dadurch ist keine Übertragung von HDL-Cholesterol auf LDL und VLDL möglich.

Nutzen: Erhöhung des HDL-Spiegels und eine Senkung des Cholesterol-, LDL-, VLDL-Spiegels.

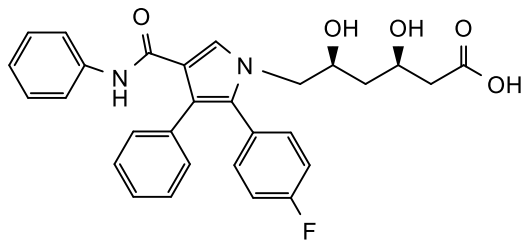
Nebenwirkung: Erhöhung des systolischen Blutdrucks und eine erhöhte Todesrate in einer Studie, führte dazu, dass derzeit kein Wirkstoff auf dem Markt ist, zudem konnte keine Überlegenheit gegenüber HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren gezeigt werden.

- **Cholesterol-Absorptionshemmer** (Ezetimib)

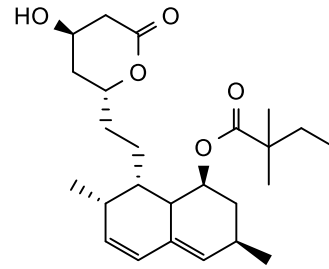
Wirkmechanismus: Hemmung des Transportes von Lipiden aus dem Darm, durch Hemmung/Bindung an ein spezifisches Sterol-Transportprotein NPC1L1.

Nutzen: Senkung des Gesamt-Cholesterol-, LDL- und VLDL-Spiegels im Plasma. Die Aufnahme von Triglyceriden, Fettsäuren und fettlöslichen Vitaminen ist nicht betroffen. Zudem wird eine antiinflammatorische Wirkung diskutiert.

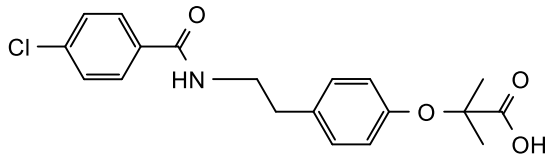
Nebenwirkung: Durchfall, Flatulenz, Bauchschmerzen, Hypertonie und Müdigkeit führen zu einer schlechten *Compliance* beim Patienten.



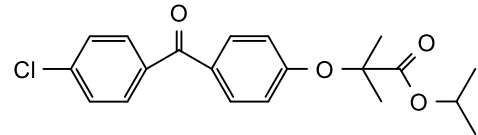
Atorvastatin



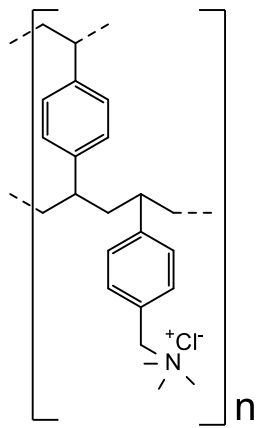
Simvastatin



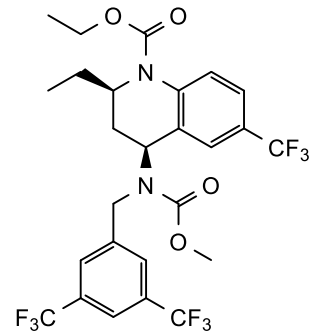
Bezafibrat



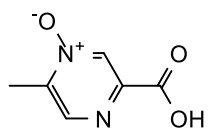
Fenofibrat



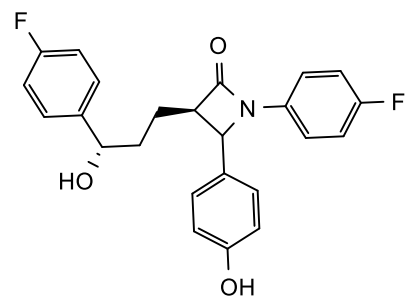
Colestyramin



Torcetrapib



Acipimox



Ezetimib

**Abbildung 6:** Strukturen von bekannten Cholesterolsenkern

- **Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Erforschung von Cholesterol-Biosynthese-induzierten Pathogenesen**

In Tabelle 1 sind verschiedene Krankheiten aufgeführt, die alle auf Enzym-/Gendefekte einzelner Enzyme im Post-Squalen-Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese beruhen. Damit diese Erkrankungen und deren Pathomechanismen besser untersucht werden können, müssen die Krankheiten für *in vitro* und für *in vivo* Versuche (Tierversuche) künstlich hervorgerufen werden. Dafür stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

- Das/die Gen(e) für die Erkrankung ist/sind bekannt, dann kann mit Hilfe der aufwändigen *knock-out*-Technik diese(s) Gen(e) ausgeschaltet werden, um die Krankheit hervorzurufen.
- Das entsprechende nicht funktionsfähige Enzym kann durch Akkumulation des Substrat-Sterols leicht identifiziert werden. Dann kann durch selektive Inhibition des Enzyms im gesunden Organismus die Dysfunktion „simuliert“ und deren Auswirkungen im weiteren Verlauf studiert werden, da sich dieses Substrat-Sterol anreichert. Eine genauere Beschreibung der Enzyme und der damit verbundenen Krankheiten ist bereits in diesem Kapitel beschrieben.

- **Entwicklung von Chemotherapeutika**

Im Jahre 2012 gab es in den Vereinigten Staaten von Amerika 1.638.910 neue Krebserkrankungen und 577.190 Todesfälle [25]. Es gibt gute Anzeichen dafür, dass bestimmte Krebsarten wie Brustkrebs und Gehirntumore mit Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese behandelbar sind bzw. diese Substanzen als Adjuvantien eingesetzt werden können [14, 15, 16, 17]. Daher müssen hochselektive und hochpotente Inhibitoren entwickelt werden. Die Oxidosqualencyclase (siehe Enzymbeschreibung) scheint hierfür eines der vielversprechendsten Targets für die Chemotherapie zu sein.

**FAZIT**

Die Entwicklung von neuen Enzym-Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese ist von großer Bedeutung.

In einer kritischen Bewertung von Cholesterol-Spiegel senkenden Stoffen (Statine nicht berücksichtigt), kommen Trapani et al. [13] 2011 zu dem Schluss, dass die Squalensynthase, die Squalenepoxidase und die Oxidosqualencyclase als mögliche Zielenzyme für eine cholesterol-/lipidsenkende Therapie nicht ausgeschlossen werden sollten. Eine Hemmung anderer Enzyme als der HMG-CoA-Reduktase und der Squalensynthase sollten im Prä-Squalen-Abschnitt vermieden werden, da dort Moleküle für den Gesamtstoffwechsel synthetisiert werden, die für andere wichtige Stoffwechselvorgänge benötigt werden. Eine Hemmung der Post-Lanosterol-Enzyme ist ebenfalls nicht sinnvoll, da toxische Sterole akkumulieren können, die mitverantwortlich sind für das Auftreten bestimmter Erkrankungen (vgl. Tabelle 1).

Eine Reihe von Krankheiten beruht auf Enzym-/Gendefekten einzelner Enzyme im Post-Squalen-Abschnitt bzw. auf einem Mangel von Cholesterol und/oder Anreicherung von toxischen Sterolen schon während der Embryo-/Fetogenese. Die Inzidenz der einzelnen Erkrankungen ist teilweise sehr gering, mit Ausnahme des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms. Die Pathomechanismen dieser Krankheiten sind zum Teil unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen. Daher ist die Entwicklung neuer Inhibitoren als molekulartechnisches Werkzeug unbedingt nötig.

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass manche Krebsarten sensitiv auf den Cholesterol-Stoffwechsel reagieren [15, 16, 17, 18]. Die Inhibition von Enzymen im Post-Squalen-Abschnitt scheint in diesem Fall als Target geeignet zu sein. Jedoch muss das chemotherapeutische Potential von Enzym-Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese noch genauer untersucht werden. Für eine systematische weitere Erforschung dieses Therapieansatzes werden potente und v.a. selektive Inhibitoren der einzelnen Enzyme benötigt.



## 1.2.1 Oxidosqualencyclase-Inhibitoren, erste Generation

Lange S, Keller M, **Müller C**, Oliaro-Bosso S, Balliano G, Bracher F. Aminopropylindenes derived from Grundmann's ketone as a novel chemotype oxidosqualene cyclase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013;63:758-64.

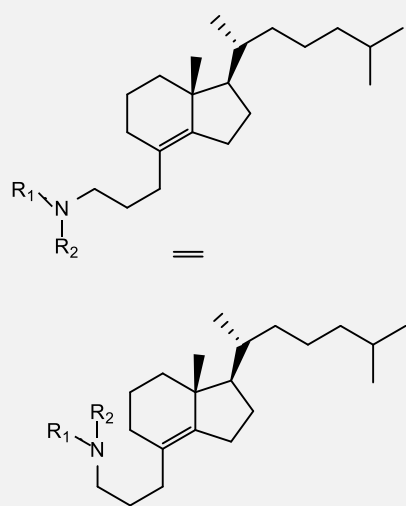
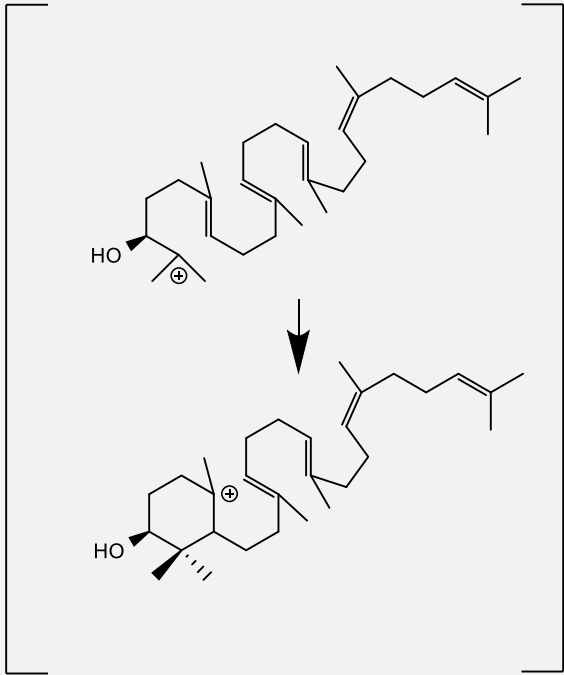
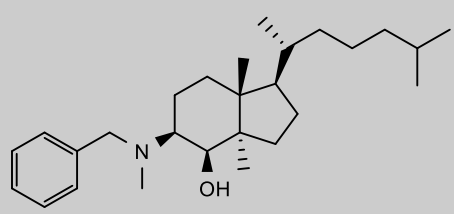
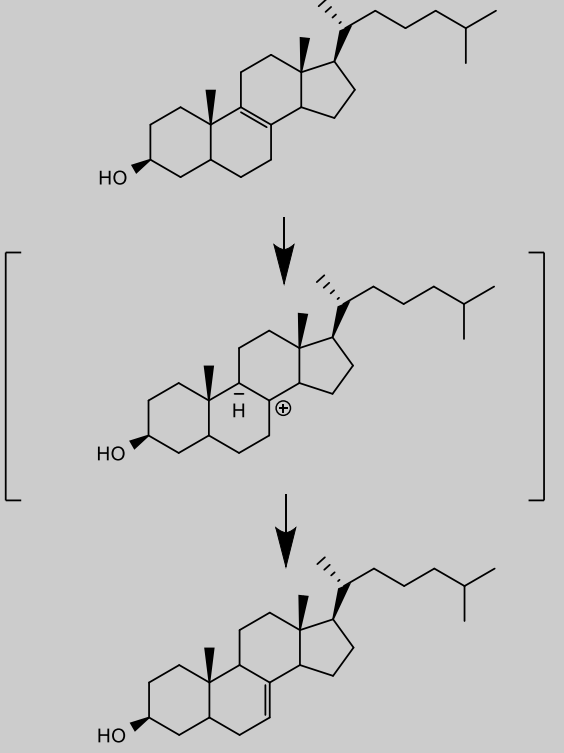
### 1.2.1.1 Zusammenfassung

Die beschriebenen neu synthetisierten Verbindungen beruhen auf „alten“ Forschungsdaten aus der Dissertation von Stefanie Lange 2006 [26], weswegen noch kein allgemeines Screening in den Cholesterol-Ergosterol-Ganzzell-Assays vorlag. Die Testergebnisse bilden den Grundstein für alle weiteren Generationen (siehe Kapitel 1.2.2.2, 1.2.3.2) der OSC-Inhibitoren.

Eine Reihe von Aminopropylindenen wurde ausgehend vom Grundmanns Keton synthetisiert und einer biologischen Testung unterworfen. Dabei stellte die Imitation von carbokationischen *High Energy Intermediates* (HEI) einen wichtigen Baustein in der Syntheseplanung dar. Die Imitation der lipophilen Seitenkette, sowie von Ring C und D des Sterolgrundgerüsts (siehe Abbildung 2), ist durch Grundmanns Keton gegeben, welches eine Partialstruktur des Produktes Lanosterol darstellt. Eine protonierbare bzw. kationische oder zwitterionische funktionelle Gruppe wurde in einer Position eingeführt, in der auch während der Cyclisierung des Oxidosqualens zum Lanosterol ein HEI auftritt (vgl. Abbildung 7). Die biologische Aktivität der Substanzen, inklusive der Referenzinhibitoren BIBX 79 und Ro 48-8071, wurde mittels MTT-Test und an verschiedenen isolierten Oxidosqualencyclasen (OSC) im Arbeitskreis Prof. Dr. Balliano (Turin) getestet. Die OSC stammten von *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi*, *Pneumocystis carinii* und von *Homo sapiens*. In der ersten OSC-Inhibitoren-Generation wurden sechs Substanzen synthetisiert und es zeigte sich trotz der geringen Auswahl, dass Größe und Ladung der funktionellen Gruppe einen wesentlichen Einfluss auf die biologische Aktivität haben. Hervorzuheben ist, dass die tertiären Amine keine Zytotoxizität ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) bei einer vergleichbaren Aktivität auf die verschiedenen OSC zeigten, im Gegensatz zu den Pyridinium- und Amin-N-Oxid-Verbindungen **8** und **9** (Kapitel 1.2.1.2 im Artikel unter Tabelle 1 und Tabelle 2). Die Verbindungen **4** und **6** zeigten in einem quantitativen Test durch Inkubation von HL60 Zellen mit Inhibitor und  $^{13}C$ -Acetat bei  $1 \mu M$  (Kapitel 1.2.1.2 im Artikel unter Absatz 2.2.2 *Assay for inhibition of cholesterol biosynthesis in cells*, sowie in Kapitel 1.2.5.1) eine ähnliche Stärke wie die Referenzinhibitoren. Am isolierten Enzym waren die Referenzinhibitoren den neu synthetisierten Substanzen überlegen. Das Konzept der Kombination aus Imitierung der HEI in Position pro C4 im Sterolgrundgerüst bzw. pro C10 durch Einführung einer geeigneten funktionellen Gruppe und Sterolpartialstruktur, bevorzugt lipophile Seitenkette inklusive Ring C und D, hat sich als tragfähiges Konzept bei der Entwicklung von neuen Sterol-Biosynthese-Inhibitoren erwiesen. Auch Kapitel 1.2.5 zeigt, dass nach diesem Konzept Enzyme in der Cholesterol-Biosynthese gehemmt werden können, jedoch wurde dort eine Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase festgestellt. Die Verbindungen **4** und **6** zeigten

keine  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Aktivität, ebenso war keine der Verbindungen aus Kapitel 1.2.5 ein OSC-Inhibitor, trotz struktureller Ähnlichkeit. Die Verbindungen von König imitierten ein HEI, das an C8 lokalisiert ist (vgl. Abbildung 7), obwohl die Lage der protonierbaren der Position C10 entspricht.

Durch den Einsatz eines Ganzzell-Assays war es dennoch möglich, nicht nur die Enzyminhibition an der OSC für die Lange-Substanzen zu detektieren, sondern auch für die Verbindungen von König (vgl. Kapitel 1.2.5) eine selektive Inhibition der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase nachzuweisen. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass eine bestimmte Enzyminhibition nicht vorhersagbar ist, doch mit dem entwickelten Assay ist es möglich, in einem Experiment die Hemmung eines beliebigen Enzyms im Post-Squalen-Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese zu erkennen.

Substanz	Imitation des HEI
<p data-bbox="199 353 558 448">Verbindungen <b>4-7</b> von Lange, Kapitel 1.2.1.2</p> 	
<p data-bbox="199 1193 526 1288">Verbindung <b>29a</b> von König, Kapitel 1.2.5.2</p> 	

**Abbildung 7:** Vergleich von Substanzen von Lange und König; Nummerierung aus jeweiligen Artikel

## 1.2.1.2 Artikel

European Journal of Medicinal Chemistry 63 (2013) 758–764



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Preliminary communication

## Aminopropylindenes derived from Grundmann's ketone as a novel chemotype of oxidosqualene cyclase inhibitors

Stefanie Lange<sup>a</sup>, Marco Keller<sup>a</sup>, Christoph Müller<sup>a</sup>, Simonetta Oliaro-Bosso<sup>b</sup>, Gianni Balliano<sup>b</sup>, Franz Bracher<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department für Pharmazie, Zentrum für Pharmaforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 5-13, D-81377 Munich, Germany<sup>b</sup> Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino, Via Pietro Giuria, 9, 10125 Torino, Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 November 2012

Received in revised form

15 February 2013

Accepted 1 March 2013

Available online 14 March 2013

## Keywords:

Oxidosqualene cyclase

Enzyme inhibitor

High energy intermediate

Secosteroid

Species selectivity

## ABSTRACT

A series of aminopropylindenes, designed as mimics of a cationic high energy intermediate in the oxidosqualene cyclase<sup>1</sup> (OSC)-mediated cyclization of 2,3-oxidosqualene to lanosterol was prepared from Grundmann's ketone. Screening on OSCs from five different organisms revealed interesting activities and selectivities of some of the compounds. A *N,N*-dimethylaminopropyl derivative showed promising inhibition of *Trypanosoma cruzi* OSC in combination with low cytotoxicity, and showed significant reduction of cholesterol biosynthesis in a human cell line.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

## 1. Introduction

Sterol biosynthesis is a complex metabolic pathway in which two sharply different sections are well recognizable: an "assembly section" which is devoted to build the open triterpene 2,3-oxidosqualene starting from the common lipid precursor acetyl-CoA, and a "tailoring section" which remodels the sterol intermediates to generate the end-product (cholesterol, ergosterol or phytosterols, in animal, fungal or plant cells, respectively). The two sections are connected by the cyclization of 2,3-oxidosqualene, one of the most outstanding mono-enzymatic reactions (if not the most one), that confers the steroid shape to the open triterpene oxidosqualene. This reaction is catalyzed by enzymes belonging to the family of oxidosqualene cyclases (OSC), which form lanosterol in non-photosynthetic organisms and, mostly, cycloartenol in photosynthetic organisms [1,2].

Cyclization of 2,3-oxidosqualene is triggered by the stereospecific protonation of the epoxide ring of the substrate and proceeds through the generation of several carbocationic high energy

intermediates (HEIs) both during the formation of the new carbon–carbon bonds for the closure of the four rings-steroid scaffold (in the sequence pro-C4, C10, C8, C13 and C20) and during the rearrangement of the protosteryl carbocation pro-C20 (in the sequence pro-C17, C13, C14, and C8 or C9 depending on the product) till the removal of a proton and formation of lanosterol or cycloartenol. Studies for unraveling the above complex cyclization reaction had involved a number of laboratories for over fifty years, covering a complete list of expertises and methodologies, from chemical mimicking to protein purification, from inhibitory assays to site-directed mutagenesis [3], till the crystallization of squalene and oxidosqualene cyclizing enzymes [4–6].

Oxidosqualene cyclases have been considered attractive targets for designing cholesterol lowering [7], antifungal [8,9], and anti-parasitic agents [10–12]. Recently, inhibitors of oxidosqualene cyclase proved to be effective as anticancer agents against human cancer cells from various tissue origins [13].

A common concept in the development of inhibitors of sterol (and other) biosynthesis is mimicking of the extremely short-lived carbocationic HEIs, most commonly accomplished by compounds having (a) a protonable aliphatic amino group, or (b) an aliphatic amine-*N*-oxide, or (c) a quaternary ammonium or pyridinium group at the pertinent position. The above molecule-designing strategy proved to be particularly prolific in designing inhibitors

\* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 77301; fax: +49 89 2180 77802.

E-mail address: [Franz.Bracher@cup.uni-muenchen.de](mailto:Franz.Bracher@cup.uni-muenchen.de) (F. Bracher).<sup>1</sup> OSC = oxidosqualene cyclase.

of OSC, being its reaction mechanism characterized by the consecutive formation of a number of carbocationic HEIs. Dozens of inhibitors have been synthesized during the last thirty years: (i) azadecalinal and azasqualene derivatives [14], (ii) Ro 48-8071 and related benzophenone derivatives designed by Roche [7,15] and AstraZeneca groups [16], (iii) pyridinium ion based inhibitors [9,10,17], (iv) umbelliferone derivatives [18,19], (v) sulfur-containing analogs [20], and others like BIBX 79 [21] (Fig. 1).

In continuation of our previous work on the development of inhibitors of oxidosqualene cyclases from various organisms [12,18,19] and other enzymes in ergosterol [22] and cholesterol biosynthesis [23–25] we describe here a new chemotype of oxidosqualene cyclase inhibitors that was designed with the following rationale: in order to achieve high affinity to the enzymes, we introduced a homochiral equivalent of the rings C and D of sterols and the sterol side chain by using Grundmann's ketone (**1**) [26] as a building block. To this bicyclic scaffold we attached an aminopropyl chain, ending up with secosteroid-like molecules, in which the protonable nitrogen might mimic two of the early cationic HEIs of the cyclization cascade. Through free rotation of the aminopropyl chain the protonated amino group is able to occupy the position of the first occurring HEI at C-2 of the squalene chain (A; representing pro-C4 of the emerging sterol) as well as that of the pro-C10 HEI (B) (Fig. 2).

The newly designed molecules were assayed on five different OSCs, with the aim of identifying lead molecules for the development of new drugs. All the enzymes, namely lanosterol synthases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Pneumocystis carinii*, *Trypanosoma cruzi*, and *Homo sapiens*, as well as the cycloartenol synthase from *Arabidopsis thaliana*, were expressed in an ERG7-deficient yeast (*S. cerevisiae*) strain [27]. Cycloartenol synthase has been included in the present study in order to ascertain if the critical amino acid differences between lanosterol and cycloartenol synthases would influence their sensitivity to our inhibitors [28].

In order to confirm activities of the inhibitors in a cellular system, selected compounds were assayed for their inhibition of total cholesterol biosynthesis in a human cell line [24].

Some of our new molecules proved to be highly effective and specific, and offer interesting clues to the development of new OSC inhibitors, especially as antiparasitic drugs.

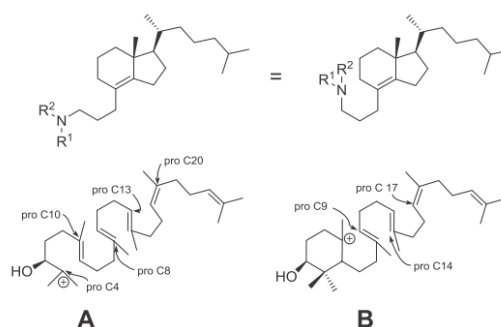


Fig. 2. Two rotamers of the target compounds (top row), the pro-C4 HEI (A) and the pro-C10 HEI (B) of lanosterol biosynthesis (bottom row).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Chemistry

Grundmann's ketone (also named Windaus ketone; **1**) [26] was obtained in high yield by ozonolysis of cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>), but by using a novel workup procedure (treatment of the ozonolysis mixture with water, followed by extraction with pentane). In this manner the well-documented epimerization of **1** at C-3a [29] could be avoided. The ketone was reacted with cyclopropylmagnesium bromide to give the tertiary alcohol **2**. NMR and GC analysis of the crude product revealed that a mixture of epimers (putatively at C-3a and/or C-4) was formed. Since the stereocenters at both C-3a and C-4 were to be destroyed in the subsequent step, intermediate **2** was purified only superficially over a short silica column. Crude **2** was treated with hydrogen bromide in glacial acetic acid [30] to give the bromopropyl derivative **3** in high yield. The underlying homoallylic rearrangement led to a product with an endocyclic tetrasubstituted olefin, namely a product with only three, moreover configurationally stable asymmetric centers.

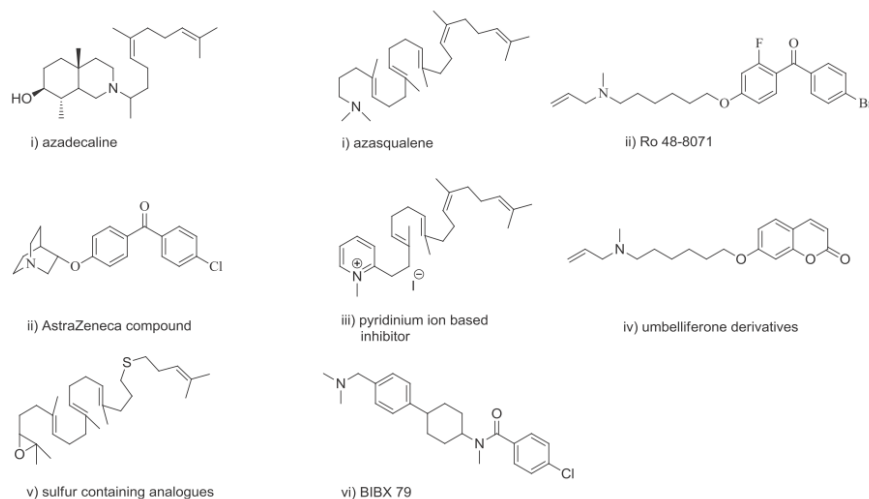


Fig. 1. Representative inhibitors of oxidosqualene cyclases (OSC).

Finally, reaction of **3** with primary and cyclic as well as acyclic secondary amines gave the desired aminopropylindene derivatives **4–7**. The piperidine substituent was selected since it might additionally mimic the ring A of the sterol, the *N*-allyl-*N*-methyl motif was selected, since it can be found in the benzophenone-type OSC inhibitor Ro 48-8071 (Fig. 1), which had recently been co-crystallized with human OSC and shown to bind to the enzyme in a manner like the pro-C4 HEI A (Fig. 2) does [5]. Since carbocationic HEIs can also be mimicked by tertiary amine-*N*-oxides [31] and *N*-alkylpyridinium salts [9], *N*-oxide **9** was prepared by oxidation of tertiary amine **6** with *meta*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA), and pyridinium salt **8** by reaction of the intermediate **3** with pyridine (Scheme 1).

## 2.2. Effect of inhibitors on OSCs from different organisms

Activity of the compounds as inhibitors of OSC was tested by incubating homogenates prepared from cell cultures of different recombinant yeast strains with radiolabelled 2,3-oxidosqualene in the presence of increasing inhibitor concentrations. A comparative determination of OSC inhibitory activity of the compounds on the recombinant enzymes revealed that compound **5**, exclusively bearing a secondary amino group in the side chain, was inactive on any OSC under investigation, while the remaining compounds showed both a strong structure-linked dependence and, other than the reference inhibitor Ro 48-8071, considerable differences in susceptibility among the enzymes from different organisms (Table 1).

OSC from *P. carinii* revealed to be significantly inhibited only by **4**, a molecule which on the other hand displayed comparably high activity on all assayed enzymes (IC<sub>50</sub> range: 0.6–1.5 μM).

Among the target enzymes, cycloartenol synthase from the plant *A. thaliana* appeared to be the most sensitive to the inhibitors, with IC<sub>50</sub> values ≤1 μM for five of the six compounds assayed (Table 1). Inhibitors, which bear bulky piperidine and pyridinium rings show the most distinct selectivity for the cycloartenol synthase of *A. thaliana*. The oxidosqualene cyclases of the other species tested are more sensitive to inhibitors with small substituents at the nitrogen, and show no or only weak inhibitory effects if bulky residues were chosen. Interestingly, similar organism-dependent differences were observed in a previous study of ours [19], in which a series of aminoalkyl umbelliferone derivatives was assayed on the same set of OSCs as in the present study. In that study, the

**Table 1**

Effect of inhibitors on oxidosqualene cyclase activity of homogenates prepared from yeast recombinant strains SMY8 expressing *S. cerevisiae*, *P. carinii*, *T. cruzi*, *A. thaliana* and *H. sapiens* OSCs.

Compound	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>				
	OSC <sup>b</sup> <i>S. cerevisiae</i>	OSC <sup>b</sup> <i>P. carinii</i>	OSC <sup>b</sup> <i>T. cruzi</i>	OSC <sup>c</sup> <i>A. thaliana</i>	OSC <sup>b</sup> <i>H. sapiens</i>
<b>4</b>	1.5	0.9	0.8	0.6	1.0
<b>5</b>	>20	>20	>20	>20	>20
<b>6</b>	1.3	13	0.6	0.3	4.5
<b>7</b>	2.1	17	>20	0.5	11.9
<b>8</b>	4.2	11	>20	0.2	12.5
<b>9</b>	2.5	15	3	1.3	>20
Ro 48-8071 <sup>d</sup>	0.21	0.34	0.90	1.75	0.17

<sup>a</sup> Values are the means of two separate experiments, each one carried out in duplicate. The maximum deviations from the mean were less than 10%.

<sup>b</sup> Lanosterol synthase.

<sup>c</sup> Cycloartenol synthase.

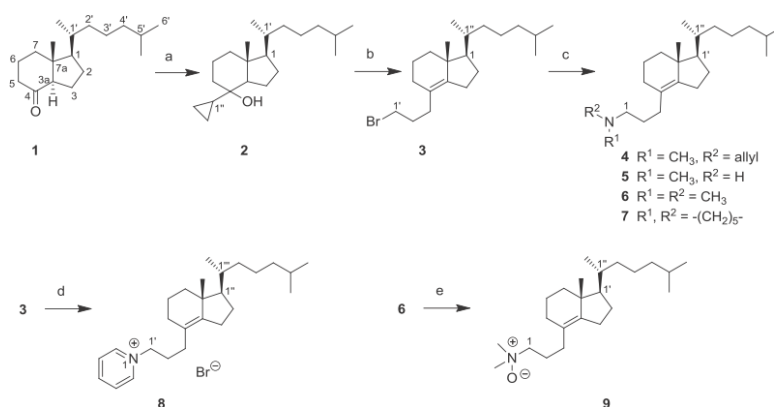
<sup>d</sup> From Ref. [12].

most dramatic difference between plant and other OSCs was observed with a compound bearing a morpholine ring, which proved to be highly effective on the cyclase from *A. thaliana*, while resulted almost ineffective against the other OSCs. Pyridinium salt **8** showed negligible inhibition of *T. cruzi* OSC, what is in contrast to previous reports claiming that the significant anti-trypanosomal activities of simple *N*-terpenyl pyridinium salts can be attributed to an inhibition of *T. cruzi* OSC [10].

Comparison of the inhibitory effects of the *N,N*-dimethylamino compound **6** and the corresponding *N*-oxide **9** revealed that the tertiary amine showed higher activities on all OSCs, but parallels in species selectivity are evident. This suggests that steric parameters might be crucial for species selectivity in this new chemotype of OSC inhibitors. Most interestingly, both the *N,N*-dimethylamino compound **6** and the *N*-oxide **9** show strong inhibition of *T. cruzi* OSC. In contrast to the reference inhibitor Ro 48-8071, however, these two compounds show considerable selectivity with respect to human OSC (factors ≥7), a property that is worth deeply exploring in designing new anti-trypanosomal agents.

### 2.2.1. Cytotoxic activity

A first screening for cytotoxic activities of the compounds was performed in a MTT assay according to the method of Mosmann



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) cyclopropylmagnesium bromide, THF, reflux, 3.5 h, (69%); (b) HBr in acetic acid, 10 °C, 30 min (82%); (c) aliphatic amine, acetonitrile, 20 or 40 °C, 72 h (56–98%); (d) pyridine, reflux, 1 h (82%); (e) MCPBA, chloroform, 0 °C, 30 min (82%).



**Table 2**  
Cytotoxic activities of investigated compounds against HL-60 cells determined by MTT assay.

Compound	IC <sub>50</sub> [μM]
Cisplatin	5
Ro 48-8071	8
BIBX 79	>50
<b>4</b>	>100
<b>5</b>	>100
<b>6</b>	>100
<b>7</b>	>100
<b>8</b>	3.5
<b>9</b>	20

[32] on human leukemia HL-60 cells. Cisplatin was used as reference. The results are shown in Table 2. Significant cytotoxicity (IC<sub>50</sub> < 10 μM) was recorded only for the pyridinium compound **8**. Probably, this can be attributed to the detergent-like properties of this compound. *N*-Oxide **9** showed moderate cytotoxicity (IC<sub>50</sub> = 20 μM), what makes it less attractive for further drug development compared to its tertiary amino analog **6**, which is, like all other secondary and tertiary amines investigated here, devoid of cytotoxicity. In contrast, reference OSC inhibitor Ro 48-8071 showed noteworthy cytotoxicity (IC<sub>50</sub> = 8 μM). BIBX 79 (Fig. 1), another prominent OSC inhibitor, showed no significant cytotoxicity. This shows, that the inhibition of cholesterol biosynthesis is not necessarily correlating with the cytotoxicity of the inhibitors.

#### 2.2.2. Assay for inhibition of cholesterol biosynthesis in cells

Compounds **4** and **6**, which showed significant inhibition of human OSC in the *in vitro* screenings (Table 1), were subjected to a whole cell assay on human HL-60 cells in order to investigate their activity at the cellular level. This assay is based on a method described by us previously [24]. The inhibitors were tested in triplicates at a concentration of 1 μM. Incubation in the presence of 2-<sup>13</sup>C-acetate leads to the incorporation of <sup>13</sup>C atoms into the cholesterol molecules biosynthesized during the incubation period, and allows us to distinguish newly synthesized cholesterol from unlabeled matrix cholesterol that was present in the cells before incubation, by GC–MS. At a fixed concentration of 1 μM **4** and **6** led to a decrease of overall cholesterol biosynthesis of >90% compared to untreated control samples. At the same concentration Ro 48-8071 led to a decrease of >90%, for BIBX 79 a reduction of 60% was recorded.

### 3. Conclusion

This paper describes the design, synthesis, and biological evaluation of a series of aminopropylindenes as a new chemotype of oxidosqualene cyclase (OSC) inhibitors. Our concept included the design of inhibitors which contain typical structural elements of sterols (rings C + D and the lipophilic side chain), introduced by utilizing Grundmann's ketone as a building block, as well as a protonable or cationic functional group at a position where high energy intermediates of the OSC-catalyzed cyclization reaction occur. The compounds were tested *in vitro* for inhibition of five different oxidosqualene cyclases, among which four lanosterol synthases (from *S. cerevisiae*, *T. cruzi*, *P. carinii* and *H. sapiens*), and one cycloartenol synthase (from *A. thaliana*). The screening results of this first, relatively small collection of inhibitors gave first insights into structure–activity–relationships, showing that the size and charge of the side chain have significant impact on activity, selectivity, and cytotoxicity of the compounds. The lack of cytotoxicity of the aliphatic amines **4–7** is remarkable.

In a whole cell assay on a human cell line compounds **4** and **6** showed strong inhibition of total cholesterol biosynthesis,

indicating that this class of inhibitors has proper physico-chemical properties for being active in living cells.

The concept of combining a significant partial structure of the steroid backbone with functional groups which are able to mimic cationic high energy intermediates, is promising for further evaluation.

### 4. Experimental

#### 4.1. Chemistry

Ozonolyses were performed on a Fisher Scientific 502 Ozon Generator (Fisher Scientific, Schwerte, Germany). Melting points were determined by open tube capillary method on a Büchi melting point B-450 apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained on a Perkin Elmer FT-IR: Paragon 1000 spectrometer. NMR spectra were recorded on Jeol JNM-RX 400 (400 MHz) and Jeol JNM-RX 500 (500 MHz) spectrometers with tetramethylsilane as an internal standard. *J* values are given in Hz. Mass spectra (MS) were run by chemical impact (CI; reactant gas: methane) on a Hewlett Packard 5989 A mass spectrometer with 59,980 B particle beam LC/MS interface, and by electron impact (EI) at 70 eV on a Jeol JMS GCmate II. Solvents were of HPLC grade or p.a. grade, if not they were distilled before use. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Schnellendorf, Germany) and Acros Organics (Geel, Belgium). Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using pre-coated plastic sheets POLYGRAM SIL G/UV254 from Macherey–Nagel (Düren, Germany). Merck silica gel 60 was used as stationary phase for flash column chromatography (FCC).

The OSC substrate, 2,3-oxidosqualene (OS), was prepared as previously described [33]. Labeled [<sup>14</sup>C]-(3S)2,3-oxidosqualene was obtained through biological synthesis by incubating pig liver S<sub>10</sub> supernatant with R,<sup>2</sup>[2-<sup>14</sup>C]mevalonic acid (1 μCi, 55 mCi/mmol, 2.04 GBq/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech, U.K.), in the presence of OSC inhibitor U14266A [34], as previously described [35].

##### 4.1.1. (1*R*,3*aR*,7*aR*)-1-[(*R*)-1,5-Dimethylhexyl]-7*a*-methyloctahydroinden-4-one (Grundmann's ketone; **1**)

A solution of cholecalciferol (5.00 g, 13.0 mmol) in methanol (100 mL) was cooled to −30 to −40 °C and ozone was bubbled through the solution (60 L/h) for 30 min. The solution was treated with 50 mL water, concentrated under reduced pressure to 80 mL volume, and extracted with pentane (3 × 100 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (hexane:ethyl acetate 10:1) to yield 3.35 g (97%) of Grundmann's ketone as a colorless oil. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +42.1. IR (NaCl):  $\bar{\nu}$  = 2958 cm<sup>−1</sup>, 1677, 1418, 1245, 1209, 1144, 961; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2.42 ppm (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.8, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 1H, 3*a*-H), 2.29–2.18 (m, 2H, 5-H), 2.12 (m, 1H, 7-H), 2.00 (m, 1H, 6-H), 1.95–1.85 (m, 2H, 3-H, 6-H), 1.73 (m, 1H, 2-H), 1.61–1.28 (m, 8H, 1-H, 2-H, 3-H, 7-H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 5'-H), 1.18–1.00 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 4'-H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 1'-CH<sub>3</sub>), 0.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 6'-H), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 5'-CH<sub>3</sub>), 0.65 (s, 3H, 7*a*-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 212.3 ppm, 62.0, 56.8, 49.9, 41.0, 39.4, 39.0, 35.9, 35.5, 28.0, 27.5, 24.1, 23.7, 22.8, 22.5, 19.0, 18.7, 12.5; MS (CI): *m/z* (%) = 265 (64) [M + H]<sup>+</sup>, 247 (100); MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 264 (19) [M]<sup>+</sup>, 125 (100), 111 (61); HRMS (EI, 70 eV): *m/z* = 264.2495 [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>22</sub>H<sub>41</sub>N: 264.2453.

##### 4.1.2. (1*R*,7*aR*)-4-(3-Bromopropyl)-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-7*a*-methyl-1-[(*R*)-1,5-dimethylhexyl]-1*H*-indene (**3**)

Under nitrogen, a solution of 800 mg (3.03 mmol) Grundmann's ketone (**1**) in 20 mL anhydrous THF was added dropwise to 9.0 mL of a solution of cyclopropylmagnesium bromide (0.5 M in THF;

4.5 mmol) with stirring, and the mixture was refluxed for 3.5 h. After cooling to ambient temperature, the mixture was poured into ice-water (20 mL), and solid ammonium chloride is added with stirring until the precipitate dissolved. The mixture was extracted with diethyl ether (3 × 20 mL), and the combined organic layers were dried over magnesium sulphate. The oily residue was purified by FSC (cyclohexane:ethyl acetate 20:1) to give crude tertiary alcohol **2** (640 mg; about 69%; mixture of isomers). This product was dissolved in glacial acetic acid (2 mL) and 0.30 mL of a solution of HBr in glacial acetic acid (40%) was added. The reaction mixture was stirred under a nitrogen atmosphere for 30 min and then extracted with diethyl ether (3 × 20 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (heptane) to yield 632 mg (82% calculated on crude **2**; 56% over both steps) of **3** as colorless oil.  $[\alpha]_D^{20} = +48.2$ . IR (NaCl):  $\bar{\nu} = 2953 \text{ cm}^{-1}$ , 2858, 1465, 1368, 1247;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.36$  ppm (m, 2H, 3'-H), 2.33–2.18 (m, 2H, 3-H), 2.14–2.07 (m, 1H, 2-H), 2.00–1.74 (m, 7H, 1'-H, 2-H, 2'-H, 5'-H, 7-H), 1.73–1.61 (m, 2H, 6-H), 1.55–1.48 (m, 2H, 1''-H, 5''-H), 1.40–1.02 (m, 9H, 1-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5-H, 7-H), 0.94 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1''-CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 5''-CH<sub>3</sub>), 0.86 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 6''-H), 0.85 (s, 3H, 7a-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 144.1$  ppm, 124.5, 56.4, 43.1, 39.6, 37.4, 36.0, 34.7, 33.8, 32.1, 31.4, 28.0 (2 C), 27.1, 25.3, 23.8, 22.8, 22.6, 19.5, 19.0, 18.4; MS (CI):  $m/z$  (%) = 371 (34)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 369 (40)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 355 (4), 353 (2), 257 (61), 255 (50), 127 (100); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 370 (2)  $[\text{M}]^+$ , 368 (4)  $[\text{M}]^+$ , 355 (8), 353 (10), 257 (90), 255 (100); Anal. Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{Br}$  (%): C 68.28, H 10.10. Found C 68.40, H 10.23.

**4.1.3. N-Allyl-N-methyl-3-[(1R,7aR)-1-[(R)-1,5-dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,5,6,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl]-propyl]amine (4)**

To a solution of bromo compound **3** (0.18 g, 0.49 mmol) in 5.0 mL acetonitrile and N-allylmethylamine (3.0 mL, 1.8 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 72 h under a nitrogen atmosphere. Then, a  $\text{NaHCO}_3$  solution (20 mL, 5%) was added, and the mixture was extracted with methylene chloride (3 × 20 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (heptane:ethyl acetate:EDMA (N-ethyl-N,N-dimethylamine) 8:2:0.1) to yield 98 mg (56%) of **4** as yellow oil.  $[\alpha]_D^{20} = +46.9$ . IR (NaCl):  $\bar{\nu} = 3075 \text{ cm}^{-1}$ , 2950, 2867, 2784, 1835, 1733, 1643, 1463, 1367, 995;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.91$ –5.81 ppm (m, 1H, 2'''-H), 5.19–5.14 (m, 2H, 3'''-H), 3.00 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 2H, 1'''-H), 2.33–2.23 (m, 4H, 1-H, 3'-H), 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.98–1.80 (m, 6H, 2'-H, 3-H, 5'-H, 7'-H), 1.71–1.61 (m, 2H, 6'-H), 1.57–1.49 (m, 3H, 2-H, 5''-H), 1.44–1.31 (m, 4H, 1''-H, 2''-H, 2''-H, 3''-H), 1.19–1.05 (m, 6H, 1'-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 7''-H), 0.94 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1''-CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 5''-CH<sub>3</sub>), 0.86 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 6''-H), 0.84 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142.7$  ppm, 135.8, 125.9, 117.5, 61.0, 57.1, 56.4, 43.0, 42.0, 39.6, 37.5, 36.0, 34.8, 31.3, 28.0, 27.9, 27.1, 25.6, 25.2, 23.8, 22.8, 22.6, 19.6, 19.0, 18.4; MS (CI):  $m/z$  (%) = 360 (100)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 358 (12), 344 (4), 175 (6), 110 (83); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 359 (6)  $[\text{M}]^+$ , 344 (2), 330 (4), 246 (4), 175 (6), 147 (6), 133 (6), 110 (100); Anal. Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{N}$  (%): C 83.49, H 12.61, N 3.89. Found C 83.35, H 12.70, N 3.89.

**4.1.4. N-Methyl-3-[(1R,7aR)-1-[(R)-1,5-dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,5,6,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl]-propyl]amine (5)**

Bromo compound **3** (0.20 g, 0.54 mmol) was dissolved in a 2 M solution of methylamine in THF (2.7 mL, 5.4 mmol), and the solution was stirred at 40 °C under a nitrogen atmosphere for 72 h. Then, a  $\text{NaHCO}_3$  solution (20 mL, 5%) was added and the mixture was extracted with methylene chloride (3 × 20 mL). The combined

organic layers were dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (heptane:ethyl acetate:EDMA 8:2:0.1) to yield 0.12 g (70%) of **5** as yellow oil.  $[\alpha]_D^{20} = +66.4$ . IR (NaCl):  $\bar{\nu} = 3333 \text{ cm}^{-1}$ , 2952, 2869, 1465, 1367;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.34$ –2.17 ppm (m, 7H, 1-H, 2-H, N-CH<sub>3</sub>), 1.96–1.78 (m, 6H, 3-H, 3'-H, 5'-H, 7'-H), 1.71–1.61 (m, 2H, 6'-H), 1.60–1.31 (m, 7H, 1''-H, 2''-H, 2''-H, 3''-H, 3''-H, 5''-H), 1.22–1.20 (m, 6H, 1'-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 7''-H), 0.93 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1''-CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 5''-CH<sub>3</sub>), 0.86 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 6''-H), 0.84 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142.7$  ppm, 126.4, 57.6, 56.5, 47.6, 43.0, 41.0, 37.6, 36.0, 34.9, 31.4, 28.1 (2×), 27.2, 25.6, 25.3, 23.9, 22.9, 22.7, 19.6, 19.1, 18.5; MS (CI):  $m/z$  (%) = 320 (100)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 314 (14), 279 (19), 261 (6), 187 (8), 167 (14), 149 (52), 113 (38); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 319 (1)  $[\text{M}]^+$ ; 317 (2), 273 (2), 247 (2), 175 (6), 149 (19), 85 (41), 59 (100); HRMS (EI, 70 eV):  $m/z = 319.3259$   $[\text{M}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}$ : 319.3239.

**4.1.5. N,N-Dimethyl-3-[(1R,7aR)-1-[(R)-1,5-dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,5,6,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl]-propyl]amine (6)**

Bromo compound **3** (0.15 g, 0.41 mmol) was dissolved in a 2 M solution of dimethylamine in THF (4.0 mL, 8.0 mmol), and the solution was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere for 24 h. Then, a  $\text{NaHCO}_3$  solution (20 mL, 5%) was added, and the mixture was extracted with methylene chloride (3 × 20 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (heptane:ethyl acetate:EDMA 8:2:0.1) to yield 96 mg (70%) of **6** as yellow oil.  $[\alpha]_D^{20} = +25.6$ . IR (NaCl):  $\bar{\nu} = 2935 \text{ cm}^{-1}$ , 2812, 1464, 1368, 1265, 1042, 812;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.24$ –2.18 ppm (m, 10H, 1-H, 2-H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.98–1.81 (m, 6H, 3-H, 3'-H, 5'-H, 7'-H), 1.71–1.62 (m, 2H, 6'-H), 1.58–1.31 (m, 7H, 1''-H, 2''-H, 2''-H, 3''-H, 3''-H, 5''-H), 1.24–1.02 (m, 6H, 1'-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 7''-H), 0.94 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1''-CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 5''-CH<sub>3</sub>), 0.86 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 6''-H), 0.84 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142.7$  ppm, 126.0, 59.8, 56.5, 45.6, 43.0, 39.6, 37.5, 36.0, 34.8, 31.4, 28.0 (2×), 27.2, 26.2, 25.2, 23.8, 22.8, 22.6 (2C), 19.6, 19.0, 18.4; MS (CI):  $m/z$  (%) = 334 (100)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 318 (4), 248 (4); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 333 (5)  $[\text{M}]^+$ ; 84 (51), 58 (100); HRMS (EI, 70 eV):  $m/z = 333.3378$   $[\text{M}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}$ : 333.3395; Anal. Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}$  (%): C 82.81, H 12.99, N 4.20. Found C 82.63, H 13.27, N 4.17.

**4.1.6. N-3-[(1R,7aR)-1-[(R)-1,5-Dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,5,6,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl]-propyl]piperidine (7)**

A solution of bromo compound **3** (0.15 g, 0.41 mmol) in piperidine (0.70 g, 8.2 mmol) was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere for 3 d. Then, a  $\text{NaHCO}_3$  solution (20 mL, 5%) was added, and the mixture was extracted with methylene chloride (3 × 20 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (heptane:EDMA 10:0.1) to yield 0.15 g (98%) of **7** as yellow oil.  $[\alpha]_D^{20} = +41.6$ . IR (NaCl):  $\bar{\nu} = 2935 \text{ cm}^{-1}$ , 2812, 1464, 1368, 1265, 1042, 812;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.41$ –2.32 ppm (m, 4H, 2-H, 6-H), 2.30–2.18 (m, 2H, 1'-H), 1.98–1.90 (m, 4H, 3'-H, 5''-H, 7''-H), 1.89–1.80 (m, 2H, 3''-H), 1.76–1.66 (m, 2H, 6''-H), 1.65–1.50 (m, 12H, 2'-H, 2''-H, 3-H, 4-H, 5-H, 5''-H, 5'''-H), 1.48–1.34 (m, 3H, 1'''-H, 3''-H, 3'''-H), 1.23–1.06 (m, 6H, 2'''-H, 3'''-H, 4''-H, 7''-H), 0.95 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1'''-CH<sub>3</sub>), 0.89 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 5'''-CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 6'''-H), 0.84 (s, 3H, 7a'''-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142.7$  ppm, 126.1, 59.3, 56.5, 54.7 (2×), 43.0, 39.6, 37.5, 36.0, 34.8, 31.5, 28.0 (2×), 27.2, 26.2, 25.2, 24.6 (3C), 23.8, 22.8, 22.6, 19.6, 19.0, 18.4; MS (CI):  $m/z$  (%) = 374 (100)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 266 (4), 124 (10); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 373 (12)  $[\text{M}]^+$ ; 124 (26), 111 (12), 98 (100); Anal. Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{N}$  (%): C 83.57, H 12.68, N 3.75. Found C 83.19, H 12.66, N 3.54.



#### 4.1.7. *N*-[3-[(1*R*,7*aR*)-1-[(*R*)-1,5-Dimethylhexyl]-7*a*-methyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-4-yl]-propyl]pyridinium bromide (**8**)

A solution of bromo compound **3** (0.18 g, 0.49 mmol) in pyridine (0.40 g, 5.0 mmol) was stirred at reflux for 1 h. Then, the excess of pyridine was distilled off under reduced pressure, and the residue was crystallized from heptane to yield 0.18 g (82%) of **8** as yellowish solid, Mp. 63 °C.  $[\alpha]_D^{20} = +60.2$ . IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3416 \text{ cm}^{-1}$ , 3126, 2953, 2868, 2190, 1486, 1465, 1367;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.48 \text{ ppm}$  (d,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ , 2H, 2-H, 6-H), 8.55 (dd,  $J_1 = 7.9 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 1.2 \text{ Hz}$ , 1H, 4-H), 8.17 (dd,  $J_1 = 7.9 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 6.7 \text{ Hz}$ , 2H, 3-H, 5-H), 4.93 (t,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ , 2H, 1'-H), 2.15–2.04 (m, 6H, 2'-H, 3'-H, 5'-H), 1.97–1.91 (m, 2H, 7''-H), 1.90–1.78 (m, 3H, 2''-H, 3''-H), 1.69–1.63 (m, 2H, 6''-H), 1.52 (tq,  $J_1 = J_2 = 6.6 \text{ Hz}$ , 1H, 5''-H), 1.45–1.25 (m, 4H, 1'''-H, 2'''-H, 2'''-H, 3'''-H), 1.17–1.03 (m, 5H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 0.92 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1'''-CH<sub>3</sub>), 0.87 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 5'''-CH<sub>3</sub>), 0.85 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 6'''-H), 0.82 (s, 3H, 7*a*''-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 145.2 \text{ ppm}$  (2C), 145.1, 144.8, 128.5 (2C), 123.6, 62.1, 56.3, 43.5, 39.5, 37.2, 35.9, 34.6, 30.3, 29.9, 28.0, 27.8, 27.0, 25.4, 23.8, 22.8, 22.6, 19.4, 18.9, 18.5; MS (CI):  $m/z$  (%) = 369 (100) [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 333 (12), 303 (14), 247 (14), 220 (16), 179 (14), 159 (27), 127 (33), 107 (33); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 368 (20) [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>, 181 (40), 93 (100), 81 (16), 79 (22); Anal. Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>NBr x 2H<sub>2</sub>O (%): C 64.45, H 9.57, N 2.89. Found C 64.03, H 8.75, N 2.85.

#### 4.1.8. *N,N*-Dimethyl-3-[(1*R*,7*aR*)-1-[(*R*)-1,5-dimethylhexyl]-7*a*-methyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-4-yl]-propyl]amine-*N*-oxide (**9**)

A solution of MCPBA (0.070 g, 0.40 mmol) in chloroform (5 mL) was added dropwise to a stirred solution of tertiary amine **6** (0.10 g, 0.33 mmol) in chloroform (5 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then washed with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (3 × 20 mL) and brine (2 × 20 mL). The organic layer was dried over sodium sulphate and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by FCC (methanol) to yield 86 mg (82%) of **9** as colorless viscous oil.  $[\alpha]_D^{20} = +22.4$ . IR (NaCl):  $\tilde{\nu} = 2952 \text{ cm}^{-1}$ , 1467, 1367, 957;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 3.01 \text{ ppm}$  (m, 2H, 1-H), 2.96 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.21–2.16 (m, 2H, 2-H), 1.93–1.80 (m, 8H, 3-H, 3'-H, 5'-H, 7'-H), 1.68–1.60 (m, 2H, 6'-H), 1.51 (tq,  $J_1 = J_2 = 6.6 \text{ Hz}$ , 1H, 5''-H), 1.44–1.23 (m, 4H, 1'''-H, 2'''-H, 2'''-H, 3'''-H), 1.18–1.04 (m, 4H, 1'-H, 2''-H, 4''-H), 0.92 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 1'''-CH<sub>3</sub>), 0.89–0.83 (m, 11H, 7*a*''-CH<sub>3</sub>, 3''-H, 5''-CH<sub>3</sub>, 6''-H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 142.4 \text{ ppm}$ , 124.9, 69.9, 58.3, 55.9, 42.5, 38.9, 36.8, 35.3, 34.1, 30.0, 27.3, 27.1, 26.6, 24.7, 23.1, 22.6, 22.3, 21.3, 18.9, 18.7, 18.2; MS (CI):  $m/z$  (%) = 350 (5) [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 334 (100), 320 (48); MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 349 (8) [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>, 333 (40), 320 (6), 306 (8), 273 (16), 236 (33), 195 (52), 175 (60), 147 (52), 133 (72), 119 (60), 107 (100); HRMS (EI, 70 eV):  $m/z = 349.3338$  [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>NO: 349.3345.

#### 4.2. Strains of *S. cerevisiae* and cultural conditions

The recombinant strains of *S. cerevisiae*, SMY8[pSM61.21] (*MATa erg7::HIS3 hem1::TRP1 ura3-52-trp1-Δ63 LEU2::OSC S. cerevisiae his3-Δ200 ade2 Gal*<sup>+</sup>) expressing wild-type yeast OSC [36], SMY8 [pBJ1.21] (*MATa erg7::HIS3 hem1::TRP1 ura3-52-trp1-Δ63 LEU2::OSC T. cruzi his3-Δ200 ade2 Gal*<sup>+</sup>) expressing *T. cruzi* OSC [27], SMY8 [pBJ4.21] (*MATa erg7::HIS3 hem1::TRP1 ura3-52-trp1-Δ63 LEU2::OSC P. carinii his3-Δ200 ade2 Gal*<sup>+</sup>) expressing *P. carinii* OSC [27], SMY8 [pSM60.21] (*MATa erg7::HIS3 hem1::TRP1 ura3-52-trp1-Δ63 LEU2::OSC A. thaliana his3-Δ200 ade2 Gal*<sup>+</sup>) expressing *A. thaliana* OSC [37], and SMY8[pSOB1.1] (*MATa erg7::HIS3 hem1::TRP1 URA3::OSC H. sapiens trp1-Δ63 leu2-3.112 his3-Δ200 ade2 Gal*<sup>+</sup>) expressing *H. sapiens* OSC [38] were used.

Cells of SMY8[pSM61.21], SMY8[pBJ1.21], SMY8[pBJ4.21] and SMY8[pSM60.21] were grown aerobically at 30 °C to early stationary phase in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) supplemented with hemin (0.013 mg/mL) and ergosterol (0.02 mg/mL). Hemin is needed in the medium as the SMY8 strains contain a mutation (*hem1::TRP1*) affecting the heme biosynthesis. The presence of a heme mutant background is necessary for the viability of lanosterol synthase mutants in aerobic conditions [36]. OSCs expression was induced in YPG medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% galactose) supplemented with hemin (0.013 mg/mL). *A. thaliana* OSC expression in SMY8[pSM60.21] was induced in YPG medium in the presence of hemin (0.013 mg/mL) and ergosterol (0.02 mg/mL).

Cells of SMY8[pSOB1.1] were grown aerobically at 30 °C to early stationary phase in synthetic complete medium without uracil SC-Ura (0.17% yeast nitrogen base, 0.2% amino acids, 0.5% ammonium sulphate), with glucose (2%) in the presence of hemin (0.013 mg/mL) and ergosterol (0.02 mg/mL). Human OSC expression was induced in SC-Ura medium with galactose (2%) in the presence of hemin (0.013 mg/mL).

#### 4.3. Enzyme assays

Cell-free homogenates were obtained as described [38]. Briefly, after lysis of the cell wall with lyticase, the spheroplasts were homogenized with a Potter device. Proteins in the homogenate were quantified with a protein assay kit (Sigma), based on the method of Lowry modified by Peterson [39] using bovine serum albumin as a standard.

OSC activity was assayed as described [38]. Briefly, the homogenates were incubated with labeled [<sup>14</sup>C]-(3*S*)-2,3-oxidosqualene (1000 cpm). The enzymatic reaction was terminated by the addition of KOH in methanol (10% w/v), the lipids were saponified at 80 °C for 30 min and nonsaponifiable lipids were extracted with petroleum ether. Extracts were spotted on TLC plates using *n*-hexane/ethyl acetate (85:15) as the developing solvent. The conversion of labeled substrate to labeled product was determined by using a System 200 Imaging Scanner (Hewlett–Packard, Palo Alto, CA, USA).

OSC inhibition was carried out, as described above, by incubating the homogenates with labeled [<sup>14</sup>C]-(3*S*)-2,3-oxidosqualene (1000 cpm) in the presence of inhibitors. IC<sub>50</sub> values (inhibitor concentrations that reduced the enzymatic conversion by 50%) were calculated by non-linear regression analysis of the residual activity versus the log of inhibitor concentration using statistical software from GenStat (NAG, Oxford, UK).

#### 4.4. MTT assay [32]

HL-60 cells (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Braunschweig, Germany) were maintained in RPMI 1640 medium (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) containing 10% fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories, Cölbe, Germany) without antibiotics at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Solutions of the compounds in DMSO (1 μL, concentrations ranging from 10<sup>−9</sup> to 10<sup>−4</sup> mol/L) were incubated with 99 μL of a suspension of HL-60 cells (9 × 10<sup>5</sup> cells/mL) in RPMI 1640 medium with 10% FBS in 96 well plates for 24 h at 37 °C. Then, 10 μL of MTT solution in PBS (5 mg/mL) were added and the plate was incubated for another 2 h. The cells were quenched with 190 μL DMSO and after 1 h of continuously shaking of the plates a photometric evaluation on an ELISA plate reader MRX II (Dynex Technologies, Denkendorf, Germany; Software: Revelation 4.06) using the wavelength of 550 nm followed. The IC<sub>50</sub> values were calculated by using Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

#### 4.5. Assay for cholesterol biosynthesis inhibition

The whole cell assay for cholesterol biosynthesis inhibition was carried out on HL-60 cells as described by us previously [23].

#### Acknowledgments

We thank the University of Turin, and the regional government (Regione Piemonte) for financial support of this research to G.B., further we thank S. Matsuda (Rice University) for providing recombinant yeast strains.

#### References

- [1] P.D.G. Dean, *Steroidologia* 2 (1971) 143–157.
- [2] J.-L. Giner, C. Djerassi, *Phytochemistry* 39 (1995) 333–335.
- [3] E.J. Corey, H. Cheng, C.H. Baker, S.P.T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 1289–1296.
- [4] K.U. Wendt, K. Poralla, G.E. Schulz, *Science* 277 (1997) 1811–1815.
- [5] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* 432 (2004) 118–122.
- [6] D.J. Reinert, G. Balliano, G.E. Schulz, *Chem. Biol.* 11 (2004) 121–126.
- [7] O.H. Morand, J.D. Aebi, H. Dehmlow, Y.-H. Ji, N. Gains, H. Lengsfeld, J. Himber, *J. Lipid Res.* 38 (1997) 373–390.
- [8] S. Jolidon, A.-M. Polak, P. Guerry, P.G. Hartman, *Biochem. Soc. Trans.* 18 (1990) 47–48.
- [9] I.C. Rose, B.A. Sharpe, R.C. Lee, J.H. Griffin, J.O. Capobianco, D. Zakula, R.C. Goldman, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996) 97–103.
- [10] F.S. Buckner, J.H. Griffin, A.J. Wilson, W.C. Van Voorhis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1210–1215.
- [11] J.C. Hinshaw, D.-Y. Suh, P. Garnier, F.S. Buckner, R.T. Eastman, S.P.T. Matsuda, B.M. Joubert, I. Coppens, K.A. Joiner, S. Merali, T.E. Nash, G.D. Prestwich, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 4240–4243.
- [12] G. Balliano, H. Dehmlow, S. Oliaro-Bosso, M. Scaldaferrri, S. Taramino, F. Viola, G. Caron, J. Aebi, J. Ackermann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 718–723.
- [13] D. Staedler, C. Chapuis-Bernasconi, H. Dehmlow, H. Fischer, L. Jullierat-Jeanerret, J.D. Aebi, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 4990–5002.
- [14] L. Cattel, M. Ceruti, G. Balliano, F. Viola, G. Grosa, F. Rocco, P. Brusa, *Lipids* 30 (1995) 235–246.
- [15] A. Lenhart, D.J. Reinert, J.D. Aebi, H. Dehmlow, O.H. Morand, G.E. Schulz, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 2083–2092.
- [16] G.R. Brown, A.J. Foubister, M.C. Johnson, N.J. Newcombe, D. Waterson, S.L. Wells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 2213–2216.
- [17] R.C. Goldman, D. Zakula, J.O. Capobianco, B.A. Sharp, J.H. Griffin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 1044–1047.
- [18] S. Oliaro-Bosso, F. Viola, S. Matsuda, G. Cravotto, S. Tagliapietra, G. Balliano, *Lipids* 39 (2004) 1007–1012.
- [19] S. Oliaro-Bosso, F. Viola, S. Taramino, S. Tagliapietra, A. Barge, G. Cravotto, G. Balliano, *ChemMedChem* 2 (2007) 226–233.
- [20] Y.F. Zheng, A.C. Oehlschlager, N.H. Georgopadakou, P.G. Hartman, P. Scheliga, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 670–680.
- [21] M. Mark, P. Müller, R. Maier, B. Eisele, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 148–158.
- [22] D. Renard, J. Perruchon, M. Giera, J. Müller, F. Bracher, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 8123–8137.
- [23] M. Giera, F. Plössl, F. Bracher, *Steroids* 72 (2007) 633–642.
- [24] M. Giera, D. Renard, F. Plössl, F. Bracher, *Steroids* 73 (2008) 299–308.
- [25] A. Horling, C. Müller, R. Barthel, F. Bracher, P. Imming, *J. Med. Chem.* 76 (2012) 7614–7622.
- [26] A. Windaus, W. Grundmann, *L. Ann.* 524 (1936) 295–299.
- [27] P. Milla, F. Viola, S. Oliaro-Bosso, F. Rocco, L. Cattel, B.M. Joubert, R.J. LeClair, S.P.T. Matsuda, G. Balliano, *Lipids* 37 (2002) 1171–1176.
- [28] M.M. Meyer, M.J.R. Segura, W.K. Wilson, S.P.T. Matsuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 4090–4092.
- [29] H.H. Inhoffen, G. Quinkert, S. Schütz, D. Kampe, G.F. Domagk, *Chem. Ber.* 90 (1957) 664–673.
- [30] R.D. Hoffsommer, D. Taub, N.L. Wendler, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 4134–4137.
- [31] G. Balliano, F. Viola, M. Ceruti, L. Cattel, *Biochim. Biophys. Acta* 959 (1988) 9–19.
- [32] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [33] M. Ceruti, G. Balliano, F. Viola, L. Cattel, N. Gerst, F. Schuber, *Eur. J. Med. Chem.* 22 (1987) 199–208.
- [34] R.B. Field, C.E. Holmud, N.F. Whittaker, *Lipids* 14 (1979) 741–747.
- [35] M. Ceruti, G. Balliano, F. Rocco, P. Milla, S. Arpicco, L. Cattel, F. Viola, *Lipids* 36 (2001) 629–636.
- [36] E.J. Corey, S.P.T. Matsuda, C.H. Baker, A.Y. Ting, H. Cheng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219 (1996) 327–331.
- [37] E.J. Corey, S.P.T. Matsuda, B. Bartel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 11628–11632.
- [38] S. Oliaro-Bosso, S. Taramino, F. Viola, S. Tagliapietra, G. Ermondi, G. Cravotto, G. Balliano, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24 (2008) 589–598.
- [39] G.L. Peterson, *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346–356.

### 1.2.1.3 Beitrag am Artikel

Die Synthesepaltung und Durchführung unterlag Stefanie Lange, Marco Keller und Prof. Dr. Franz Bracher. Das Skript wurde von Marco Keller, Prof. Dr. Gianni Balliano und Prof. Dr. Franz Bracher erstellt. Prof. Dr. Simonetta Oliaro-Bosso und Prof. Dr. Gianni Balliano (Universität Turin) führten die Testung der Substanzen an den isolierten OSC-Typen durch. Die Verbindungen **4** und **6**, sowie die Referenzinhibitoren BIBX 79 und Ro 48-8071 unterlagen meiner eigenen Testung (Kapitel 1.2.1.2 im Artikel unter Absatz 2.2.2 *Assay for inhibition of cholesterol biosynthesis in cells*), außerdem war ich bei der Interpretation der Ergebnisse der biologischen Daten beteiligt.

Die Detektion von Squalenepoxid im Cholesterol-Biosynthese-Assay wurde von mir persönlich optimiert, so dass sie nun für die Identifizierung von OSC-Inhibitoren im Routinebetrieb geeignet ist. Martin Giera verwendete in seiner Arbeit reines TSIM (Trimethylsilylimidazol) als Silylierungsreagenz [1, 2]. Im Routinebetrieb führte die alleinige Verwendung von TSIM jedoch zum starken Anstieg der Basislinie und zu tailenden Peaks, beide Tatsachen wurden auch von Martin Giera als problematisch geschildert [1]. Daher wurde eine Mischung aus TSIM mit MSTFA (*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid) gewählt. MSTFA zeigt die oben genannten Effekte nicht, da es ein schonenderes Silylierungsreagenz ist. Die alleinige Verwendung von MSTFA reichte jedoch nicht für eine zufriedenstellende Detektion aller Sterole aus. Jedoch kam es unter der Verwendung von MSTFA mit Zusätzen an TSIM (10%) zum „*sample breakdown*“ von Squalenepoxid. Dies wurde bereits von Giera beschrieben und in eigenen Studien bestätigt. Die Lösung des Problems lag in der Verwendung von verschiedenen Mischungsverhältnissen von TSIM mit MSTFA. Für die reine Sterolanalytik wurde eine 9:1 (MSTFA:TSIM) Mischung verwendet (vgl. Kapitel 1.2.5.2, 1.2.7.2, 1.3). Damit blieben alle Sterole gut nachweisbar und es wurde nur ein geringer Anstieg der Basislinie (Säulenbluten) beobachtet. Die Lebenszeit der GC-Säule wurde somit ebenfalls verlängert. Die Untersuchungen von möglichen OSC-Inhibitoren, sprich die Detektion von Oxidosqualen, wurden mit einer Mischung im Verhältnis 1:1 bewerkstelligt. Ein höheres Säulenbluten, kürzere GC-Säulen-Haltbarkeit sowie tailende Peaks mussten dabei in Kauf genommen werden um Oxidosqualen dauerhaft und reproduzierbar nachweisbar zu machen.



## 1.2.2 Oxidosqualencyclase-Inhibitoren, zweite Generation

*Keller M, Müller C, Bracher F. Synthesis of new and selective inhibitors of human oxidosqualene cyclase. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Jena, September 2009.*

### 1.2.2.1 Zusammenfassung

Im Vordergrund dieser Arbeit stand, unter Beibehalt des Konzeptes der Imitation von HEIs das Bestreben, das sehr teure Grundmanns Keton durch einfache „steroidomimetische“ Strukturen zu ersetzen. Die Herstellung von Verbindungen nach Lange (Kapitel 1.2.1.2) ist ferner sehr aufwändig, da Rücksicht auf diverse epimerisierbare Stereozentren genommen werden muss. Die Arbeit von Lange zeigte schon, dass die Nachahmung auch der lipophilen Teile (Seitenkette) des Sterolgrundgerüsts essenziell ist. Daher musste ein neuer Weg gefunden werden diesen zu imitieren. Anhaltspunkte bei der Syntheseplanung lieferten bekannte Referenzinhibitoren wie BIBX 79 und Ro 48-8071 (Kapitel 1.2.1.2 im Artikel unter Abbildung 1), sowie die Kristallstruktur der humanen OSC mit gebundenem Ro 48-8071 [27]. Während der Cyclisierung des offenkettigen Triterpens Oxidosqualen zu Lanosterol werden fünf carbokationische *High Energy Intermediates* (HEI) durchlaufen. In der ersten Generation von OSC-Inhibitoren wurden durch  $sp^3$ -hybridisierte Stickstoffatome in den Inhibitoren die HEI in Position pro C4 und pro C10 im Sterolgerüst imitiert. Bei der zweiten und dritten Generation sind nun zwei protonierbare Aminogruppen enthalten, die sowohl das HEI in Position pro C4 des Sterolgerüsts als auch das am entgegengesetzten Ende, an Position pro C20 imitieren. Die Synthese dieser neuen Verbindungen gelang mit Hilfe einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und einer nachfolgenden partiellen bzw. vollständigen Reduktion des Pyridinringes. Die Variationen der so erhaltenen Grundstruktur erfolgten mittels Alkylierung der dem pro C20-HEI entsprechenden benzyllischen Aminogruppe mit aliphatischen bzw. Arylalkylresten, welche die lipophile Seitenkette imitieren sollen. Die neu synthetisierten Verbindungen wurden am Cholesterol- und Ergosterol-Ganzzell-Assay, sowie im MTT-Test auf Zytotoxizität und im Agar-Diffusionstest getestet. Die Testung an isolierten OSC-Enzymen wurde 2009 nicht durchgeführt. Erst 2013 wurden Tests durch Prof. Dr. Balliano (Universität Turin) durchgeführt (siehe Tabelle 4). Die 4-(Tetrahydropyridin-3-yl)-benzylamin-Derivate zeigten eine Inhibition der humanen OSC. Sie gelten als neue Substanzklasse von OSC-Inhibitoren. Dabei steigerten aromatische Gruppen im Rest  $R^1$  die inhibitorische Aktivität. In Docking-Experimenten an der Kristallstruktur der humanen OSC konnte die Aktivität plausibel erklärt werden und neue, mögliche Strukturvariationen wurden berechnet. Diese wurden vor allem in die Syntheseplanung der dritten Generation von OSC-Inhibitoren einbezogen (Kapitel 1.2.3.2).



## 1.2.2.2 Vortrag



## Synthese neuer, selektiver Inhibitoren der humanen Oxidosqualencyclase

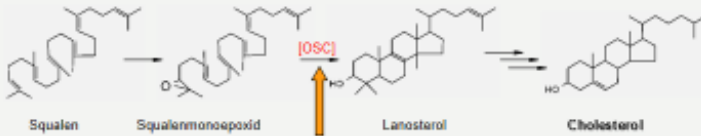
**Dipl. Chem. Marco Keller**

Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung  
Ludwig-Maximilians-Universität München

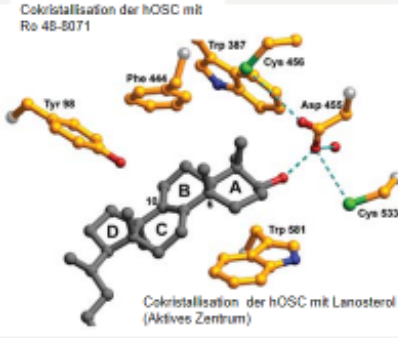
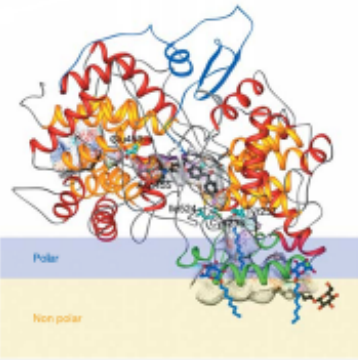


### Cholesterol-Biosynthese

Postsqualen-Abschnitt: Rolle der Oxidosqualencyclase (OSC)



Cokristallisation der hOSC mit Ro 48-8071



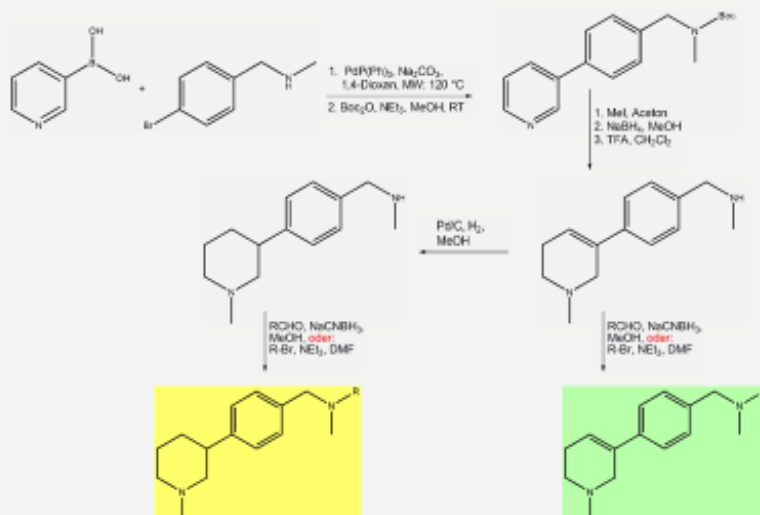
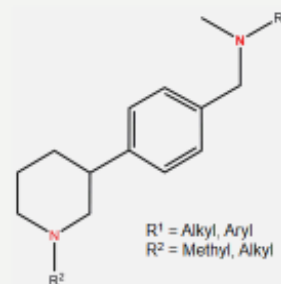
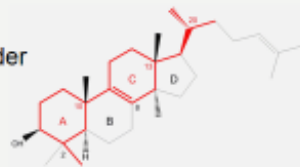
Cokristallisation der hOSC mit Lanosterol (Aktives Zentrum)

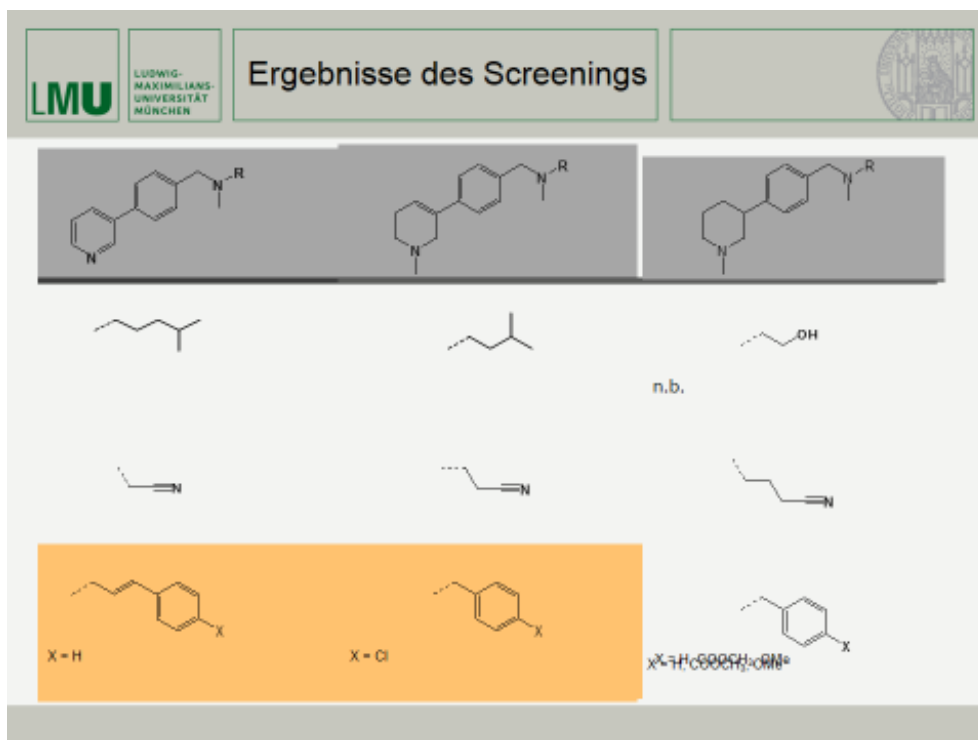
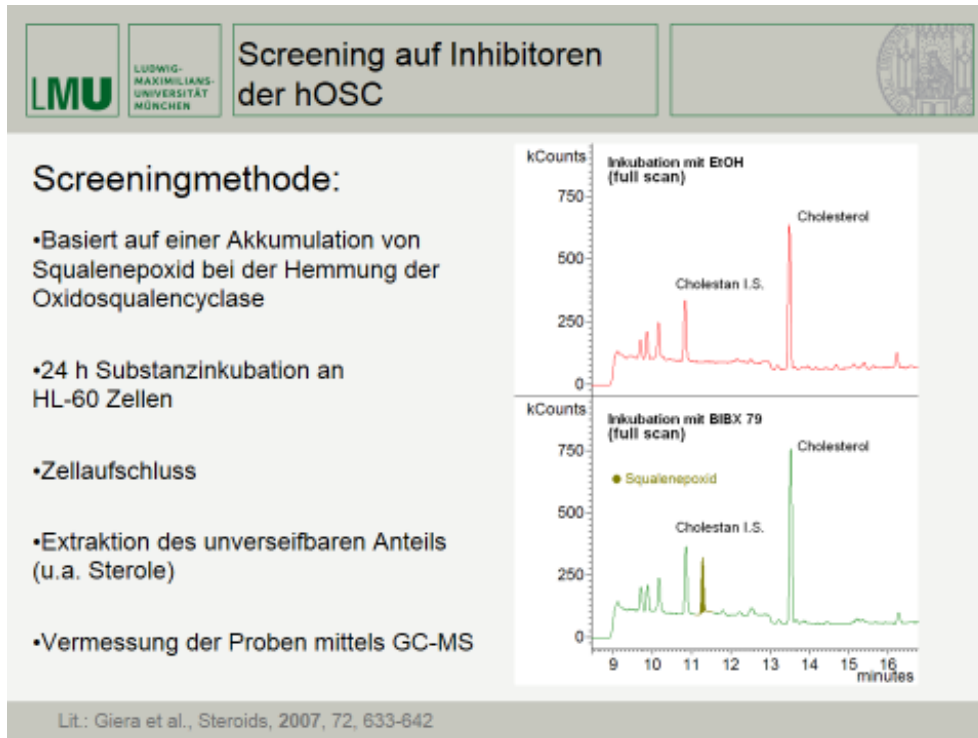
Lit: Thoma, R. et al., Nature, 2004, 432, 118-122



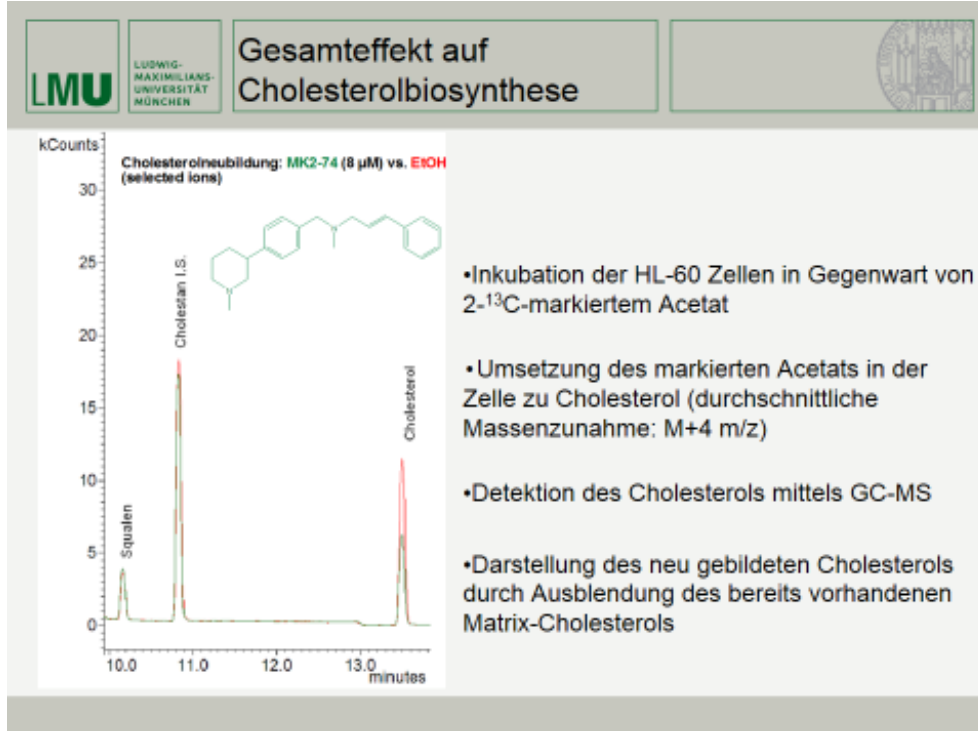
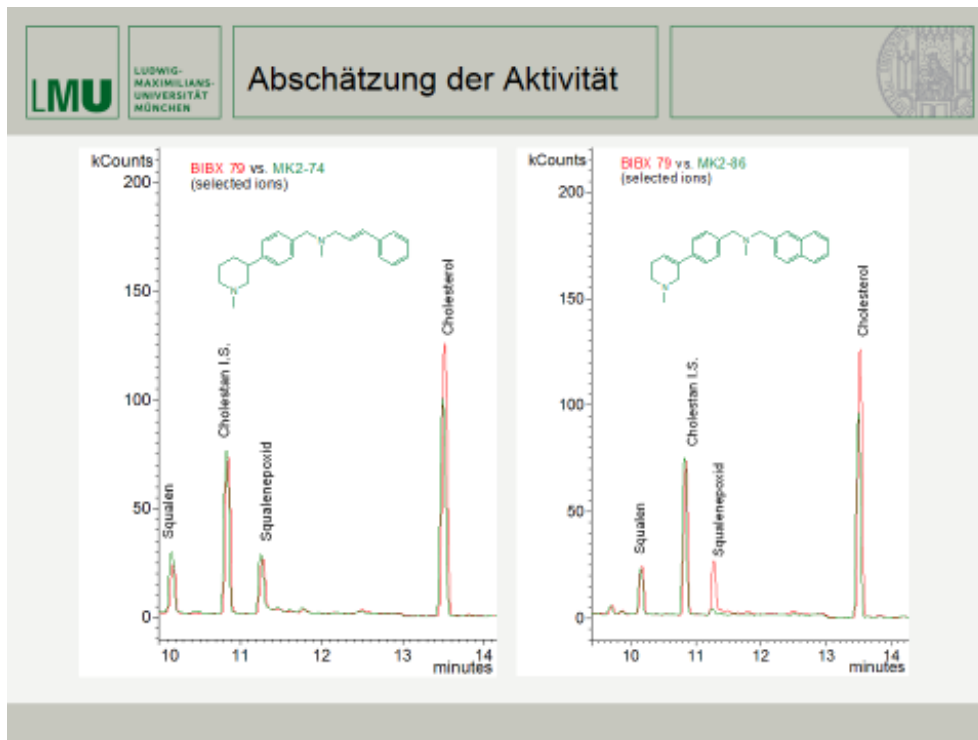
## High Energy Intermediates (HEIs)

- Die 5 carbokationischen Übergangszustände der Cyclisierung von Oxidosqualen zu Lanosterol
- Imitation der enzymgebundenen HEIs C-2 und C-20 sollte zu Substraten führen, die die OSC kompetitiv hemmen
- $sp^2$ -hybridisierte, carbokationische HEIs können durch unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegende Amine imitiert werden
- Diese bilden durch Kation- $\pi$ -Interaktionen stabile Enzym-Inhibitor Komplexe















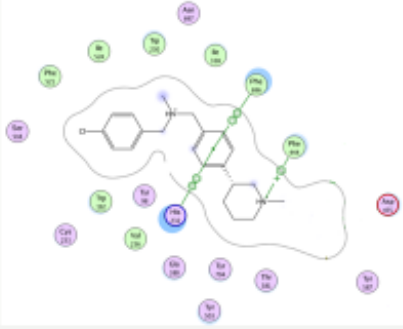
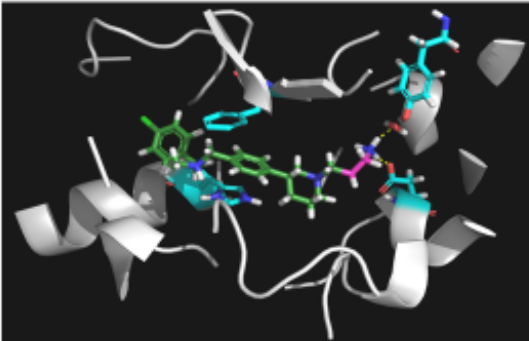
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

## Dockingstudien




### Docking-Experimente anhand der hOSC-Kristallstruktur\*:

- Untersuchung der Inhibitor-Enzymwechselwirkungen durch Docking von Strukturelementen
- Erarbeitung von sinnvollen Strukturvariationen





\* Lit.: Thoma, R. et al., Nature, 2004, 432, 118-122

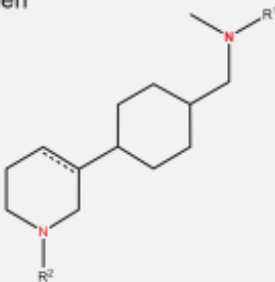


LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

## Zusammenfassung



- Durch Imitation der carbokationischen Zwischenstufen (HEIs) der enzymatischen Cyclisierung des Oxidosqualens können neuartige OSC-Inhibitoren entwickelt werden
- Substanzen, die sowohl das HEI pro C-2 als auch pro C-20 imitieren, erweisen sich als potente OSC-Inhibitoren
- Aromatische Gruppen im Rest R<sup>1</sup> steigern die inhibitorische Aktivität
- Dockingstudien zeigen, dass R<sup>2</sup> (bisher nur Methyl) durch Aminoalkylreste ersetzt werden kann





### 1.2.2.3 Beitrag an den im Vortrag präsentierten Forschungsergebnissen

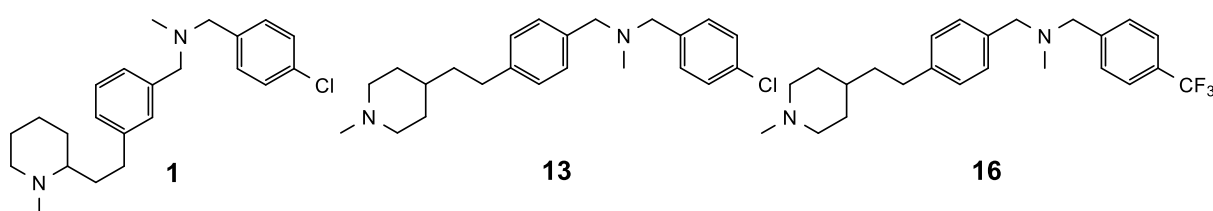
Die Syntheseplanung und die Durchführung, sowie die Konzeption des Vortrages wurden von Marco Keller und Prof. Dr. Franz Bracher bewerkstelligt. Meine Aufgabe bei dem Projekt lag darin, die neu synthetisierten Substanzen von Marco Keller im qualitativen Assay (Identifizierung des Zielenzyms in der Cholesterol- oder Ergosterol-Biosynthese) und im quantitativen Assay (Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte bezogen auf die Cholesterol-Neubildung in einem zellulären Assay) zu charakterisieren. Die besten Substanzen wurden anschließend im Vortrag präsentiert (vgl. Tabelle 4). Die Grafiken auf Folie 5, 7 und 8 stammten ebenfalls von mir. Rainer Wilcken und Prof. Dr. Frank Böckler berechneten durch Docking Experimente mögliche sinnvolle Strukturvariationen.

### 1.2.3 Oxidosqualencyclase-Inhibitoren, dritte Generation

Wolfgang A, Müller C, Keller M, Wilcken R, Böckler F, Bracher F. *Synthesis of new selective oxidosqualene cyclase inhibitors. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Innsbruck, September 2011.*

#### 1.2.3.1 Zusammenfassung

Die dritte Generation von OSC-Inhibitoren basiert sowohl auf der konsequenten Weiterentwicklung von bekannten Strukturen bereits getesteter, synthetisierter Verbindungen als auf Docking-Experimenten (Kapitel 1.2.1.2, 1.2.2.2). Die neuen Strukturelemente von OSC-Inhibitoren der zweiten Generation erwiesen sich als vielversprechend, daher diente Verbindung **1** (Kapitel 1.2.3.2, Abbildung 8) als Leitstruktur. Bei dieser war bis dato die stärkste Hemmung der Cholesterol-Neubildung zu beobachten. Jedoch betrug die Inhibition der Cholesterol-Biosynthese nur ein Drittel bis ein Zehntel der von Referenzinhibitoren wie BIBX 79 und Ro 48-8071. Die *in silico* Studien zeigten, dass durch Anknüpfung des Piperidinringes in Position 3 oder 4 (Kapitel 1.2.3.2, Verbindung **1** Position 2 des Piperidins, Abbildung 8) eine höhere Affinität zur OSC zu erreichen sein sollte. In einer siebenstufigen Synthese, analog zu Verbindungen der zweiten Generation, konnten neue 3- und 4-substituierte Piperidinderivate hergestellt werden. Alle Substanzen wurden dem Cholesterol-Biosynthese-Assay unterworfen, die Verbindungen zeigten entweder eine Aktivität auf die humane OSC oder gar keine Aktivität. Ebenfalls konnte in Pilzzellen kein Effekt nachgewiesen werden (Agar-Diffusionstest, Ergosterol-Biosynthese-Assay). Verbindung **16** (Kapitel 1.2.3.2, Abbildung 8), ein 4-substituiertes Piperidinderivat mit einer Trifluormethyl-Gruppe als Rest R, hemmte die Cholesterol-Neubildung dreimal stärker (30 nM) als Ro 48-8071.



**Abbildung 8:** Inhibitoren der humanen Oxidosqualencyclase der zweiten (Verbindung **1**) und dritten Generation (Verbindungen **13** und **16**) (vgl. Kapitel 1.2.2, 1.2.3.2)

Insgesamt wurden von mir 240 verschiedene Verbindungen der zweiten und dritten Generation von OSC-Inhibitoren getestet, 35 davon erwiesen sich als hochselektiv und potent. Verbindung **13** (Kapitel 1.2.3.2, Abbildung 8), ein 4-substituiertes Piperidinderivat mit einem Chloratom als Rest R, war

bei der Präsentation der Forschungsergebnisse in Kapitel 1.2.3.2 nur in der 1  $\mu$ M Testung (siehe Kapitel 1.2.1.1, 1.2.1.2). Erst hinterher wurde der  $IC_{50}$ -Wert, bezogen auf die Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese, bestimmt. Dieser lag bei 11 nM, das 95 % Konfidenz-Intervall lieferte einen Wert zwischen 10 und 13 nM. Damit ist Verbindung **13** 80-mal stärker als die Leitstruktur (Verbindung **1**) und immer noch 8-mal stärker als Ro 48-8071.

Für die in Vorbereitung befindlichen Publikationen habe ich zu fast allen Verbindungen der zweiten und dritten Generation die biologische Testung in den Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese-Assays durchgeführt. Außerdem gibt es zu den Substanzen mit den niedrigsten  $IC_{50}$ -Werten aus meiner Testung mittlerweile auch Testergebnisse an isolierten Oxidosqualencyclasen von Prof. Dr. Balliano aus Turin (vgl. Kapitel 1.2.1.2). Diese belegen die starke Hemmung der humanen OSC und zeigen zudem eine Selektivität gegenüber trypanosomaler OSC.

Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte am isolierten Enzym (Tabelle 2) sind zum Teil deutlich höher als die  $IC_{50}$ -Werte, die wir aus unserem eigenen Ganzzell-Cholesterol-Biosynthese-Assay ermittelt haben. Mögliche Gründe sind:

- Anreicherung der lipophilen Substanzen in der Zelle (Aufkonzentrierung)
- „Down-Regulation“ der HMG-Reduktase [13]
- Erhöhter Cholesterol Efflux aus der Zelle durch Bildung von Epoxicholesterol [13]
- Inhibition eines weiteren Enzyms im Präsqalen-Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese, welches mit unserem Testsystem nicht erkannt werden kann. Der Aufbau eines Testsystems für die Squalensynthase (Abbildung 5; Enzym k) befindet sich derzeit in Vorbereitung.

Name	IC <sub>50</sub> humane OSC [μM]	IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> OSC [μM]	IC <sub>50</sub> -Wert Cholesterol-Assay [μM]
AW-93	2,3	8,75	0,011
AW-98	2,7	> 10	0,097
AW-111	4,22	> 10	0,142
AW-124	5,01	> 10	0,172
AW-138	2,5	> 10	0,017
AW-152	0,51	> 10	0,261
AW-166	1,25	10	0,125
MK2-44	5,28	> 10	0,681
MK2-74	2,06	> 10	1,100
MK2-86	> 10	> 10	0,372
MK2-87	2,51	> 10	2,135
MK2-89	8,51	> 10	1,321
MK2-90	2,06	> 10	1,290
MK3-14	> 10	> 10	1,070

**Tabelle 2:** Übersicht über die Ergebnisse der Testung an isolierten Oxidosqualencyclasen von

Prof. Dr. Balliano aus Turin. Im Vergleich dazu die IC<sub>50</sub>-Werte bezogen auf die Cholesterol-Neubildung aus unserem eigenen Ganzzell-Cholesterol-Biosynthese-Assay

## 1.2.3.2 Poster

# Synthesis of new selective oxidosqualene cyclase inhibitors

Wolfgang A<sup>1</sup>, Müller Ch<sup>1</sup>, Keller M<sup>1</sup>, Wilcken R<sup>2</sup>, Böckler M F<sup>2</sup>, Bracher F<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy - Center for Drug Research, LMU Munich, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany

<sup>2</sup> Pharmazeutisches Institut, Eberhard Karls University, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen, Germany



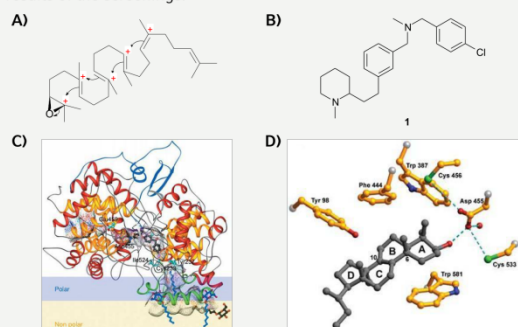
## INTRODUCTION

Oxidosqualene cyclase (OSC) is a key enzyme of sterol biosynthesis pathways. It catalyzes the cyclisation of the open-chain triterpene oxidosqualene through a number of carbocationic intermediates into lanosterol, the precursor of phytosterols, cholesterol and ergosterol [1].

In previous investigations we developed selective inhibitors of human OSC, e.g. compound **1**. The rationale of these investigations was to mimic two of the five cationic high energy intermediates (HEI) of the cyclisation cascade by introducing sp<sup>3</sup>-hybridized, protonable nitrogen atoms at pertinent positions.

Based on this lead structure and the already reported crystal structure of the enzyme OSC [2], we undertook some modifications of the piperidine moiety of inhibitor **1**, which imitates the first HEI in the cascade, located in ring A of the emerging sterol ring system. Docking experiments suggested that analogues of **1** containing a 3- and 4-substituted piperidine moiety should have even higher affinity to OSC.

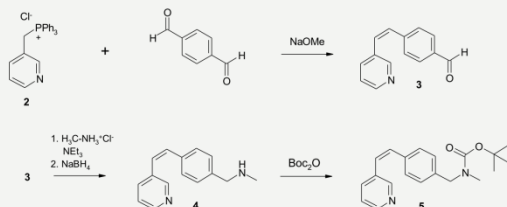
Here we present a synthetic approach to structural isomers of **1** and the results of the screenings.



A) Schematic cyclisation cascade of oxidosqualene to lanosterol; positions of the cationic HEI are marked as "+". B) Lead structure **1**. C) Crystal structure of the human membrane protein OSC. D) Structure of the OSC-lanosterol complex [2]

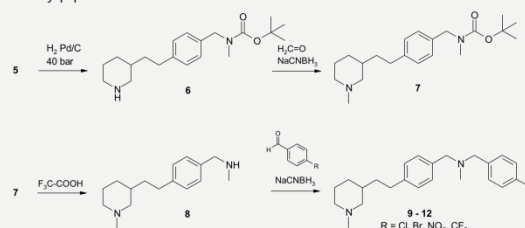
## SYNTHETIC PATHWAY

The ethylene bridge between the two aromatic rings was established by Wittig Reaction of terephthalaldehyde and 3-pyridinylmethylphosphonium chloride (**2**) [3]. The phosphonium salt **2** was prepared from 3-picolylchloride and triphenylphosphine. A 5:1 molar ratio terephthalaldehyde/Wittig reagent was chosen to prevent reaction on both aldehyde functionalities.



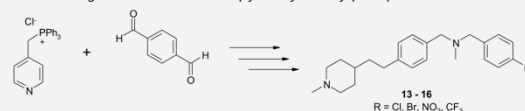
Indirect reductive amination of the resulting aldehyde **3** with methylamine and NaBH<sub>4</sub> gave the benzylamine **4**. In order to be able to functionalize each of the two nitrogen groups of the molecule separately, the secondary amino group of **4** was protected using the Boc group. This protective group was chosen because of its stability under basic and reductive conditions.

Catalytic hydrogenation of both the pyridine and olefine moieties of **5** gave the piperidine **6**. Subsequent reductive N-methylation gave the N-methylpiperidine **7**.



The Boc protecting group was removed using trifluoroacetic acid, and the resulting secondary amine **8** was converted to the target products **9 - 12** in direct reductive amination reactions with various aromatic aldehydes.

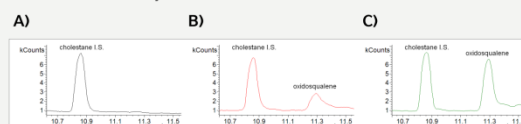
The isomeric 4-substituted piperidine analogues **13 - 16** were prepared in an analogous manner from 4-pyridinylmethylphosphonium chloride.



## BIOLOGICAL RESULTS

The compounds were screened in our whole cell assays for identification of cholesterol and ergosterol biosynthesis inhibitors. These systems enable us to detect any inhibited enzyme in the post-squalene parts of both biosyntheses by incubation with potential inhibitors and subsequent analysis of changes in the sterol patterns by GC-MS [4, 5].

We found that all of the compounds have no effects on ergosterol biosynthesis, but are highly active inhibitors of the human OSC by comparison with known inhibitors like **1**, Ro 48-8071 and BIBX 79. Incubation leads to a significant accumulation of oxidosqualene, the substrate of the enzyme OSC.



A) control; B) compound **1** (1 µM); C) compound **16** (R = CF<sub>3</sub>) (1 µM)

In an assay for determination of the overall inhibition of cholesterol biosynthesis [4] compounds **9-16** showed 100% inhibition at 1 µM. Compound **16** was superior to the reference inhibitors and lead structure **1**, and inhibited cholesterol biosynthesis in a low nM range.

Compound	IC <sub>50</sub> values for the inhibition of total cholesterol biosynthesis
BIBX 79 (reference inhibitor)	300 nM
Ro 48-8071 (reference inhibitor)	90 nM
compound <b>1</b> (lead structure)	800 nM
compound <b>16</b> (R=CF <sub>3</sub> ) (new structure)	30 nM

In conclusion, we developed very potent new inhibitors of human OSC based on *in silico* methods and advancement of our lead structure **1**.

## References

- [1] Abe, I. et al. (1993) Chem. Rev. 93, 2189-2206
- [2] Thoma, R. et al. (2004) Nature 432, 118-122
- [3] Albate, S. et al. (2006) Tetrahedron 62, 139-148
- [4] Giera, M. et al. (2007) Steroids 72, 633-642
- [5] Renard, D. et al. (2009) Bioorg. Med. Chem. 17, 8123-8137

### 1.2.3.3 Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen

Die notwendige biologische Testung, sprich Identifizierung der Zielenzyme der Enzyminhibitoren (qualitativer Assay), Bestimmung der Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese (quantitativer Assay) bei ausgewählten Verbindungen und Beurteilung der Wirkstärke im Vergleich zu literaturbekannten Referenzinhibitoren, wurde von mir persönlich durchgeführt. Desweiteren habe ich die Reinheit der Substanzen mittels HPLC bestimmt. Der Text, die Grafik und das Layout im Teil „*Biological Results*“ wurden ebenfalls von mir erstellt.

Rainer Wilcken und Prof. Dr. Frank Böckler berechneten mögliche sinnvolle Strukturvariationen. Die Syntheseplanung und Durchführung, sowie die Konzeption des Posters wurden von Annette Wolfgardt, Marco Keller und Prof. Dr. Franz Bracher durchgeführt.

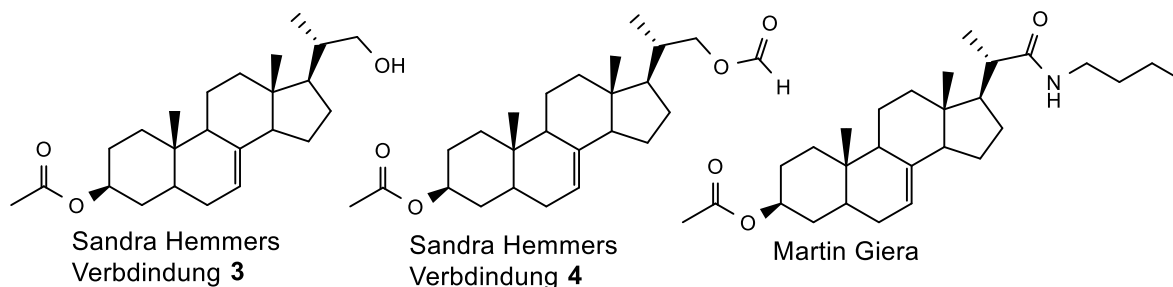
## 1.2.4 Inhibitoren der $\Delta^{24}$ -Reduktase

Hemmers S, Müller C, Bracher F. Side chain functionalized steroids as highly selective, noncytotoxic inhibitors of human  $\Delta^{24}$ -reductase. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Freiburg, Oktober 2013.

### 1.2.4.1 Zusammenfassung

Wie bereits in Kapitel 1.2 besprochen, könnten Inhibitoren der humanen  $\Delta^{24}$ -Reduktase als Chemotherapeutika [17] oder als molekulare Werkzeuge zur Erforschung der Desmosterolose eingesetzt werden. Die Regulierung der  $\Delta^{24}$ -Reduktase könnte des Weiteren eine wichtige Rolle in der Behandlung und Vorbeugung der Alzheimer-Erkrankung spielen [28], da nachgewiesen wurde, dass die Expression der  $\Delta^{24}$ -Reduktase bei Alzheimer-Patienten erniedrigt ist.

Die Verbindungen, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, stammen von Sandra Hemmers. Diese können in Analogie zu den Verbindungen von Martin Giera als Lathosterol-Seitenkettenester aufgefasst werden [1]. Die Verbindungen von Martin Giera hemmen jedoch die Lathosteroloxidase (vgl. Enzym s Abbildung 5, Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Vergleich von Verbindungen von Sandra Hemmers ( $\Delta^{24}$ -Reduktase-Inhibitoren) und Martin Giera (Lathosteroloxidase (= C5-Desaturase)-Inhibitoren)

Durch die Verwendung von Ergosterol konnte ein steroidaler Grundkörper (Verbindung 1, Kapitel 1.2.4.2) durch Veresterung der 3 $\beta$ -Hydroxygruppe und anschließende Ozonolyse in Position C22 gewonnen werden. Durch Erhalt des Sterolgerüsts können die Substanzen als falsche Substrate für Enzyminhibition in der Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese eingesetzt werden. Strukturvariationen an Verbindung 1 konnten vorgenommen werden nachdem der bei der Ozonolyse gebildete Aldehyd in der Seitenkette entweder zur Carbonsäure oxidiert oder zum Alkohol reduziert wurde.

Insgesamt wurden 14 Verbindungen aus dem Grundkörper hergestellt und der biologischen Testung unterworfen. Keine Verbindung war in der biologischen Grundtestung (vgl. Abbildung 3) besonders



aktiv, dennoch wurden sie in den Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese-Assays getestet. Ziel des gesamten Kapitels 1.2 ist es, Substanzen zu finden die (fast) keine Zytotoxizität besitzen und hoch selektiv nur ein Enzym in der Cholesterol-Biosynthese hemmen, eine Organismus-Selektivität ist zudem wünschenswert, jedoch nicht zwingend erforderlich. Mit Verbindung **4** (Abbildung 9), der Ameisensäureester von Verbindung **3**, konnte ein hochpotenter Inhibitor der humanen  $\Delta^{24}$ -Reduktase charakterisiert werden, als Markersterol diente dabei Desmosterol (vgl. Abbildung 5, sowie Abbildung 1 im Poster in Kapitel 1.2.4.2). Der  $IC_{50}$ -Wert bezogen auf die Gesamt-Cholesterol-Neubildung betrug 11 nM. Die Verbindung **3**, der freie Seitenketten-Alkohol von Verbindung **4**, zeigte überraschenderweise keine Aktivität in den Assays.

Martin Giera konnte in seiner Doktorarbeit bei den Lathosterol-Seitenkettenamiden beweisen, dass der Essigsäureester an Position C3 als „*prodrug*“ dient, da dieser in der Zelle unter physiologischen Bedingungen gespalten wird [1]. Inwieweit der Ameisensäureester in der Seitenkette von Verbindung **3** unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird, wurde bis jetzt nicht weiter untersucht. Da Verbindung **3** (freier Alkohol) keine Aktivität besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass die Veresterung mit der Ameisensäure aktivitätsbestimmend ist und der Ester von Verbindung **4** kein „*prodrug*“ ist.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass es nicht notwendig ist, unter physiologischen Bedingungen protonierbare funktionelle Gruppen in ein Molekül einzuführen um hochpotente Inhibitoren der Sterolbiosynthese herstellen zu können (vgl. Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.5, 1.2.6), obwohl es während der enzymatischen Reduktion der Doppelbindung in Position C24/25 zur Bildung eines HEI in Position C25 kommt. Eine Nachahmung dieses HEI erfolgt durch den Inhibitor von Sandra Hemmers offensichtlich nicht!

## 1.2.4.2 Poster

## Side chain functionalized steroids as highly selective, noncytotoxic inhibitors of human $\Delta^24$ -reductase

S. Hemmers, C. Müller, F. Bracher

Department of Pharmacy - Center for Drug Research, LMU Munich, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany



### Introduction

Mutations in the *DHCR24* gene, which encodes the cholesterol biosynthesis enzyme  $3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta^24$ -reductase (*DHCR24*, seladin-1), result in an autosomal recessive disease. Desmosterolosis is characterized by elevated levels of desmosterol in plasma, liver and kidney and leads to developmental malformations as well as neuropsychological alterations [1]. Furthermore expression of *DHCR24* is reduced in brain regions affected by Alzheimer's disease (AD) [2], thus indicating a correlation between *DHCR24* expression and the disease respectively neuroprotection. In consequence, modulation of *DHCR24* activity has to be considered as potential pharmacological target for treatment and prevention of AD [3]. The known overexpression of *DHCR24* in cancer cells of the prostate and the adrenal gland are as well indicating a correlation [4]. Inhibitors of  $\Delta^24$ -reductase could therefore be considered as molecular tools leading to a better understanding of these various diseases and the link to cholesterol respectively desmosterol synthesis and tissue levels of these biological compounds.

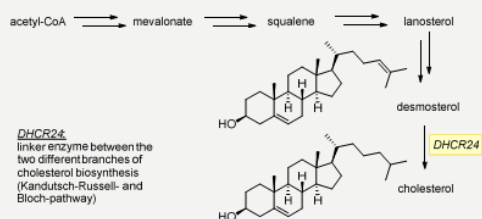


Figure 1:  $\Delta^24$ -Reductase in cholesterol biosynthesis (simplified)

Until now there are only a few unselective inhibitors of  $\Delta^24$ -reductase known (Figure 2) [5,6]. The discovery of the endogenous regulator 24(S),25-epoxysterol lead to the development of several side chain oxygenated sterols as inhibitors [7].

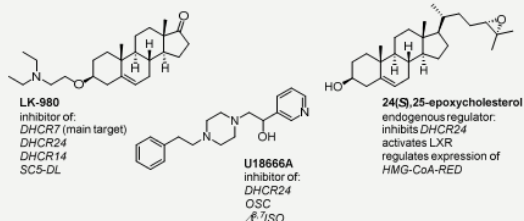
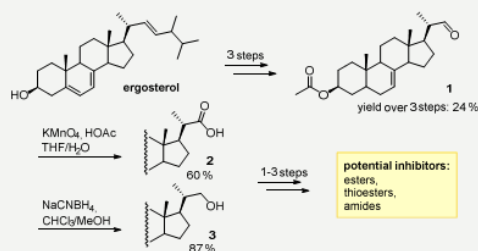


Figure 2: Examples of known inhibitors of  $\Delta^24$ -reductase (*DHCR24*) and their additional targets

All these inhibitors lead to the assumption that design of an inhibitor of  $\Delta^24$ -reductase should include a flat steroid backbone, respectively a mimic of it, and a steric equivalent to the side chain that fits in the active site but cannot be transformed by the enzyme.

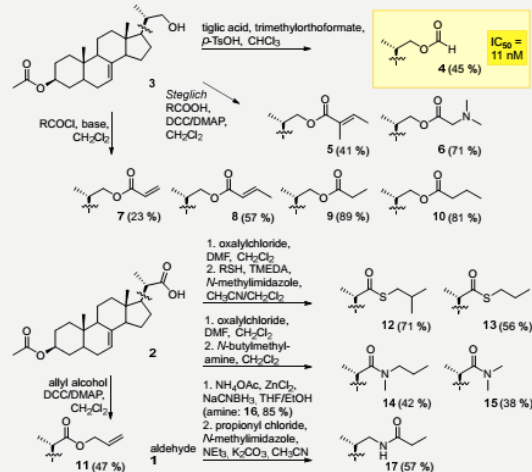
### Synthetic Pathway

Starting from commercially available ergosterol we developed highly selective and potent inhibitors of  $\Delta^24$ -reductase in 5 to 6 steps. The central building block aldehyde **1** was obtained via a known synthetic route. After oxidation to the carboxylic acid **2** or reduction to alcohol **3** further transformations led to a series of thioesters, esters and amides.



Scheme 1: Synthesis of the central building blocks carboxylic acid **2** and alcohol **3**

The desired target compounds **4-17** were obtained by a number of different reaction conditions in acceptable to very good yields (Scheme 2).



Scheme 2: Synthesis of the potential inhibitors **4-17**

### Biological Results

The obtained side chain functionalized steroids were tested in a MTT assay and an agar diffusion test as well as in whole cell cholesterol and ergosterol biosynthesis inhibitor screening assays (Table 1).

All tested compounds showed no antimicrobial activity in the agar diffusion assay and the MTT assay proved the compounds to be noncytotoxic (reference: cisplatin  $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$ ). Whole cell assays (Candida glabrata, Saccharomyces cerevisiae, Yarrowia lipolytica and HL-60) with subsequent GC-MS analysis of the resulting sterol patterns identified several compounds as inhibitors of human  $\Delta^24$ -reductase with no inhibitory effect on fungal ergosterol biosynthesis. The formic acid ester **4** could be identified as the best selective inhibitor with an  $\text{IC}_{50}$  of 11 nM relating to total cholesterol biosynthesis.

Compound	Agar diffusion test	MTT assay $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Ergosterol assay	Cholesterol assay
<b>4</b>	---	> 50	---	<i>DHCR24</i>
<b>5</b>	---	---	(SE)	<i>DHCR24</i>
<b>6</b>	---	---	n.t.	<i>DHCR24</i>
<b>7</b>	---	---	(SE)	<i>DHCR24</i>
<b>8</b>	---	---	(SE)	<i>DHCR24</i>
<b>9</b>	---	---	24SMT	unknown
<b>10</b>	---	---	24SMT	unknown
<b>11</b>	---	---	unknown	$\Delta^7$ -ISO
<b>12</b>	---	---	(SE)	---
<b>13</b>	---	43	(SE)	---
<b>14</b>	---	47	---	---
<b>15</b>	---	n.t.	---	---
<b>16</b>	---	29	---	<i>DHCR24</i>
<b>17</b>	---	---	n.t.	<i>DHCR24</i>

Table 1: Biological results (--- = no effect, n.t. = not tested; 24SMT = C24-sterolmethyltransferase, SE = squalene epoxidase,  $\Delta^7$ -ISO =  $\Delta^7$ -isomerase, *DHCR24* =  $\Delta^24$ -reductase)

In conclusion, we were able to develop a highly selective, very potent noncytotoxic inhibitor of  $\Delta^24$ -reductase. This is an interesting tool to investigate the correlations between *DHCR24* expression and neuroprotection (AD) or cancer cell development (prostate, adrenal gland) as well as the effects of desmosterolosis.

### References

- [1] Waterham, H.R. et al.: *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*(4): 685-694.
- [2] Wisniewski T. et al.: *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33*(3): 881-888.
- [3] Perl, A. et al.: *J. Mol. Endocrinol.* **2008**, *41*: 251-261.
- [4] M.-C. Battista et al.: *Prostate*, **2010**, *70*: 921-933.
- [5] Alimović, J. et al.: *Drug Metab. Dispos.*, **2011**, *39*(1): 39-46.
- [6] Cenedella, R.J.: *Lipids*, **2009**, *44*: 477-487.
- [7] Zerenitürk, E.J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1821*: 1269-1277.

#### **1.2.4.3 Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen**

Die biologische Testung, sprich Identifizierung der Zielenzyme der Enzyminhibitoren (qualitativer Assay) und Bestimmung der Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese (quantitativer Assay) bei der vielversprechendsten Verbindungen **4** wurde von mir durchgeführt.

Die Syntheseplanung und Durchführung, sowie die Konzeption des Posters wurden von Sandra Hemmers und Prof. Dr. Franz Bracher erledigt.

## 1.2.5 $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren von Mathias König

König M, Müller C, Bracher F. Stereoselective synthesis of a new class of potent and selective inhibitors of human  $\Delta^{8/7}$ -sterol isomerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013;21:1925-43.

### 1.2.5.1 Zusammenfassung

Dieses Kapitel und das folgende Kapitel 1.2.6 befassen sich mit strukturell neuartigen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren. Da diese zwei Klassen von Inhibitoren zeitgleich synthetisiert wurden, kann nicht von Generationen oder Weiterentwicklungen wie bei den OSC-Inhibitoren gesprochen werden.

Verschiedene Stoffwechselerkrankungen können durch eine Dysfunktion oder durch ein Fehlen von Enzymen in der Cholesterol-Biosynthese hervorgerufen werden. Das CHILD-Syndrom (*congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects*) und das Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom werden durch Mutation des Gens für die humane  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase ausgelöst. Die Inzidenz des CHILD Syndroms liegt bei unter 1: 1.000.000. Dieses Syndrom äußert sich als angeborene Halbseitenfehlbildung mit entzündlich-schuppender Haut, Gliedmaßen- und Organdefekte. Das Erscheinungsbild des Conradi-Hünemann-Happle-Syndroms ist hauptsächlich geprägt durch Ichthyosen, Chondrodysplasia punctata, Katarakt und Kleinwuchs. Die Vererbung erfolgt X-chromosomal-dominant, weshalb nur Mädchen/Frauen davon betroffen sind. Beide Erkrankungen können derzeit nur symptomatisch behandelt werden (vgl. Kapitel 1.2).

Insgesamt wurden 85 verschiedene Substanzen, alle synthetisiert ausgehend vom Grundmanns Keton, getestet, 32 davon zeigten eine Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Die interessantesten Verbindungen von Stefanie Lange synthetisierte ausgehend von Grundmanns Keton eine Reihe von Aminoketonen mit OSC-inhibitorischer Aktivität. Unter den Reaktionsbedingungen kam es allerdings zu einer Epimerisierung des Asymmetriezentrums neben der Ketogruppe (C3a). Leider ließen sich die erhaltenen Diastereomere nicht trennen. Durch die Einführung einer angulären Methylgruppe an C3a sollte Mathias König stabile isomerenreine Verbindungen synthetisieren, die ebenfalls die OSC inhibieren. Ein wichtiger Baustein bei der Syntheseplanung war auch hier die Imitation von *High Energy Intermediates* (HEI). Eine protonierbare Aminogruppe, welche zur Imitierung des HEI und des Rings B dient, sollte ebenfalls vorhanden sein. Das Amin ist unter physiologischen Bedingungen protoniert und imitiert ein HEI in Position pro C10. (Abbildung 7, Kapitel 1.2.1.2 Abbildung 2 im nachfolgenden Artikel).

Jedoch wurde überraschenderweise bei den Substanzen von Mathias König eine Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase beobachtet, was eine Imitierung des HEI in Position C8 nahelegt (vgl. Abbildung 7). Die Einführung einer zusätzlichen Methylgruppe könnte der Grund sein, warum die Substanzen nicht die OSC inhibieren, da sie nicht mehr in die Bindungstasche der OSC passen. Eine Bestätigung durch Docking Experimente wurde nicht durchgeführt (vgl. Kapitel 1.2.2, 1.2.3).

Die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase kann von verschiedensten Aminen gehemmt werden. Dies zeigte sich nicht nur in eigenen Versuchen (vgl. Kapitel 1.2.6, 1.3.2.2) sondern auch im Vergleich mit bekannten  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren (Kapitel 1.2.5.2, im Artikel Abbildung 3).

Aminoketon- und Aminoalkohol-Derivate des modifizierten Grundmanns Keton, unter Einführung einer angulären Methylgruppe in Position C3, zeigten die beste Aktivität im zellulären Cholesterol-Biosynthese-Assay. Um die Aktivität der synthetisierten Substanzen einordnen zu können, wurden sie mit entsprechenden Referenzinhibitoren noch in unspezifischen Tests (MTT-Test und MHK-Wert), sowie im spezifischen Ergosterol-Biosynthese-Assay (vgl. Kapitel 1.3.1.3) verglichen. Keine Substanz zeigte eine höhere Toxizität als Cisplatin im MTT-Test. Es konnte keine Aktivität in den Pilztestsystemen festgestellt werden. Daher gelten die Substanzen als selektiv auf humane Zellen, im Cholesterol-Testsystem akkumulierte nur Zymosterol. Die Referenzsubstanzen Tamoxifen und Tridemorph gelten beide als (unselektive) Inhibitoren der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase (siehe Kapitel 1.3.1.2) und zeigten eine Akkumulation von Zymosterol und Zymostenol an HL60 Zellen (vgl. Abbildung 5) [29]. Beide Sterole sind natürliche Substrate der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Die neu synthetisierten Substanzen lieferten jedoch nur eine Anreicherung von Zymostenol (vgl. Kapitel 1.2.6). Diese Beobachtung lässt sich durch eine zusätzliche schwache Hemmung der Referenzinhibitoren an der  $\Delta^{24}$ -Reduktase erklären (vgl. Abbildung 5 und im nachfolgenden abgebildeten Artikel die Abbildung 6). Die zusätzliche Hemmwirkung der  $\Delta^{24}$ -Reduktase durch Tamoxifen (Multienzymhemmung) ist beschrieben. Da sich Tridemorph im Ganzzell-Assay wie Tamoxifen verhalten hat, könnte neben der literaturbekannten Hemmung der  $\Delta^{14}$ -Reduktase (vgl. Kapitel 1.3), auch noch eine Hemmung der  $\Delta^{24}$ -Reduktase in Frage kommen. Eine Akkumulation von  $\Delta^{14}$ -Sterolen nach Inkubation mit Tridemorph konnte hingegen nicht beobachtet werden. Zudem gilt der Kandutsch-Russell Cholesterol-Biosyntheseweg unter den Testbedingungen in HL60 Zellen als bevorzugt, was Kapitel 1.2.7 belegt, da hier ebenfalls nur 7-DHC akkumulierte und nicht Cholesta-5,7,24-trienol. Daher lässt sich die Akkumulation von Zymostenol und Zymosterol nur durch eine zusätzliche Hemmung der  $\Delta^{24}$ -Reduktase erklären (ebenso in Kapitel 1.2.6,  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren von Melanie Krojer)

Die neu synthetisierten Substanzen wurden anschließend in einem quantitativen Vortest (Inkubation mit  $^{13}\text{C}$ -Acetat bei 1  $\mu\text{M}$ , siehe Kapitel 1.2.1.2) getestet. Die Besten wurden abschließend einer  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung unterzogen, für Substanz **29a** konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 11 nM für die Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese ermittelt werden.

Die hier vorgestellten Verbindungen sind hochpotente und selektive Inhibitoren der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Mit ihrer Hilfe können das CHILD und Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom besser erforscht werden. Die synthetisierten Verbindungen können als molekularbiologische Werkzeuge eingesetzt werden, um *in vitro/vivo* die Isomerase zu hemmen und so die Pathomechanismen für die Ausbildung der Syndrome zu aktivieren.

## 1.2.5.2 Artikel

Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry 21 (2013) 1925–1943



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmc](http://www.elsevier.com/locate/bmc)

## Stereoselective synthesis of a new class of potent and selective inhibitors of human $\Delta 8,7$ -sterol isomerase

Mathias König, Christoph Müller, Franz Bracher<sup>\*</sup>

Ludwig-Maximilians University, Department of Pharmacy, Center for Drug Research, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 May 2012

Revised 10 January 2013

Accepted 14 January 2013

Available online 31 January 2013

## Keywords:

Amino alcohols

Stereoselective synthesis

Cholesterol biosynthesis inhibitors

Human  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase

HL-60 cells

## ABSTRACT

Starting from Grundmann's ketone a new chemotype of inhibitors of the post-squalene part of cholesterol biosynthesis was developed. Stereoselective introduction of an angular methyl group at C-3a, followed by a plethora of functionalisations at C-4 and C-5 led to *cis*-configured amino alcohols as a new chemotype of inhibitors of cholesterol biosynthesis. In cell-based screening systems these compounds were identified to be selective inhibitors of human  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase, inhibiting total cholesterol biosynthesis with  $IC_{50}$  values in the low nanomolar range. The most active compounds did not affect fungal  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase (in ergosterol biosynthesis), neither showed noteworthy antimicrobial and cytotoxic effects.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The invention of enzyme inhibitors represents a major strategy in the development of novel drugs, and almost one third of the current top 50 drugs are enzyme inhibitors.<sup>1</sup> The enzymes of cholesterol biosynthesis are part of these interesting targets. Cholesterol is essential for the inducement of many crucial functions of vertebral plasma membranes.<sup>2</sup> It is the most representative sterol present in these membranes and it is the product of a multistep biosynthetic pathway. Two major pathways for cholesterol biosynthesis, the Kandutsch–Russell<sup>3,4</sup> and the Bloch<sup>5</sup> pathway are known. 7-Dehydrocholesterol is the immediate biosynthetic precursor of cholesterol in the Kandutsch–Russell pathway, and its reduction to cholesterol is catalyzed by the enzyme 3 $\beta$ -hydroxy-steroid- $\Delta^7$ -reductase. Desmosterol is the direct biosynthetic precursor of cholesterol in the Bloch pathway and differs from cholesterol only in a double bond in the side chain. Conversion of desmosterol to cholesterol is catalyzed by the enzyme 3 $\beta$ -hydroxy-steroid- $\Delta^{24}$ -reductase in the final step of this pathway (Fig. 1).<sup>6</sup>

In mammals the preferred pathway for cholesterol biosynthesis starts with the Bloch pathway and ends with the last steps of the Kandutsch–Russell pathway. This switch between the pathways can occur since certain intermediates of the Bloch pathway can be converted to the corresponding ones of the Kandutsch–Russell

pathway by action of the enzyme 3 $\beta$ -hydroxy-steroid- $\Delta^{24}$ -reductase (for details see [Supplementary data](#)).

Cholesterol is important for the formation of so called 'rafts' (DRMs—detergents resistant micro domains) which regulate several functions of the eukaryotic lipid membrane and are linked with the pathogenesis of certain diseases.<sup>7,8</sup> Cholesterol is also a precursor for steroid hormones and bile acids as well as it is relevant for the embryonic progress and morphogenesis.<sup>9</sup> Because of its eminent physiological role, disruptions in cholesterol metabolism cause various diseases. The most common are cardiovascular indispositions induced by an increased blood cholesterol level.<sup>10</sup>

The most prominent drugs marketed for treatment of hyperlipidaemia are the statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase, an enzyme acting early in the pre-squalene part of cholesterol biosynthesis. Since therapy with statins is accompanied by a number of side-effects<sup>11</sup> like muscle toxicity, causing muscle weakness and cramps or even myopathy requiring hospitalization and life-threatening rhabdomyolysis, new cholesterol-lowering drugs having other molecular mechanisms are desirable. For this purpose the post-squalene part of the cholesterol biosynthesis pathway offers attractive targets.<sup>12</sup>

Contrariwise, the inborn lack of late enzymes of cholesterol biosynthesis is known to generate rare but serious disorders. Thus, specific inhibitors of such enzymes should be valuable tools for getting deeper insight into these disorders.<sup>13,14</sup> For example, CHILD (congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects) syndrome<sup>15</sup> and Conradi–Hünemann–Happle syndrome<sup>16,17</sup> are dysmorphic syndromes of variable severity

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 77301; fax: +49 89 2180 77802.  
E-mail address: [Franz.Bracher@cup.uni-muenchen.de](mailto:Franz.Bracher@cup.uni-muenchen.de) (F. Bracher).

1926

M. König et al. / Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943

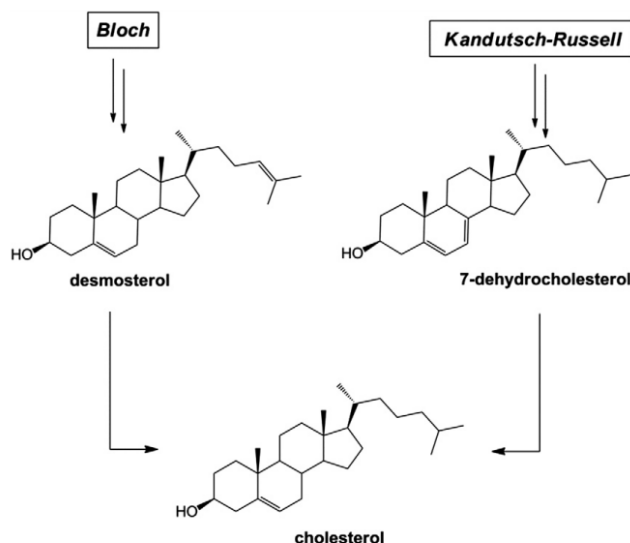


Figure 1. Chemical structures of the biosynthetic precursors of cholesterol: desmosterol (Bloch pathway) and 7-dehydrocholesterol (Kandutsch–Russell pathway).

due to mutations of the gene encoding the human  $3\beta$ -hydroxysteroid  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase (hSI; EC 5.3.3.5; also known as emopamil-binding protein, EBP).<sup>18</sup>

EBP is a vertebrate  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase which has been shown to exhibit equally high binding affinity for both enantiomers of the calcium channel blocker emopamil.<sup>19</sup> Human  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase catalyzes the shift of the double bond from C8–C9 to C7–C8 position in one of the last steps in both cholesterol biosynthesis pathways. In humans, such isomerisation occurs through a *trans* proton addition-elimination reaction<sup>20,21</sup> from either  $5\alpha$ -cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol (zymosterol, **1a**) to  $5\alpha$ -cholesta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol (**2a**) for the Bloch pathway or alternatively from cholesta-8-en-3 $\beta$ -ol (zymostenol, **1b**) to lathosterol (**2b**) for the Kandutsch–Russell pathway (Fig. 2). In case of a selective inhibition of  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase not the primary substrate zymosterol (**1a**), but zymostenol (**1b**) is the accumulating sterol. As mentioned above, the biosynthesis of cholesterol can switch from the Bloch to the Kandutsch–Russell pathway, and consequently, accumulating zymosterol (**1a**, Bloch pathway) can further be converted to zymostenol (**1b**, Kandutsch–Russell pathway) before the biosynthesis becomes definitely blocked.

The yeast counterpart ERG2p catalyses the corresponding step in ergosterol biosynthesis with the major difference that the isomerisation follows a *cis* proton addition-elimination reaction.<sup>20,21</sup> This stereoselectivity of both reaction mechanisms should allow for a selective inhibition of either the human or fungal  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase (EBP or ERG2p) by appropriately tailored inhibitors.

After the identification of morpholines (e.g., tridemorph) as inhibitors of  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase in fungi<sup>22</sup> and plants<sup>23</sup> a number of other inhibitors (e.g., **3–10**, Fig. 3) have been described that show more or less selective affinity for the human or the fungal enzyme.<sup>24,25</sup> Moreover, some of these inhibitors show multi-enzyme inhibition in the post-squalene part of sterol biosynthesis. Such a multi-enzyme inhibition can be advantageous in case of developing new antifungal agents by reducing fungal resistance. However it is estimated as a great drawback for inhibitors of cholesterol

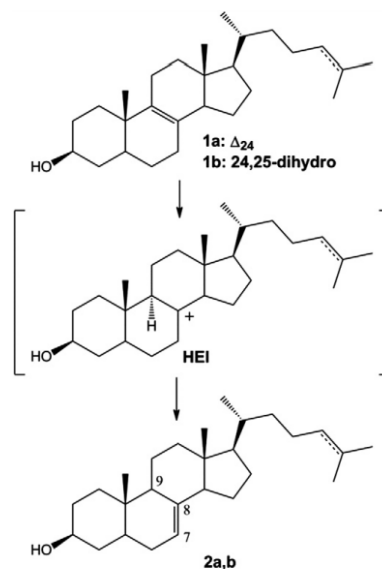


Figure 2. Human  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase-catalysed isomerisation going through a carbocationic high energy intermediate (HEI).

biosynthesis, since the resulting accumulation of particular precursors of cholesterol might cause severe side-effects.<sup>13–17</sup>

The reason for this disadvantageous multi-enzyme inhibition is connected with the molecular mode of action of the inhibitors. Not only sterol  $\Delta 8,7$ -isomerisation passes through a carbocationic high energy intermediate (HEI; Fig. 2), but also the steps mediated by

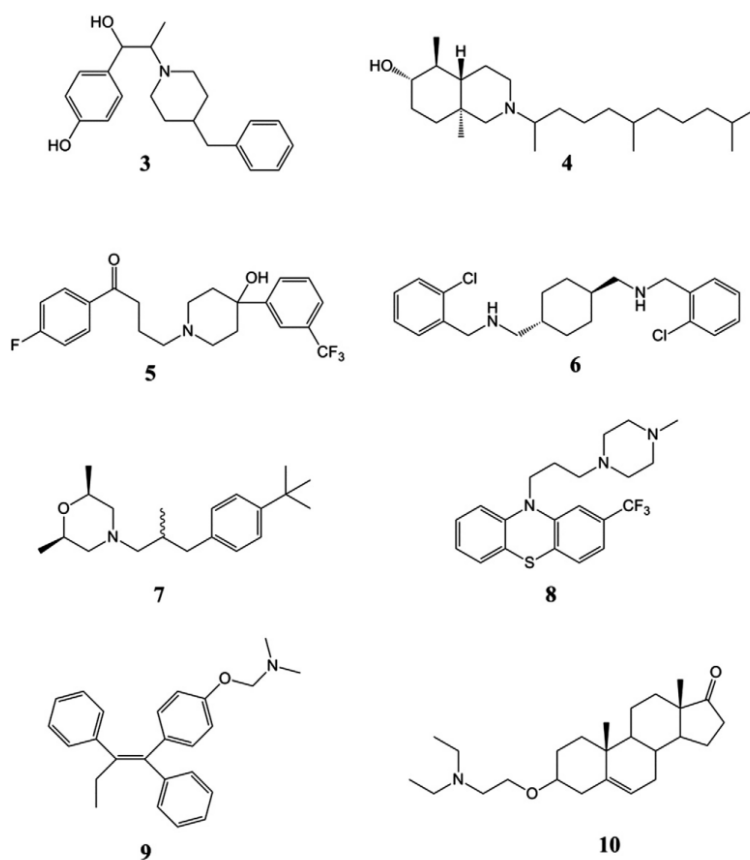


Figure 3. Structures of established  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase (EBP or ERG2p) inhibitors.

the  $\Delta 7$ -sterol reductase,  $\Delta 24$ -sterol reductase, and  $\Delta 14$ -sterol reductases do so.<sup>26</sup> Suitable structures containing protonable nitrogen atoms, and in some cases thionium ions,<sup>27,28</sup> in pertinent positions of the scaffold are able to mimic the cationic HEIs, and inhibit the enzymes due to the resulting high affinity to the active site.<sup>26</sup> The established inhibitors shown in Figure 3 contain, without exception, protonable amine functions. Besides inhibition of  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase, ifenprodil (**3**) and MDL28815 (**4**) also inhibit  $\Delta 14$ -sterol reductase,<sup>29</sup> trifluoperidol (**5**), AY9944 (**6**), and fenpropimorph (**7**) show additional inhibition of  $\Delta 7$ -sterol reductase.<sup>30,31</sup> trifluoperazine (**8**), tamoxifen (**9**), and U18666A (**10**) additionally inhibit  $\Delta 24$ -sterol reductase.<sup>32,33</sup> Furthermore, a number of azasteroids are known to exert their antifungal activities through imitation of carbocationic HEIs in ergosterol biosynthesis.<sup>27,28,34</sup>

In continuation of our research on new inhibitors of ergosterol<sup>28</sup> and cholesterol<sup>35</sup> biosynthesis we designed a new chemotype of selective inhibitors of human  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase. In order to achieve selective inhibition of the enzyme we invented HEI mimickers with high structural similarity to the steroidal substrate on the one side, and variable protonable amino groups localised in a domain matching ring B of the sterol on the other side. A versatile

building block covering rings C+D of the sterol scaffold, as well as the lipophilic steroid side chain, is Grundmann's ketone<sup>36</sup> (**11**). Recently, this ketone was used by us as a precursor of cytotoxic azasteroid analogues.<sup>37,38</sup> Before attaching amino residues to the six-membered ring, the well-known problem of epimerisation at position C-3a of Grundmann's ketone (**11**) had to be abolished. In literature it is reported that this epimerisation can occur in presence of alkaline as well as acidic reagents and so causes a loss of stereochemical integrity.<sup>39</sup> A stereoselective introduction of an angular methyl group at position C-3a, under retention of the *trans* connection of both rings, would eliminate the possibility of

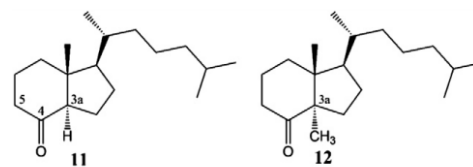


Figure 4. Grundmann's ketone (**11**) and modified ketone **12**.



1928

M. König et al./Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943

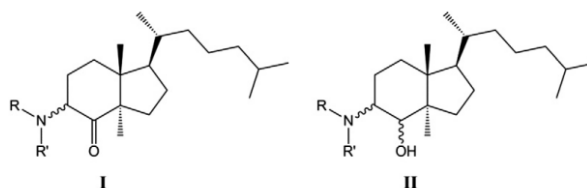


Figure 5. Target structures:  $\alpha$ -aminoketones (I) and  $\alpha$ -aminoalcohols (II).

epimerisation at this position and should also direct reactions performed at C-4 and C-5 (Fig. 4).

Starting from modified ketone **12** various stereoselective functionalisations at C-4 and C-5 should lead to an  $\alpha$ -bromoketone, and further on to amino ketones **I** and *trans*- and *cis*-configured amino alcohols **II** (Fig. 5). In cell-based screening systems<sup>20,32</sup> these compounds were to be tested for their inhibition of cholesterol and ergosterol biosynthesis.

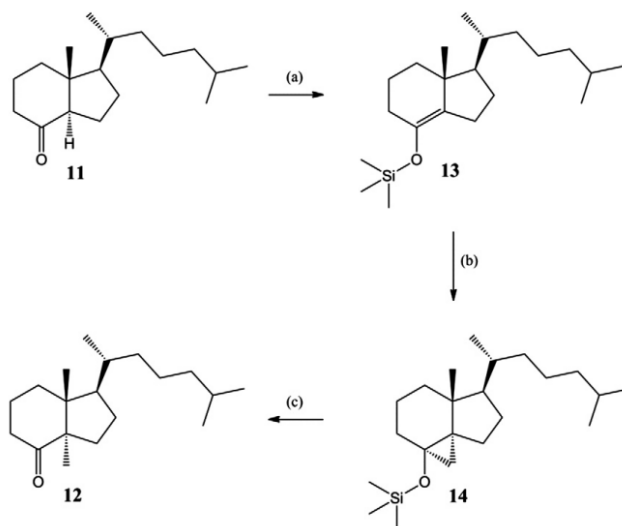
## 2. Chemistry

The synthesis of ketone **12** has previously been described rudimentarily by Corey et al.<sup>41</sup> and therefore the reaction conditions and work-up processes for the single steps had to be optimised. Conversion of Grundmann's ketone (**11**) to the trimethylsilyl enol ether **13** was done in dichloromethane with trimethylsilyl chloride (TMSCl) and lithium iodide in presence of hexamethyldisilazane ((TMS)<sub>2</sub>NH) in good yield (64%).<sup>42</sup> The silyl enol ether **13** was converted to the cyclopropane derivative **14** (yield 80%) in a Simmons–Smith-like reaction by using the Furukawa reagent diethylzinc (Et<sub>2</sub>Zn) and diiodomethane in diethyl ether.<sup>43,44</sup> The final alkaline hydrolysis<sup>43</sup> of the cyclopropane derivative **14** with sodium hydroxide in ethanol–water provided the *trans*-fused  $\alpha$ -methylated ketone **12** in good yield (88%) (Scheme 1).

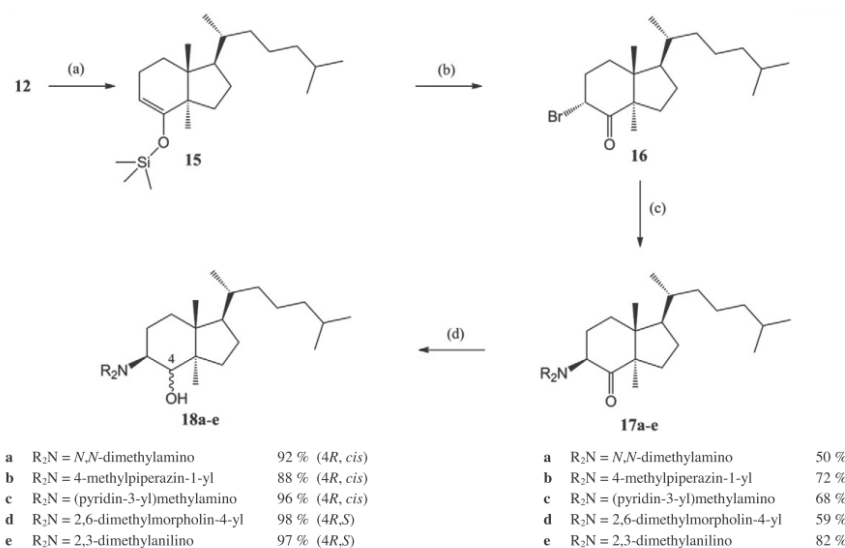
The first group of target structures (see Fig. 5, type I), the amino ketones **17a–e**, were prepared from bromoketone **16** (Scheme 2). This intermediate was obtained by treating ketone **12** in anhydrous THF with lithium diisopropylamide and trimethylsilyl chloride<sup>45</sup> to give the silyl enol ether **15** in good yield (83%), followed by stereoselective bromination (90% yield) with *N*-bromosuccinimide<sup>46</sup> in sodium acetate-buffered THF–water. The  $\alpha$ -bromoketone **16** and the particular primary or secondary amine were refluxed in DMF<sup>47</sup> to give the amino ketones **17a–e** under clean inversion at C-5 (Scheme 2).

First attempts to simply reduce the carbonyl function of amino ketones **17a–e** with lithium aluminium hydride<sup>48</sup> in THF resulted partially in epimeric mixtures of the corresponding amino alcohols. Reductions of **17a–c** occurred stereoselectively to give the *cis*-configured 4*R*,5*S*-amino alcohols, whereas reductions of **17d** and **17e** were not stereoselective (Scheme 2).

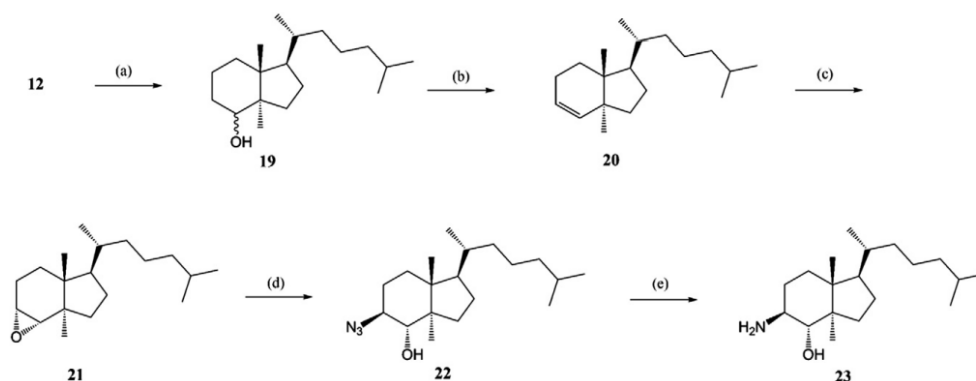
We could not find a structural explanation for the partially selective or non-selective reductions of ketones **17a–e**, and since the epimeric mixtures **18d** and **18e** could not be separated by silica column chromatography, sophisticated stereoselective transformations were elaborated to provide optionally each *trans*- and *cis*-configured amino alcohols **II** (Fig. 5) in a predictable manner. The central building block **23** for the preparation of *trans*-(4*S*,5*S*)-configured amino alcohols was obtained starting from ketone **12**



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) trimethylsilyl chloride, 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane, lithium iodide, dichloromethane, rt, 24 h (64%); (b) 1 M diethylzinc solution in hexane, diiodomethane, diethyl ether, reflux, 12 h (80%); (c) 2 M aqueous sodium hydroxide solution, ethanol, reflux, 12 h (88%).



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) lithium diisopropylamide, trimethylsilyl chloride, THF,  $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 14 h (83%); (b) *N*-bromosuccinimide, sodium acetate, THF/water, rt, 12 h (90%); (c) amine, DMF, reflux, 12 h; (d) lithium aluminium hydride, THF,  $0^{\circ}\text{C}$ , 30 min.



**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a) lithium aluminium hydride, THF,  $0^{\circ}\text{C}$ , 30 min (99%); (b) phosphorous oxychloride, pyridine, rt, 30 min (78%); (c) *m*-chloroperbenzoic acid, sodium bicarbonate, dichloromethane,  $5^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 2 h (93%); (d) sodium azide, DMF,  $130^{\circ}\text{C}$  (microwave, 150 W, 4 psi), 2 h (86%); (e) lithium aluminium hydride, THF,  $0^{\circ}\text{C}$ , 30 min (99%).

by lithium aluminium hydride reduction to give alcohol **19** (99% yield), followed by dehydration with phosphorous oxychloride<sup>49</sup> (78% yield) to give the olefin **20**. Stereoselective epoxidation of the olefin with *m*-chloroperbenzoic acid<sup>50</sup> gave the epoxide **21** in high yield (93%). Subsequent regio- and stereoselective microwave-accelerated ring opening with sodium azide<sup>51</sup> led to the azido alcohol **22** (86% yield), which finally was reduced with lithium aluminium hydride<sup>52</sup> to give the *trans*-(4*S*,5*S*)-configured amino alcohol **23** in almost quantitative yield (Scheme 3).

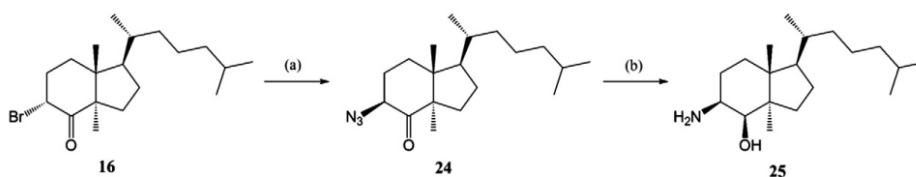
The epimeric *cis*-(4*R*,5*S*)-configured building block **25** for the preparation of amino alcohols of type **II** was obtained stereoselectively from  $\alpha$ -bromo ketone **16** (Scheme 2) by substitution with sodium azide<sup>53,54</sup> under clean inversion at C-5 to give the  $\alpha$ -azido

ketone **24** in high yield (87%), followed by lithium aluminium hydride<sup>52</sup> reduction of both the azido and keto groups (99% yield) (Scheme 4).

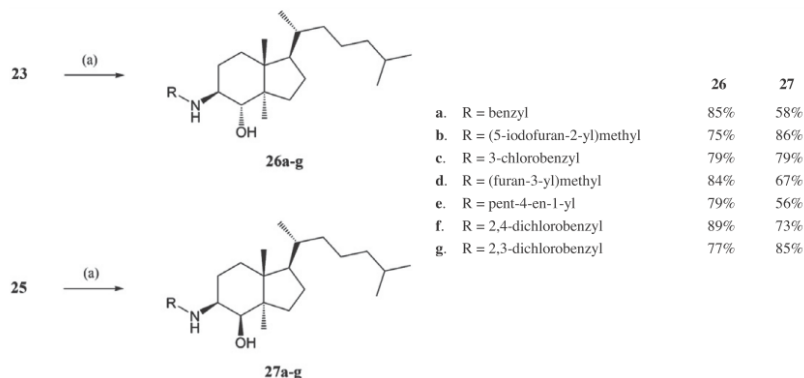
The relative configurations of the residues at C-3a, C-4 and C-5 of the epimeric amino alcohols were elucidated by DPFGSE-NOE experiments, and since configuration at C-3a was known, these data also lead to the absolute configurations of the molecules (see Supplementary data). With **25**, irradiation at the resonance frequency of 4-H lead to an enhancement of the resonances of both the angular methyl group at C-3a and 5-H, clearly indicating that 4-H is located at the same side of the six-membered ring as these two groups. In the analogous experiment with the *trans*-amino alcohol **23** a nuclear Overhauser effect was observed neither with

1930

M. König et al. / Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943



**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) sodium azide, DMF, 0 °C, 2 h (87%); (b) lithium aluminium hydride, THF, 0 °C, 30 min (99%).



**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) aldehyde, sodium cyanoborohydride, acetic acid, methanol, 40 °C, 12 h.

the methyl group, nor with 5-H, in full accordance with the proposed configuration.

The amino alcohols **23** and **25** were conveniently converted to a library of stereochemically pure secondary amines **26a–g** and **27a–g** by reductive *N*-alkylations<sup>55</sup> using various aldehydes and sodium cyanoborohydride (Scheme 5).

Since in a first screening for inhibition of cholesterol biosynthesis the *cis*-(4*R*,5*S*)-configured amino alcohols **27a–g**, especially the *N*-benzyl derivative (**27a**) and the *N*-pent-4-en-1-yl derivative (**27e**), showed significant inhibition of the  $\Delta$ 8,7-sterol isomerase, further modifications were accomplished in order to increase the activity of the *cis*-(4*R*,5*S*)-configured amino alcohols. Secondary amines **28a–c** were obtained by reductive *N*-alkylation<sup>55</sup> of primary amine **25** under the conditions as described above (Scheme 6). With regard to **27a** and **27e** these additional compounds feature increased electron density in the aromatic system and a different length of the aliphatic chain, respectively.

Another modification within this work was the synthesis of tertiary amines, again based on the two most promising structures **27a** and **27e**. *N*-Methylation was carried out using formaldehyde and sodium cyanoborohydride to give **29a** and **30** (Scheme 7). Additionally, different combinations of the most interesting *N*-residues (*N*-benzyl, *N*-pent-4-en-1-yl) were carried out by reductive *N*-alkylations of **27a** using either benzaldehyde or pent-4-enal and sodium cyanoborohydride to give the amino alcohols **29b** and **29c** (Scheme 7).

### 3. Biological assays

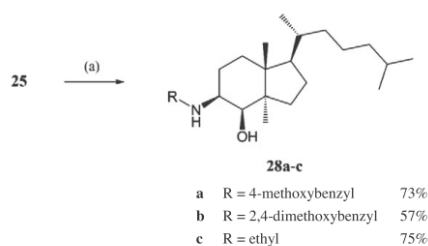
#### 3.1. Antifungal activity and inhibition of ergosterol biosynthesis

All substances were subjected to a biological assay defining their MIC (Minimal Inhibitory Concentration; this value is defined as the lowest concentration that leads to a visibly detectable com-

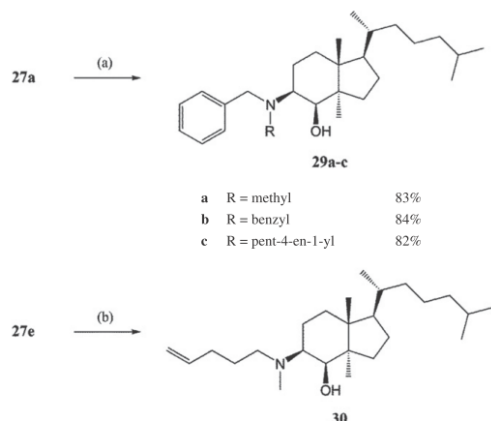
plete inhibition of growth) against 3 model strains (*Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) according to DIN 58940–84.<sup>56,57</sup> As we determined MIC values in the range from 25 to 50  $\mu$ g/mL (MIC values of reference inhibitor clotrimazole: *C. glabrata* 2.5  $\mu$ g/mL; *S. cerevisiae* 0.5  $\mu$ g/mL; *Y. lipolytica* 1.0  $\mu$ g/mL) it could be assumed that the compounds described here do not show noteworthy inhibition of cell growth, and hence do not affect ergosterol biosynthesis to a mentionable extent. For this reason investigations on the interaction of the compounds with ergosterol biosynthesis were abandoned.

#### 3.2. Qualitative and quantitative test for inhibition of cholesterol biosynthesis

For qualitative screening of potential cholesterol biosynthesis inhibitors, two concentrations (1 and 50  $\mu$ M) were initially pre-tested in a whole cell assay on HL-60 cells. This screening system, worked out by us previously,<sup>40</sup> allows for the identification of target enzymes in the post-squalene part of cholesterol biosynthesis by GC–MS analysis of the changes in the sterol pattern, as exemplified by the chromatograms shown in Figure 6. Whereas the untreated cells contained cholesterol as the only detectable sterol (chromatogram A), incubation with *cis*-amino alcohol **27a** (chromatogram B) led to a significant accumulation of zymostenol (**1b**), identified by comparing its relative retention time and MS data with those of an authentic sample.<sup>40</sup> Since **1b** is a substrate of human  $\Delta$ 8,7-sterol isomerase, the target enzyme was identified unambiguously. In contrast, the unselective inhibitor tamoxifen (**9**) led to an accumulation of both zymostenol (**1b**) and zymosterol (**1a**) in accordance with its dual mechanism<sup>32,33,58</sup> as inhibitor of both  $\Delta$ 8,7-sterol isomerase and  $\Delta$ 24-sterol reductase (chromatogram C). The amino ketones **17a–e** and the *trans*-amino alcohols **26a–g** did not induce noteworthy changes in the sterol pattern.



**Scheme 6.** Reagents and conditions: (a) aldehyde, sodium cyanoborohydride, acetic acid, methanol, 40 °C, 12 h.



**Scheme 7.** Reagents and conditions: (a) aldehyde, sodium cyanoborohydride, acetic acid, methanol, 40 °C, 12 h; (b) formaldehyde (38% aqueous solution), sodium cyanoborohydride, acetic acid, methanol, 40 °C, 12 h.

For quantitative screening we selected the substances that induced significant accumulation of zymostenol (**1b**) in the qualitative pre-screening. In this whole-cell assay<sup>40</sup> HL-60 cells are incubated with various concentrations of the test substances in the presence of 2-<sup>13</sup>C-acetate. Due to the incorporation of 4–7 <sup>13</sup>C atoms into cholesterol molecules biosynthesised during the incubation period, newly synthesised cholesterol can be distinguished from unlabelled matrix cholesterol that was present in the cells before incubation, by GC–MS. From the dose–response curves obtained by determination of <sup>13</sup>C-labelled cholesterol and after normalisation to the protein content by a Bradford assay,<sup>59</sup> the IC<sub>50</sub> values describing the overall effects of the inhibitors on

cholesterol biosynthesis in the cellular system were calculated (Table 1).

### 3.3. MTT-test for cytotoxic effects

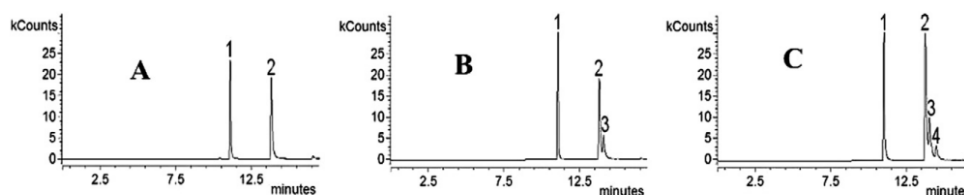
To determine possible cytotoxic effects, the substances were subjected to the standard MTT test developed by Mosmann.<sup>60</sup> Cis-platin was used as a reference, the results are shown in Table 1.

## 4. Discussion

Starting from Grundmann's ketone (**11**) and via its derivative **12** with an angular methyl group at C-3a, we prepared a collection of secosteroids containing amino ketone and amino alcohol moieties as potential inhibitors of cholesterol biosynthesis. Since reduction of the  $\alpha$ -aminoketones **17a–e** gave epimeric mixtures of amino alcohols **18a–e** in certain cases, we worked out fully stereoselective approaches to the primary amino alcohols **23** and **25**, from which the *trans*-(4*S*,5*S*)-configured amino alcohols **26a–g** and the *cis*-(4*R*,5*S*)-configured amino alcohols **27a–g**, **28a–c**, **29a–c** and **30** were readily accessible by standard reductive alkylation protocols.

These substances were subjected to several screening systems to determine their biological profile. The *in vitro* antifungal activities were assessed against the yeasts *C. glabrata*, *S. cerevisiae*, and *Y. lipolytica*. The compounds did not show noteworthy antifungal activity (MIC values higher than 25  $\mu$ g/mL), and hence no inhibition of ergosterol biosynthesis could be adopted. The effect on cholesterol biosynthesis was determined in a HL-60 cells based whole-cell assay with GC–MS analysis of the changes in the sterol pattern. Whereas the amino ketones **17a–e** and the *trans*-configured amino alcohols **26a–g** were inactive in this assay, selective inhibition of human  $\Delta$ 8,7-sterol isomerase could be shown for a considerable number of *cis*-configured amino alcohols. The most promising substances from this qualitative investigation were subjected to a quantitative screening to determine their effects on overall cholesterol biosynthesis (Table 1). In addition, a MTT test was performed to define the cytotoxicity of the substances (Table 1).

From the results from Table 1 and the structures of the other, inactive compounds from the *cis*-amino alcohol series some conclusions on structure–activity relationships can be drawn. The activity of the inhibitors is greatly influenced by the size of the amino group. Whereas compounds bearing very small substituents (primary amine **25**, *N,N*-dimethylamine **18a**) have IC<sub>50</sub> values in the submicromolar range, compounds bearing very bulky substituents like substituted benzyl residues are inactive. IC<sub>50</sub> values in the low nanomolar range can be found for compounds bearing one medium-sized substituent (benzyl, pent-4-en-1-yl) in combination with hydrogen (secondary amine **27a**) or a methyl group (tertiary amines **29a** and **30**). Combination of two of the medium-sized groups leads to a decrease (**29c**) or complete loss of activity (*N,N*-dibenzyl derivative **29b**).



**Figure 6.** Extracted ion chromatograms of the accumulating sterols after incubation of HL-60 cells with inhibitors (with respective qualifier ions in brackets): (A) untreated control; (B) **27a** 1  $\mu$ M; (C) tamoxifen (**9**) 1  $\mu$ M; peak 1 cholestane (internal standard, 357 + 217 + 203), peak 2 cholesterol (458 + 368 + 329), peak 3 zymostenol (**1b**) (458 + 353 + 213), peak 4 zymostenol (**1a**) (456 + 441 + 351).



1932

M. König et al. / Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943

**Table 1**

IC<sub>50</sub> values (nM) obtained in the MTT (see Section 3.3) test and in the assay for inhibition of overall cholesterol biosynthesis (see Section 3.2)

Compound	MTT test (nM)	IC <sub>50</sub> value (nM)	Confidence interval (nM)	R <sup>2</sup>
<b>18a</b>	17,000	576	462–720	0.899
<b>25</b>	11,000	581	477–638	0.948
<b>27a</b>	8000	15	14–18	0.959
<b>27e</b>	15,000	58	54–62	0.967
<b>29a</b>	7000	11	10–13	0.928
<b>29b</b>	27,000	>1000	—	—
<b>29c</b>	17,000	82	71–95	0.965
<b>30</b>	7000	18	16–20	0.973
Cisplatin	5000	—	—	—

IC<sub>50</sub> values (determined in triplicate) for the inhibition of total cell growth (MTT test) and total cholesterol biosynthesis through determination of <sup>13</sup>C incorporation into newly synthesised cholesterol. Confidence interval for the IC<sub>50</sub> value, 95%; R<sup>2</sup>, goodness of fit of the dose response curves.

Comparison of the corresponding IC<sub>50</sub> values (MTT test vs cholesterol biosynthesis assay) of the most promising substances **27a**, **29a**, and **30** shows that there is a large difference in activity (factor 390–630), and therefore cytotoxicity should not matter. As these most active compounds obviously do not affect the yeast ergosterol biosynthesis, highly selective inhibitors of human  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase that inhibit total cholesterol biosynthesis with IC<sub>50</sub> values in the low nanomolar range could be developed.

An inborn lack of the  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase is known to generate rare but serious disorders, so the inhibitors described here are not likely to be drug candidates. But due to their potent and specific inhibition of this enzyme they should be valuable tools for investigations aimed at a better understanding of disorders caused by defects in the gene encoding  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase.

## 5. Experimental section

### 5.1. Analysis and materials

All solvents were of HPLC or p.a. grade, otherwise they were distilled before use over appropriate drying agents. Unless stated otherwise, the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany) and Acros (Geel, Belgium), and were used without further purification. MSTFA and TSIM were from Marcherey & Nagel (Düren, Germany) Bondesil PSA was from Varian, 24-well plates were from Peske (Aindling-Arnshofen, Germany). Cholestane was obtained from Steraloids Inc. (Birmingham, UK), Bradford colour solution for protein determination was from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany), RPMI 1640 medium and fetal bovine serum (FBS) were from PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Germany), medium for HL-60 cells (lipid free medium) and lipoprotein deficient serum (LPDS) were purchased from PAN Biotech (Aidenbach, Germany). The yeast-culture mediums consisted of yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L and glucose 20 g/L. Each yeast culture was splitted once a week to keep the cultures in log phase. Each yeast culture was maintained at 28 °C. The 0.5 Mc Farland standard was prepared from 0.05 mL solution A (0.117 g BaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O in 10 mL of water) and 9.95 mL 10% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The *Candida glabrata*, *Candida cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* test cultures were purchased from DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). HL-60 cells were purchased from DSMZ and were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FBS without antibiotics at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

For syntheses, all anhydrous reactions were carried out under an inert atmosphere using Schlenk techniques. Reactions were monitored by TLC using pre-coated plastic sheets POLYGRAM®

SIL G/UV<sub>254</sub> from Marcherey & Nagel. Merck Silica Gel 60 (particle size 0.040–0.063 mm) was used for silica column chromatography (SCC). Yields refer to chromatographically and spectroscopically (<sup>1</sup>H NMR) homogeneous materials, unless otherwise stated. Structure assignment for all prepared compounds was done by using <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, as well as DEPT, HMQC, and HMBC techniques. NMR spectra were recorded on JEOL Eclipse plus NMR workstations (Jeol GSX 400 or JNM GX 500 instrument), respectively, at 500.1599 or 399.7820 MHz for <sup>1</sup>H and 125.7653 or 100.5253 MHz for <sup>13</sup>C. Spectra were calibrated by using residual undeuterated solvent as an internal reference (CHCl<sub>3</sub> with <sup>1</sup>H at 7.26 ppm, <sup>13</sup>C at 77.00 ppm). Mass spectra were recorded on a Hewlett-Packard 5989A, using electron impact ionisation (EI) at 70 eV and chemical ionisation with methane (CI). Electron impact high resolution mass spectra (EI-HRMS) were recorded on GC Mate II Jeol. The substances were directly injected. IR spectra were obtained on Perkin-Elmer Paragon 1000 spectrometer. The UV spectrophotometer Hitachi U 1100 was from Hitachi (Krefeld, Germany). Melting points were determined on a Büchi 540 apparatus.

### 5.2. Determination of the MIC values

For the determination of antifungal activity against *C. glabrata*, *C. cerevisiae* and *Y. lipolytica*, all substances were dissolved in absolute ethanol to give standard solutions with a concentration of 0.8 mg/mL. The solutions were diluted stepwise with ethanol to give the test concentrations of 50, 25 and 12.5 µg/mL. All dilutions were done like described in the SANCO guideline.<sup>57</sup> The dilutions were added to the 24-well plate, each row containing, respectively, two wells with the same concentration. Additionally, each well plate contained a control row consisting of two wells to which only 2.0 mL of medium had been added (sterility control), two wells to which only 10 µL of ethanol had been added (negative control) and two wells containing a concentration of 0.5 µg/mL clotrimazole (positive control). Each testing day additionally one row on a single plate was treated with ketoconazole (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) as 'MIC control'. The subsequent general process and the visual determination of the MIC values were described in literature before.<sup>28</sup>

### 5.3. GC–MS analysis

#### 5.3.1. Qualitative analysis of the sterol fractions

For qualitative analysis a Varian GC 3800 equipped with a CTC Combi Pal autosampler coupled to a Varian Saturn 2000 ion trap with a Varian Factor Four EZ Guard VF 5 MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm column was used. The 1177 injector was held at 250 °C and operated in splitless mode for 1 min. The transfer line was held at 270 °C. The oven program started at 50 °C held for 1 min, and ramped to 260 °C with 50 °C per min, followed by a gradient of 4 °C per min to 310 °C held for 0.5 min. The MS was operated in full scan mode from 9 to 12 min at a mass range from 50 to 450 m/z and from 12 to 18 min at a mass range from 100 to 650 m/z. For substance identification three qualifier ions were chosen for each sterol (Fig. 6).

#### 5.3.2. Quantitative analysis of labelled cholesterol

Quantitative analysis was carried out with a Varian GC 3800 equipped with a CTC Combi Pal autosampler coupled to a Varian Saturn 1200 triple quad. The column used was again a Varian Factor Four EZ Guard VF 5 MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm. The 1177 injector was held at 250 °C and operated in splitless mode for 1 min. The transfer line was held at 270 °C. The oven program started at 50 °C held for 1 min, and ramped to 260 °C with 50 °C per min, followed by a gradient of 4 °C per min to 310 °C held for 0.5 min. Quantification of the labelled cholesterol was carried out

by analysing the ions 372–379 and 462–469 *m/z*. For cholestane (I.S.) 217 and 357 *m/z* were chosen as quantifier ions.

#### 5.4. Incubation and work-up procedures for the identification of the target enzyme and for quantification of the inhibition of cholesterol biosynthesis

For the qualitative screening, two test concentrations (1 and 50  $\mu\text{M}$ ) were established. The substances were dissolved in ethanol and the initial weight was calculated for the matter that there was a final concentration of 50  $\mu\text{M}$  if 10  $\mu\text{L}$  of this solution were added to 990  $\mu\text{L}$  of lipid-free medium containing 1% LPDS without antibiotics. An aliquot of this 50  $\mu\text{M}$  solution was diluted by 1:50 in order to obtain the second needed concentration of 1  $\mu\text{M}$  if 10  $\mu\text{L}$  of this solution were added to 990  $\mu\text{L}$  of lipid free medium containing 1% LPDS without antibiotics.

HL-60 cells ( $10^6$  cells) were incubated in 24-well plates in 1 mL (990  $\mu\text{L}$  of lipid free medium containing 1% LPDS + 10  $\mu\text{L}$  of respective inhibitor solution). After a 24 h incubation period (conditions: 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ ) the content of each well was transferred into a 2 mL plastic tube and the wells were washed with 750  $\mu\text{L}$  of phosphate-buffered saline (PBS). The cells were collected by centrifugation at  $540 \times g$  for 5 min, washed once with 1 mL of PBS, and centrifuged again. After decantation 1 mL of 1 M NaOH was added to each tube, saponification was carried out at 70 °C for 60 min. Fifty microlitres of internal standard solution (cholestane in TBME, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) and 700  $\mu\text{L}$  of TBME were added and the tubes were shaken vigorously for 1 min and then centrifuged at  $9200 \times g$  for 5 min. The organic layer was separated with a pipette, and extraction was repeated with another 750  $\mu\text{L}$  of TBME in the same manner. The combined organic extracts were stirred vigorously over 35 mg of dried sodium sulphate and 5 mg of Bondesil PSA and then centrifuged for 5 min at  $9200 \times g$ . One millilitre of the purified extract was transferred into an autosampler vial and evaporated to dryness under mild stream of nitrogen. To each vial, 950  $\mu\text{L}$  of TBME and 50  $\mu\text{L}$  of *N*-trimethylsilylimidazole (TSIM) were added. Silylation reaction was carried out for 1 h at room temperature. The trimethylsilyl ethers were analysed as described in Section 5.3.1.

For the determination of labelled cholesterol (quantitative screening), the protocol was altered in the following manner: To each incubation well 10  $\mu\text{L}$  of a sterile sodium 2- $^{13}\text{C}$ -acetate solution (6.25 mg/mL) were added before addition of the inhibitor solution, leading to a final  $^{13}\text{C}$ -acetate concentration of 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . After saponification  $3 \times 25 \mu\text{L}$  aliquots were taken for protein determination according to Bradford,<sup>59</sup> using bovine serum albumin as standard. After work-up and silylation, GC–MS analysis was performed as described in Section 5.3.2. The percentage inhibition (Fig. 7, formula) relative to untreated control samples (0% inhibition) was plotted against the logarithmic inhibitor concentration using Graph Pad Prism 4. A bottom level constant equal to 0 was set as constraint using a sigmoidal dose–response model with a various slope. All samples were normalised to their protein content taking into account the number of cells. For each concentration the percentage was determined in triplicate.

#### 5.5. MTT test

For the determination of the cytotoxicity of the tested substances against human leukemia HL-60 cells a standard MTT test according to Mosmann was used. Cisplatin was utilised as reference.

#### 5.6. Syntheses

##### 5.6.1. (1*R*,3*aR*,7*aR*)-1-((*R*)-1,5-Dimethylhexyl)-3*a*,7*a*-dimethyloctahydroindene-4-one (12)

Compound **14** (345 mg, 0.98 mmol) was dissolved in a mixture of ethanol (10 mL) and an aqueous solution of sodium hydroxide

$$\%inhibition = \left[ 1 - \left( \frac{A_S \times A_{I,S,C} \times PC_C}{A_C \times A_{I,S,S} \times PC_S} \right) \right] \times 100$$

**Figure 7.** Calculation formula for the percentage inhibition;  $A_S$ : area sample;  $A_{I,S,C}$ : area internal standard control;  $PC_C$ : protein content control;  $A_C$ : area control;  $A_{I,S,S}$ : area internal standard sample;  $PC_S$ : protein content sample.

(2 M, 10 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 12 h. After evaporating ethanol under reduced pressure, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate ( $3 \times 20 \text{ mL}$ ). The combined organic extracts were washed with a aqueous hydrochloric acid (2 M, 30 mL) and water (30 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 9:1) to afford ketone **12** as a colourless oil (242 mg, 88%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2.55–2.40 (m, 2H, H-5, H-6), 2.27–2.20 (m, 1H, H-5), 1.93–1.67 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-7), 1.55–1.46 (m, 1H, H-5'), 1.45–1.19 (m, 5H, H-1, H-2', H-3', H-6), 1.15–1.05 (m, 4H, H-2, H-4', H-7), 1.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 1.01–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.92 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.3 \text{ Hz}$ ), 0.86 (d, 3H, H-6',  $J = 6.2 \text{ Hz}$ ), 0.85 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J = 6.2 \text{ Hz}$ ), 0.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  216.0 (CO), 60.8 (3a-C), 49.6 (7a-C), 47.0 (1-CH), 39.79 (5- $\text{CH}_2$ ), 38.0 (3- $\text{CH}_2$ ), 36.2 (7- $\text{CH}_2$ ), 35.3 (1'-CH), 31.5 (4'- $\text{CH}_2$ ), 28.9 (6- $\text{CH}_2$ ), 28.3 (5'-CH), 25.5 (2- $\text{CH}_2$ ), 24.6 (3'- $\text{CH}_2$ ), 23.2 (6'- $\text{CH}_3$ ), 22.9 ( $\text{CH}_3$ -5'), 21.8 (2'- $\text{CH}_2$ ), 19.9 ( $\text{CH}_3$ -3a), 19.1 ( $\text{CH}_3$ -7a), 18.2 ( $\text{CH}_3$ -1'). HRMS Found 278.4701 (Calcd 278.4727). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2931, 2862, 1723, 1451, 1379, 1105, 887, 860.  $[\alpha]_D^{20}$  –42 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

##### 5.6.2. [(1*R*,7*aR*)-1-((*R*)-1,5-Dimethylhexyl)-7*a*-methyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-4-yloxy]-trimethylsilane (13)

To a stirred solution of Grundmann's ketone **11** (500 mg, 1.91 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) under nitrogen atmosphere was added 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (335  $\mu\text{L}$ , 2.05 mmol), lithium iodide (280 mg, 2.10 mmol) and trimethylsilyl chloride (500  $\mu\text{L}$ , 4.12 mmol) at room temperature. The reaction mixture was obstructed from light and stirred for 24 h. Then triethylamine (2 mL) and a mixture of diethyl ether (50 mL) and a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (50 mL) were added. The organic layer was separated and the remaining aqueous layer was extracted with diethyl ether ( $2 \times 40 \text{ mL}$ ). The combined organic extracts were washed once with an aqueous hydrochloric acid (1 M, 50 mL) and once with water (50 mL), dried over sodium sulphate and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to silica column chromatography (SCC) (petroleum ether/ethyl acetate 99:1) to afford the silyl enol ether **13** as a colourless oil (411 mg, 64%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2.22–2.07 (m, 1H, H-5), 2.03–1.91 (m, 1H, H-5), 1.90–1.81 (m, 1H, H-1'), 1.79–1.50 (m, 5H, H-3, H-6, H-7), 1.41–1.32 (m, 1H, H-5'), 1.31–1.09 (m, 4H, H-1, H-2, H-2', H-6), 1.07–0.84 (m, 6H, H-2', H-2, H-3', H-4'), 0.77 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.6 \text{ Hz}$ ), 0.76–0.72 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a at 0.75 ppm), 0.71 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J = 6.2 \text{ Hz}$ ), 0.00 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  139.1 (4-CH), 126.6 (3a-C), 55.8 (7a-C), 42.2 (1-CH), 38.1 (3- $\text{CH}_2$ ), 36.0 (5- $\text{CH}_2$ ), 34.5 (7- $\text{CH}_2$ ), 33.4 (1'-CH), 27.9 (4'- $\text{CH}_2$ ), 26.5 (6- $\text{CH}_2$ ), 26.1 (5'-CH), 22.3 (2- $\text{CH}_2$ ), 22.1 (2'- $\text{CH}_2$ ), 21.3 (3'- $\text{CH}_2$ ), 21.1 ( $\text{CH}_3$ -7a), 18.6 (6'- $\text{CH}_3$ ), 17.4 ( $\text{CH}_3$ -5'), 16.9 ( $\text{CH}_3$ -1'), 0.0 (3C,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). HRMS Found 336.6389 (Calcd 336.6384). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3032, 2967, 2915, 1450, 1378, 890.  $[\alpha]_D^{20} +13$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

##### 5.6.3. [(1*R*,3*aS*,4*R*,7*aR*)-1-((*R*)-1,5-Dimethylhexyl)-7*a*-methylhexahydrocyclopropa[d]inden-4-yl-oxy]-trimethylsilane (14)

To a stirred solution of **13** (410 mg, 1.23 mmol) in anhydrous diethyl ether (20 mL) under nitrogen atmosphere was added

diethylzinc (1 M solution in hexanes, 4.20 mL, 4.20 mmol) and diiodomethane (362  $\mu$ L, 4.50 mmol). The reaction mixture was stirred under reflux for 18 h and then pyridine (1.20 mL) was added dropwise. The resulting suspension was filtered and the filtrate was diluted with water (30 mL). After separating the organic layer, the remaining aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2  $\times$  40 mL). The combined organic extracts were washed once with an aqueous hydrochloric acid (1 M, 50 mL) and once with water (50 mL), dried over sodium sulphate and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to silica column chromatography (SCC) (petroleum ether/ethyl acetate 98:2) to afford the cyclopropane derivative **14** as a colourless oil (345 mg, 80%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2.00–1.80 (m, 2H, H-5), 1.72–1.62 (m, 1H, H-6), 1.55–1.47 (m, H-1'), 1.45–1.11 (m, 10H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-5', H-6, H-7), 1.10–0.89 (m, 5H, H-2', H-3', H-4'), 0.78 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.5 Hz), 0.75 (d, 3H, H-6',  $J$  = 6.0 Hz), 0.74 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 6.0 Hz), 0.58 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a), 0.49 (d, 1H,  $\text{CH}_2$ -cyclopropane,  $J$  = 5.8 Hz), 0.22 (d, 1H,  $\text{CH}_2$ -cyclopropane,  $J$  = 5.8 Hz), 0.00 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  59.0 (4-CH), 57.9 (1-CH), 40.3 (3a-C), 38.1 (7a-C), 37.6 (5-CH<sub>2</sub>), 34.6 (3-CH<sub>2</sub>), 34.2 (6-CH<sub>2</sub>), 32.5 (1'-CH), 31.2 (7-CH<sub>2</sub>), 28.7 ( $\text{CH}_2$ -cyclopropane), 26.7 (4'-CH<sub>2</sub>), 26.6 (5'-CH), 22.3 (2-CH<sub>2</sub>), 21.3 (2'-CH<sub>2</sub>), 21.1 ( $\text{CH}_3$ -7a), 19.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 17.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 17.7 ( $\text{CH}_3$ -5'), 16.7 ( $\text{CH}_3$ -1'), 0.0 (3C,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). HRMS Found 350.6496 (Calcd 350.6538). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2960, 2910, 1457, 1370, 897, 863.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –19 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.4. [(1R,3aR,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1H-inden-4-yloxy]-trimethylsilane (15)**

To a stirred solution of ketone **12** (874 mg, 3.13 mmol) in anhydrous THF (60 mL) under nitrogen atmosphere was added dropwise lithium diisopropylamide (2 M solution in hexane, 4.20 mL, 4.41 mmol) at  $-78^\circ\text{C}$ . The reaction mixture was stirred for 2 h and then trimethylsilyl chloride (0.55 mL, 4.82 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to warm up to ambient temperature and was stirred for further 12 h. After evaporating THF under reduced pressure, the residual was taken up in diethyl ether (50 mL) and water (100 mL) was added. The biphasic mixture was extracted with diethyl ether (2  $\times$  50 mL). The combined organic layers were washed once with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (50 mL) and once with water (50 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 9:1) to afford the silyl enol ether **15** as a colourless oil (910 mg, 83%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.61 (dd, 1H, H-5,  $J$  = 2.2 Hz,  $J$  = 5.3 Hz), 2.13–1.95 (m, 2H, H-6, H-7), 1.93–1.86 (m, 1H, H-6), 1.84–1.66 (m, 2H, H-3, H-2), 1.59–1.45 (m, 2H, H-1', H-3), 1.41–1.30 (m, 4H, H-1, H-3', H-5'), 1.29–1.22 (m, 2H, H-2, H-7), 1.21–1.04 (m, 3H, H-2', H-3'), 1.04–0.97 (m, 1H, H-2'), 0.95 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.2 Hz), 0.93 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.86 (d, 3H, H-6',  $J$  = 5.8 Hz), 0.85 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 5.8 Hz), 0.75 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a), 0.12 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  155.6 (4-C), 100.5 (5-CH), 50.8 (3a-C), 45.3 (7a-C), 45.2 (1-CH), 39.1 (6-CH<sub>2</sub>), 35.8 (3-CH<sub>2</sub>), 35.0 (1'-CH), 30.5 (7-CH<sub>2</sub>), 28.7 (4'-CH<sub>2</sub>), 27.6 (5'-CH), 26.3 (2-CH<sub>2</sub>), 23.7 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.4 ( $\text{CH}_3$ -5'), 22.2 (6'-CH<sub>3</sub>), 21.1 ( $\text{CH}_3$ -3a), 20.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 18.1 ( $\text{CH}_3$ -7a), 17.6 ( $\text{CH}_3$ -1'), 0.10 (3C,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). HRMS Found 350.6514 (Calcd 350.6538). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2983, 2929, 1762, 1443, 1137, 876, 851, 711.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –27 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.5. (1R,3aR,5R,7aR)-5-Bromo-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-one (16)**

At  $0^\circ\text{C}$ , to a stirred solution of **15** (910 mg, 2.62 mmol) in THF (40 mL) was added a mixture of *N*-bromosuccinimide (580 mg, 3.16 mmol) and sodium acetate (23.0 mg, 0.26 mmol), dissolved in THF (20 mL) and water (20 mL). The reaction mixture was

allowed to warm up to room temperature and was stirred for 12 h. After evaporating THF under reduced pressure, a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (50 mL) was added. The mixture was extracted with ethyl acetate (3  $\times$  25 mL). The combined organic layers were washed with water (50 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 85:15) to afford ketone **16** as a colourless oil (850 mg, 90%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.84 (dd, 1H, H-5,  $J$  = 1.7 Hz,  $J$  = 4.7 Hz), 2.56–2.46 (m, 1H, H-6), 2.40–2.31 (m, 1H, H-7), 2.29–2.13 (m, 1H, H-3), 1.96–1.89 (m, 1H, H-2), 1.83–1.70 (m, 2H, H-1', H-3), 1.46–1.41 (m, 1H, H-5'), 1.37–1.10 (m, 9H), 1.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.94–0.89 (m, 1H, H-2'), 0.84 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.2 Hz), 0.82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a), 0.78 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 6.0 Hz), 0.76 (d, 3H, H-6',  $J$  = 6.0 Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  207.8 (CO), 59.8 (3a-C), 46.8 (5-CH), 46.5 (7a-C), 45.8 (1-CH), 37.9 (6-CH<sub>2</sub>), 34.3 (3-CH<sub>2</sub>), 33.3 (7-CH<sub>2</sub>), 30.1 (1'-CH), 28.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 26.5 (2'-CH<sub>2</sub>), 25.4 (5'-CH), 23.9 (2-CH<sub>2</sub>), 23.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 ( $\text{CH}_3$ -3a), 21.4 (6'-CH<sub>3</sub>), 21.1 ( $\text{CH}_3$ -5'), 17.2 ( $\text{CH}_3$ -7a), 16.4 ( $\text{CH}_3$ -1'). HRMS Found 356.1714 (Calcd 356.1715). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2955, 2868, 1718, 1466, 1432, 1382, 1201, 868, 667.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –26 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.6. General procedure A (nucleophilic substitution at bromoketone 16)**

To a stirred solution of bromoketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) in DMF (2 mL), the required amine (5–20 equiv) was added under nitrogen atmosphere. The solution was stirred under reflux for 12 h and then a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (20 mL) was added. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate (3  $\times$  15 mL) and the combined organic extracts were washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was subjected to SCC as specified below to afford pure compounds **17a–e** as colourless oils.

**5.6.6.1. (1R,3aR,5S,7aR)-5-Dimethylamino-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-one (17a)**

Ketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) and *N,N*-dimethylamine (2 M solution in THF, 4.20 mL, 8.41 mmol) in DMF (2 mL) were treated as described in procedure A. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 10:0.5:0.1) to afford **17a** (68 mg, 50%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.32 (dd, 1H, H-5,  $J$  = 6.1 Hz,  $J$  = 12.3 Hz), 2.55–2.43 (m, 1H, H-6), 2.38 (bs, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.08–1.92 (m, 2H, H-3, H-7), 1.92–1.67 (m, 3H, H-1', H-2, H-6), 1.53–1.43 (m, 1H, H-5'), 1.40–1.16 (m, 5H, H-1, H-2, H-3, H-3'), 1.16–1.01 (m, 4H, with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a at 1.09 ppm), 0.99–0.92 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 5.8 Hz), 0.85 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 6.0 Hz), 0.84–0.80 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a at 0.83 ppm).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  212.5 (CO), 67.6 (3a-C), 61.1 (5-CH), 49.6 (7a-C), 46.5 (1-CH), 41.6 (2C,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 35.9 (3-CH<sub>2</sub>), 35.0 (7-CH<sub>2</sub>), 30.5 (1'-CH), 29.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 25.3 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 24.1 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 ( $\text{CH}_3$ -5'), 19.9 ( $\text{CH}_3$ -3a), 18.8 ( $\text{CH}_3$ -7a), 17.7 ( $\text{CH}_3$ -1'). HRMS Found 321.3060 (Calcd 321.3032). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2987, 2870, 1709, 1466, 1103, 705.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –18 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.6.2. (1R,3aR,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-(4-methylpiperazine-1-yl)-octahydroinden-4-one (17b)**

Ketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) and 1-methylpiperazine (0.33 mL, 2.94 mmol) in DMF (2 mL) were treated as described in procedure A. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 7:3:0.3) to afford **17b** (114 mg, 72%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.31 (dd, 1H, H-5,  $J$  = 6.2 Hz,  $J$  = 12.3 Hz), 2.83–2.51 (m, 8H), 2.47–2.41 (m, 1H, H-6), 2.39 (s, 3H,  $\text{N-CH}_3$ ), 2.07–1.95 (m, 2H, H-3, H-7), 1.85–1.64 (m,

3H, H-1', H-2, H-6) 1.53–1.46 (m, 1H, H-5'), 1.39–1.16 (m, 6H), 1.15–0.97 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a) 0.95–0.89 (m, 1H, H-2'), 0.88 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.1 Hz), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 5.8 Hz), 0.83 (d, 3H, H-6', *J* = 5.8 Hz), 0.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 212.1 (CO), 67.7 (N-CH<sub>3</sub>), 65.9 (3a-C), 61.0 (2C, 3'-CH<sub>2</sub>, 5'-CH<sub>2</sub>), 55.1 (2C, 2'-CH<sub>2</sub>, 6'-CH<sub>2</sub>), 49.9 (5-CH<sub>2</sub>), 46.5 (7a-C), 45.7 (1-CH), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 35.8 (3-CH<sub>2</sub>), 35.1 (7-CH<sub>2</sub>), 29.3 (1'-CH), 28.0 (4'-CH<sub>2</sub>), 25.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 24.3 (5'-CH), 23.6 (2-CH<sub>2</sub>), 22.8 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>-5'), 17.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 15.3 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 376.3437 (Calcd 376.3454). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3302, 2955, 2794, 2360, 1712, 1635, 1456, 1383, 1286, 767. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –23 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.6.3. (1R,3aR,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-[(pyridin-3-ylmethyl)-amino]-octahydroindene-4-one (17c).** Ketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) and 3-(amino-methyl)pyridine (0.31 mL, 2.94 mmol) in DMF (2 mL) were treated as described in procedure A. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 7:3:0.1) to afford **17c** (112 mg, 68%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.54 (s, 1H, H-2''), 8.49 (d, 1H, H-6'', *J* = 3.8 Hz), 7.76 (d, 1H, H-4'', *J* = 7.8 Hz), 7.25 (dd, 1H, H-5'', *J* = 3.8 Hz, *J* = 7.8 Hz), 3.84 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.3 Hz), 3.76 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.3 Hz), 3.49–3.36 (m, 1H, H-5), 2.47–2.42 (m, 1H, H-6), 2.19–2.05 (m, 1H, H-7), 1.92 (m, 1H, H-3), 1.82–1.60 (m, 3H, H-1', H-2, H-6), 1.47 (m, 1H, H-5'), 1.38–1.04 (m, 9H), 1.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.95–0.90 (m, 1H, H-2'), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.0 Hz), 0.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a), 0.76 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 6.2 Hz), 0.74 (d, 3H, H-6', *J* = 6.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 214.2 (CO), 149.7 (6''-CH), 148.6 (2''-CH), 136.1 (4''-CH), 135.5 (3''-CH), 123.5 (5''-CH), 61.3 (1'-CH<sub>2</sub>), 60.4 (3a-C), 50.0 (5-CH), 49.3 (7a-C), 46.5 (1-CH), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 35.9 (3-CH<sub>2</sub>), 35.0 (7-CH<sub>2</sub>), 30.2 (1'-CH), 30.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 25.3 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.8 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 17.8 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 384.6111 (Calcd 384.6103). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3444, 3012, 2958, 2901, 1704, 1469, 1424, 1382, 1026, 713. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –22 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.6.4. (1R,3aR,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-(2,6-dimethylmorpholine-4-yl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-one (17d).** Ketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) and 2,6-dimethylmorpholine (0.36 mL, 2.94 mmol) in DMF (2 mL) were treated as described in procedure A. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **17d** (98 mg, 59%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 3.91–3.79 (m, 2H, H-2''), 3.32 (dd, 1H, H-5, *J* = 6.1 Hz, *J* = 12.3 Hz), 2.82–2.69 (m, 2H, H-6, H-7), 2.49–2.38 (m, 1H, H-2), 2.20–1.93 (m, 3H, H-3, H-3', H-5'), 1.85–1.67 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-6), 1.55–1.40 (m, 1H, H-1'), 1.39–1.16 (m, 5H, H-2', H-3, H-3', H-7), 1.14–1.03 (m, 10H, H-2, H-2', H-4', CH<sub>3</sub>-2', CH<sub>3</sub>-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 1.09 ppm), 0.91–0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.2 Hz), 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 6.0 Hz), 0.91–0.85 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a at 0.87 ppm). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 212.2 (CO), 71.6 (2C, 2''-CH, 6''-CH), 67.6 (3a-C), 61.1 (5-CH), 55.0 (7a-C), 49.9 (1-CH), 46.5 (6-CH<sub>2</sub>), 39.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.9 (2C, 3'-CH<sub>2</sub>, 5'-CH<sub>2</sub>), 35.1 (7-CH<sub>2</sub>), 30.5 (1'-CH), 29.2 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 25.4 (5'-CH), 24.3 (2-CH<sub>2</sub>), 23.8 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.2 (CH<sub>3</sub>-6'), 19.1 (CH<sub>3</sub>-2'), 18.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 17.7 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 391.3436 (Calcd 391.3450). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 2990, 2874, 1722, 1466, 1219, 1001, 723. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –31 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.6.5. (1R,3aR,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-(2,3-dimethylphenylamino)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-one (17e).** Ketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) and 2,3-dimethylaniline (0.68 mL, 5.58 mmol) in DMF (2 mL) were treated as described in procedure A. The crude product was subjected to SCC (petro-

leum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.3) to afford **17e** (137 mg, 82%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.00 (t, 1H, H-5'', *J* = 7.8 Hz), 6.59 (d, 1H, H-6'', *J* = 7.4 Hz), 6.42 (d, 1H, H-4'', *J* = 8.0 Hz), 4.17 (dd, 1H, H-5-H, *J* = 6.5 Hz, *J* = 12.3 Hz), 2.59–2.41 (m, 2H, H-6, H-7), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-2'), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3'), 2.04–1.78 (m, 3H, H-1', H-2, H-3), 1.73–1.56 (m, 1H, H-3), 1.57–1.43 (m, 2H, H-1, H-5'), 1.43–1.17 (m, 5H, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.16–1.07 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-3a, H-3', H-4'), 1.02–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.94–0.88 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-1', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a at 0.87 ppm), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 5.8 Hz), 0.85 (d, 3H, H-6', *J* = 5.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 212.2 (CO), 144.9 (1''-C), 137.1 (2''-C), 126.1 (6''-CH), 121.1 (3''-C), 119.5 (4''-CH), 107.9 (5''-CH), 60.4 (3a-C), 58.1 (5-CH), 50.4 (7a-C), 46.6 (1-CH), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 35.9 (3-CH<sub>2</sub>), 35.1 (1-CH), 30.4 (7-CH<sub>2</sub>), 29.8 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.3 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 25.4 (2-CH<sub>2</sub>), 24.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (CH<sub>3</sub>-3'), 22.6 (CH<sub>3</sub>-2'), 20.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>-5'), 18.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 17.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 12.6 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 397.3373 (Calcd 397.3345). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3412, 3003, 2987, 2866, 1780, 1723, 1489, 1372, 997, 789, 742. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –42 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

#### 5.6.7. General procedure B (reduction of ketones 17a–e)

To a stirred solution of the required ketone **17a–e** in anhydrous THF, lithium aluminium hydride (3–5 equiv) was added at 0 °C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then quenched with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (3 mL) and diluted with water (20 mL). The biphasic mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL) and the combined organic extracts were washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC as specified below to afford amino alcohols **18a–e** as colourless oils.

#### 5.6.7.1. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-Dimethylamino-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (18a).

Ketone **17a** (150 mg, 0.47 mmol) and lithium aluminium hydride (60.0 mg, 1.54 mmol) in anhydrous THF (2 mL) were treated as described in procedure B. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 8:2:0.3) to afford **18a** (140 mg, 92%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 3.49 (d, 1H, H-4, *J* = 1.9 Hz), 2.37–2.27 (m, 1H, H-1'), 2.25 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.03–1.76 (m, 4H, H-3, H-5, H-6, H-7), 1.65–1.38 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-5'), 1.37–1.18 (m, 5H, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.14–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.5 Hz), 0.87–0.82 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-5', H-6'), 0.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 74.9 (4-CH), 64.5 (5-CH), 48.3 (3a-C), 46.8 (1-CH), 43.8 (7a-C), 42.3 (2C, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 39.2 (6-CH<sub>2</sub>), 36.1 (3-CH<sub>2</sub>), 35.3 (1'-CH), 34.5 (7-CH<sub>2</sub>), 31.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.8 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.6 (5'-CH), 23.8 (2-CH<sub>2</sub>), 22.5 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>3</sub>-5'), 20.9 (3'-CH<sub>2</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.4 (CH<sub>3</sub>-7a), 18.6 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 323.3201 (Calcd 323.3188). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3412, 3017, 2870, 1452, 1353, 1237, 1002, 773. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +11 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

#### 5.6.7.2. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-(4-methylpiperazine-1-yl)-octahydroindene-4-ol (18b).

Ketone **17b** (140 mg, 0.37 mmol) and lithium aluminium hydride (72.0 mg, 1.86 mmol) in anhydrous THF (2 mL) were treated as described in procedure B. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 5:5:0.4) to afford **18b** (124 mg, 88%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 3.49 (d, 1H, H-4, *J* = 1.6 Hz), 2.41 (m, 8H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 2.35–2.28 (m, 1H, H-5'), 2.26 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.22–2.17 (m, 1H, H-5), 1.99–1.77 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.63–1.53 (m, 1H, H-2), 1.53–1.39 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.38–1.16 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.15–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.02–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.6 Hz), 0.86 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',



1936

M. König et al. / Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943

$J = 6.1$  Hz), 0.84 (d, 3H, H-6',  $J = 6.1$  Hz), 0.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  74.6 (4-CH), 62.9 (5-CH), 55.6 (2C, 3''-CH<sub>2</sub>, 5''-CH<sub>2</sub>), 49.3 (2C, 2''-CH<sub>2</sub>, 6''-CH<sub>2</sub>), 48.4 (3a-C), 47.1 (1-CH), 45.8 (NCH<sub>3</sub>), 44.2 (7a-C), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 36.3 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.8 (2'-CH<sub>2</sub>), 31.4 (5-CH<sub>2</sub>), 29.1 (7-CH<sub>2</sub>), 27.8 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 22.7 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.1 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.6 (2C, CH<sub>3</sub>-7a, 3'-CH<sub>2</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 378.3596 (Calcd 378.3610). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3398, 3001, 2987, 2856, 1501, 1372, 997.  $[\alpha]_D^{20} +17$  (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.7.3. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-[(pyridine-3-ylmethyl)-amino]-octahydroinden-4-ol (18c).**

Ketone **17c** (132 mg, 0.34 mmol) and lithium aluminium hydride (39.0 mg, 1.02 mmol) in anhydrous THF (2 mL) were treated as described in procedure B. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 8:2:0.3) to afford **18c** (125 mg, 96%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.54 (s, 1H, H-2''), 8.51 (d, 1H, H-6'',  $J = 3.3$  Hz), 7.66 (d, 1H, H-4'',  $J = 7.8$  Hz), 7.30–7.23 (m, 1H, H-5''), 3.83 (d, 1H, H-1'',  $J = 13.3$  Hz), 3.74 (d, 1H, H-1'',  $J = 13.3$  Hz), 3.46 (d, 1H, 4-4,  $J = 2.6$  Hz), 2.80–2.65 (m, 1H, H-5), 2.39–2.28 (m, 1H, H-1'), 2.01–1.90 (m, 1H, H-6), 1.88–1.78 (m, 2H, H-3, H-7), 1.78–1.65 (m, 1H, H-2), 1.58–1.43 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.36–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.17–1.08 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.05–0.97 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.86 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J = 6.2$  Hz), 0.86–0.83 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.84 ppm), 0.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  149.5 (2''-CH), 148.6 (6''-CH), 135.8 (4''-CH), 135.4 (3''-C), 123.4 (5''-CH), 75.7 (4-CH), 56.8 (5-CH), 48.5 (1''-CH<sub>2</sub>), 47.9 (1-CH), 47.2 (3a-C), 44.9 (7a-C), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.5 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 23.0 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.2 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 386.3289 (Calcd 386.3297). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3411, 3007, 2963, 2887, 1499, 1713, 1312, 997, 739, 699.  $[\alpha]_D^{20} +37$  (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.7.4. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-(2,6-dimethylmorpholine-4-yl)-3a,7a-di-methyl-octahydroinden-4-ol (epimeric mixture) (18d).**

Ketone **17d** (140 mg, 0.36 mmol) and lithium aluminium hydride (42.0 mg, 1.08 mmol) in anhydrous THF (2 mL) were treated as described in procedure B. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 7:3:0.3) to afford **18d** (138 mg, 98%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  3.71–3.45 (m, 3H, H-2'', H-4, H-6''), 2.93 (dd, 1.4H, H-3'', H-5'',  $J = 6.7$  Hz,  $J = 11.4$  Hz), 2.85 (dd, 1.4H, H-3'', H-5'',  $J = 6.3$  Hz,  $J = 11.1$  Hz), 2.60 (dd, 0.6H, H-3'', H-5'',  $J = 6.6$  Hz,  $J = 11.4$  Hz), 2.44 (dd, 0.6H, H-3'', H-5'',  $J = 6.2$  Hz,  $J = 11.5$  Hz), 2.39–2.25 (m, 1H, H-1'), 2.18–2.10 (m, 0.7H, H-5), 2.04–1.75 (m, 4.3H, H-3, H-5, H-6, H-7), 1.64–1.11 (m, 17H), 1.05–0.94 (m, 1H, H-2') 0.92 (d, 0.9H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 5.9$  Hz), 0.91 (d, 2.1H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 5.9$  Hz), 0.87–0.81 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-3a, CH<sub>3</sub>-5', H-6'), 0.73 (s, 0.9H, CH<sub>3</sub>-7a), 0.71 (s, 2.1H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  74.6 (4-CH), 72.4 (2''-CH), 72.4 (6''-CH), 72.3 (2''-CH), 72.0 (6''-CH), 69.0 (4-CH), 65.3 (5-CH), 63.1 (5-CH), 58.3 (3a-C), 56.4 (3a-C), 55.2 (1-CH), 50.8 (1-CH), 50.7 (7a-C), 48.5 (7a-C), 47.3 (6-CH<sub>2</sub>), 46.7 (6-CH<sub>2</sub>), 46.2 (3-CH<sub>2</sub>), 44.4 (3-CH<sub>2</sub>), 39.6 (2'-CH<sub>2</sub>), 39.5 (2'-CH<sub>2</sub>), 36.5 (2C, 3''-CH<sub>2</sub>, 5''-CH<sub>2</sub>), 36.3 (2C, 3''-CH<sub>2</sub>, 5''-CH<sub>2</sub>), 36.1 (1'-CH), 35.8 (1'-CH), 34.9 (4'-CH<sub>2</sub>), 33.2 (4'-CH<sub>2</sub>), 31.5 (7-CH<sub>2</sub>), 31.3 (7-CH<sub>2</sub>), 29.3 (5'-CH), 28.0 (5'-CH), 27.9 (2-CH<sub>2</sub>), 26.9 (2-CH<sub>2</sub>), 24.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 22.8 (CH<sub>3</sub>-3a), 22.6 (2C, CH<sub>3</sub>-2'', CH<sub>3</sub>-6''), 21.2 (2C, CH<sub>3</sub>-2'', CH<sub>3</sub>-6''), 19.7 (6'-CH<sub>3</sub>), 19.3 (6'-CH<sub>3</sub>), 19.2 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-5'), 18.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 18.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 18.5 (CH<sub>3</sub>-1'), 17.4 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 393.3603 (Calcd 393.3606). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3423, 3392, 3032, 2987, 2897, 1541, 1372, 1132, 997.

**5.6.7.5. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-(2,3-dimethylphenylamino)-3a,7a-dimethyl-octahydroinden-4-ol (epimeric mixture) (18e).**

Ketone **17e** (170 mg, 0.42 mmol) and lithium aluminium hydride (52.0 mg, 1.28 mmol) in anhydrous THF (2 mL) were treated as described in procedure B. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.3) to afford **18e** (163 mg, 97%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.05–6.97 (m, 1H, H-5''), 6.67 (d, 0.85H, H-6'',  $J = 8.2$  Hz), 6.64 (d, 0.85H, H-4'',  $J = 7.5$  Hz), 6.58 (d, 0.15H, H-4'',  $J = 7.5$  Hz), 6.51 (d, 0.15H, H-6'',  $J = 8.2$  Hz), 3.60 (d, 0.15H, H-4,  $J = 10.3$  Hz), 3.54–3.45 (m, 1H, H-4, H-5), 3.29 (ddd, 0.85H, H-5,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 10.6$  Hz), 2.28 (s, 2.55H, CH<sub>3</sub>-2''), 2.27 (s, 0.45H, CH<sub>3</sub>-2''), 2.08 (s, 2.55H, CH<sub>3</sub>-3''), 2.06 (s, 0.45H, CH<sub>3</sub>-3''), 2.03–1.89 (m, 4H, H-1', H-6, H-7), 1.87–1.72 (m, 2H, H-3, H-2), 1.61–1.47 (m, 1H, H-5), 1.45–1.27 (m, 7H), 1.23–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.07–1.00 (m, 1H, H-2'), 0.99 (s, 0.45H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.97 (s, 2.55H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.96–0.90 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-1'), 0.89–0.81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>-5', H-6'), 0.80 (s, 2.55H, CH<sub>3</sub>-7a), 0.77 (s, 0.45H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  145.7 (1''-C), 145.0 (1''-C), 137.0 (2''-C), 136.9 (2''-C), 126.2 (6''-CH), 126.1 (6''-CH), 121.9 (3''-C), 120.9 (3''-C), 120.4 (4''-CH), 119.5 (4''-CH), 110.3 (5''-CH), 108.9 (5''-CH), 77.3 (4-CH), 75.3 (4-CH), 56.4 (5-CH), 53.1 (5-CH), 51.3 (3a-C), 49.6 (3a-C), 47.6 (1-CH), 47.0 (1-CH), 46.4 (7a-C), 45.1 (7a-C), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (1'-CH), 35.8 (1'-CH), 35.0 (7-CH<sub>2</sub>), 32.8 (7-CH<sub>2</sub>), 32.0 (4'-CH<sub>2</sub>), 31.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.1 (5'-CH), 28.0 (5'-CH), 27.9 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.5 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.8 (2-CH<sub>2</sub>), 26.7 (2-CH<sub>2</sub>), 24.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (CH<sub>3</sub>-2''), 22.8 (CH<sub>3</sub>-2''), 22.6 (CH<sub>3</sub>-3''), 21.5 (CH<sub>3</sub>-3''), 20.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.6 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (6'-CH<sub>3</sub>), 19.1 (6'-CH<sub>3</sub>), 18.9 (CH<sub>3</sub>-5'), 18.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 15.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 12.9 (1'-CH<sub>3</sub>), 12.7 (1'-CH<sub>3</sub>). HRMS Found 399.3483 (Calcd 393.3501). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3412, 3307, 3010, 2962, 1723, 1412, 1272, 983, 791, 733.

**5.6.8. (1R,3aR,4S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (19)**

To a stirred solution of the ketone **12** (500 mg, 1.82 mmol) in anhydrous THF (30 mL), lithium aluminium hydride (215 mg, 5.40 mmol) was added at 0 °C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h, then quenched by dropwise addition of a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (15 mL) and diluted with water (30 mL). The biphasic mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 50 mL) and the combined organic extracts were washed with water (100 mL), dried over sodium sulphate and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 9:1) to afford alcohol **19** (505 mg, 99%) as a white solid. Mp 151 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  3.51 (dd, 1H, H-4,  $J = 3.3$  Hz,  $J = 5.4$  Hz), 2.11–1.99 (m, 1H, H-5), 1.89–1.78 (m, 1H, H-6), 1.74–1.60 (m, 4H, H-2, H-3, H-5, H-7), 1.59–1.53 (m, 1H, H-1'), 1.51–1.45 (m, 1H, H-5'), 1.45–1.31 (m, 6H, H-1, H-2, H-3, H-3', H-6, H-7), 1.24–1.05 (m, 4H, H-2', H-3', H-4'), 1.04–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.92 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.86 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J = 6.2$  Hz), 0.85 (d, 3H, H-6',  $J = 6.2$  Hz), 0.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  77.1 (4-CH), 50.1 (3a-C), 49.0 (5-CH<sub>2</sub>), 45.6 (7a-C), 39.6 (1-CH), 36.1 (3-CH<sub>2</sub>), 35.5 (1'-CH), 35.3 (6-CH<sub>2</sub>), 33.0 (7-CH<sub>2</sub>), 30.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.3 (2-CH<sub>2</sub>), 22.9 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.6 (6'-CH<sub>3</sub>), 21.9 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.6 (CH<sub>3</sub>-7a), 17.3 (CH<sub>3</sub>-1'). Anal. Calcd: C, 81.36; H, 12.92. Found: C, 81.13; H, 12.93. IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3448, 2954, 2870, 1467, 1304, 735.  $[\alpha]_D^{20} +9$  (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.9. (1R,3R,3aR,7aS)-3-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1H-indene (20)**

To a stirred solution of **19** (500 mg, 1.79 mmol) in anhydrous pyridine (4 mL), phosphorous oxychloride (0.50 mL, 5.40 mmol)

was added dropwise in a careful manner. The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min. After cooling down to  $-10^{\circ}\text{C}$  the excess of phosphorous oxychloride was quenched slowly by dropwise addition of a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (10 mL). The mixture was diluted with water (30 mL) and extracted with ethyl acetate ( $3 \times 30$  mL). The combined organic extracts were washed with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (50 mL), water (50 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 95:5) to afford **20** (369 mg, 78%) as a colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.43 (d, 1H, H-4,  $J = 3.7$  Hz), 5.27 (ddd, 1H, H-5,  $J = 3.6$  Hz,  $J = 6.4$  Hz,  $J = 7.2$  Hz), 2.07–1.98 (m, 1H, H-6), 1.95–1.90 (m, 1H, H-6), 1.89–1.82 (m, 1H, H-7), 1.78–1.70 (m, 2H, H-1', H-3), 1.59–1.47 (m, 2H, H-5', H-7), 1.29–1.23 (m, 4H, H-1, H-2, H-3), 1.18–1.10 (m, 5H, H-2', H-3', H-4'), 1.03–0.98 (m, 1H, H-2'), 0.95 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.2$  Hz), 0.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.86 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J = 6.5$  Hz), 0.85 (d, 3H, H-6',  $J = 6.5$  Hz), 0.75 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  138.0 (4-CH), 121.6 (5-CH), 45.6 (3a-C), 44.5 (6-CH<sub>2</sub>), 42.5 (7a-C), 40.8 (1-CH), 38.1 (7-CH<sub>2</sub>), 34.8 (3-CH<sub>2</sub>), 34.1 (1'-CH), 27.8 (4'-CH<sub>2</sub>), 26.6 (2'-CH<sub>2</sub>), 25.1 (5'-CH), 22.8 (2-CH<sub>2</sub>), 22.1 (3'-CH<sub>2</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>-3a), 21.1 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.0 (6'-CH<sub>3</sub>), 17.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 16.6 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 262.4815 (Calcd 262.4830). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2980, 2873, 1465, 1381, 851, 720.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -46$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.10. (1aR,3aR,4R,6aR,6bS)-3a,6a-Dimethyl-4-((R)-1,5-dimethylhexyl)-octahydro-1aH-indeno[5,4-b]-oxirene (21)**

Sodium bicarbonate (82.0 mg, 0.98 mmol) and 3-chloroperbenzoic acid (300 mg, 0.84 mmol) were suspended in dichloromethane (5 mL) at  $5^{\circ}\text{C}$ , and a solution of **20** (200 mg, 0.76 mmol) in dichloromethane (2 mL) was added to the suspension under nitrogen atmosphere. The resulting mixture was allowed to warm up to ambient temperature and was stirred for 2 h. The excess of 3-chloroperbenzoic acid was quenched with an aqueous 5% solution of sodium thiosulphate (4 mL). The reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate ( $3 \times 25$  mL). The combined organic extracts were washed with water (50 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 97:3) to afford **21** (198 mg, 93%) as a colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.22–3.18 (m, 1H, H-5), 2.70 (d, 1H, H-4,  $J = 3.8$  Hz), 1.90–1.82 (m, 2H, H-6, H-7), 1.81–1.72 (m, 1H, H-3), 1.70–1.61 (m, 2H, H-1', H-3), 1.59–1.44 (m, 2H, H-6, H-2), 1.41–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-7), 1.18–1.04 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.02–0.97 (m, 1H, H-2'), 0.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.93 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.7$  Hz), 0.86 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J = 5.8$  Hz), 0.85 (d, 3H, H-6',  $J = 5.8$  Hz), 0.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  62.6 (4-CH), 54.3 (5-CH), 46.7 (1-CH), 43.7 (3a-C), 43.2 (7a-C), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 35.9 (7-CH<sub>2</sub>), 34.1 (1'-CH), 28.0 (5'-CH), 26.2 (4'-CH<sub>2</sub>), 25.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 24.5 (2-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 19.6 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 18.0 (CH<sub>3</sub>-1'). Anal. Calcd: C, 81.95; H, 12.31. Found: C, 81.99; H, 12.34. IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2943, 2870, 2830, 1412, 1381, 851, 723.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +31$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.11. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-5-Azido-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (22)**

In a sealable microwave tube, epoxide **21** (100 mg, 0.36 mmol) was dissolved in a mixture of DMF (2 mL) and water (0.5 mL). Sodium azide (233 mg, 3.64 mmol) was added and the tube was closed under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under microwave irradiation (150 W, 4 psi) at  $130^{\circ}\text{C}$  for 2 h. After cooling a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (20 mL) was added and the resulting mixture was extracted with ethyl acetate ( $3 \times 20$  mL). The combined organic extracts were

washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 9:1) to afford **22** (86 mg, 81%) as a white resin.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.40 (d, 1H, H-4,  $J = 10.4$  Hz), 3.33 (ddd, 1H, H-5,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 10.9$  Hz), 1.92–1.78 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.71–1.59 (m, 1H, H-3), 1.56–1.47 (m, 1H, H-5'), 1.44–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-3', H-6, H-7), 1.16–1.07 (m, 3H, H-2', H-4'), 1.03–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.6$  Hz), 0.89–0.84 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ -5', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a at 0.86 ppm), 0.85 (d, 3H, H-6',  $J = 6.4$  Hz), 0.76 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  74.7 (4-CH), 64.3 (5-CH), 51.6 (3a-Ca), 46.9 (7a-C), 46.2 (1-CH), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (1-CH), 32.7 (7-CH<sub>2</sub>), 30.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.1 (5'-CH), 26.6 (2'-CH<sub>2</sub>), 25.5 (2-CH<sub>2</sub>), 24.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 18.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.5 (CH<sub>3</sub>-7a), 13.8 (CH<sub>3</sub>-1'). Anal. Calcd: C, 70.98; H, 10.97; N, 13.07. Found: C, 71.33; H, 11.06; N, 13.05. IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3473, 2985, 2872, 2100, 1468, 1382, 1023, 735.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -17$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.12. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-5-Amino-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (23)**

To a stirred solution of azide **22** (100 mg, 0.31 mmol) in anhydrous THF (5 mL), lithium aluminium hydride (40.0 mg, 1.04 mmol) was added at  $0^{\circ}\text{C}$  under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at  $0^{\circ}\text{C}$  for 30 min, then quenched with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (3 mL) and diluted with water (20 mL). The biphasic mixture was extracted with ethyl acetate ( $3 \times 20$  mL) and the combined organic extracts were washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (dichloromethane/methanol/triethylamine 9:1:0.2) to afford amino alcohol **23** (91 mg, 99%) as a white resin. Mp  $104^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.26 (d, 1H, H-4,  $J = 10.3$  Hz), 2.72–2.58 (m, 2H, H-1', H-5), 2.52 (bs, 3H,  $\text{NH}_2$ , OH), 1.99–1.83 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.79–1.73 (m, 1H, H-2), 1.70–1.62 (m, 1H, H-3), 1.52–1.42 (m, 2H, H-5', H-6), 1.38–1.27 (m, 5H, H-1, H-2', H-2, H-3', H-7), 1.18–1.05 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.00–0.93 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1'), 0.86 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -5'), 0.85–0.79 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a at 0.82 ppm), 0.75 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  76.5 (4-CH), 52.7 (5-CH), 51.1 (3a-C), 47.2 (1-CH), 46.3 (7a-C), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (7-CH<sub>2</sub>), 32.8 (1'-CH), 31.0 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.9 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.1 (5'-CH), 26.7 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.1 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 295.2860 (Calcd 295.2875). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3473, 2985, 2872, 2100, 1468, 1382, 1023, 735.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -10$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.13. (1R,3aR,5S,7aR)-5-Azido-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-one (24)**

To a stirred solution of bromoketone **16** (150 mg, 0.42 mmol) in DMF (3 mL), sodium azide (33 mg, 0.50 mmol) was added under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at  $0^{\circ}\text{C}$  for 2 h. Then a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (20 mL) was added. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate ( $3 \times 15$  mL) and the combined organic extracts were washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate 98:2) to afford **24** (117 mg, 87%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.11 (dd, 1H, H-5,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 12.4$  Hz), 2.56–2.48 (m, 1H, H-6), 2.12–2.05 (m, 1H, H-7), 2.03–1.96 (m, 1H, H-3), 1.92–1.73 (m, 3H, H-1', H-2, H-3), 1.53–1.42 (m, 1H, H-5'), 1.41–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.13–1.05 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ -3a, H-3', H-4'), 1.00–0.92 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.2$  Hz), 0.89–0.84 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ -5', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a at 0.88 ppm), 0.84 (d, 3H, H-6',

1938

M. König et al. / Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943

$J = 6.2$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  209.2 (CO), 63.1 (5-CH), 60.9 (3a-C), 49.7 (7a-C), 46.6 (1-CH), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 35.8 (3-CH<sub>2</sub>), 35.0 (1'-CH), 29.6 (7-CH<sub>2</sub>), 29.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (2C, 2'-CH<sub>2</sub>, 5'-CH), 25.3 (2-CH<sub>2</sub>), 24.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.5 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 17.7 (CH<sub>3</sub>-1'). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 2870, 2103, 1717, 1467, 1266, 952.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -13$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.14. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-Amino-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (25)**

To a stirred solution of the azidoketone **24** (100 mg, 0.31 mmol) in anhydrous THF, lithium aluminium hydride (40 mg, 1.04 mmol) was added at 0 °C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then quenched with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (3 mL) and diluted with water (20 mL). The biphasic mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL) and the combined organic extracts were washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC (dichloromethane/methanol/triethylamine 9:1:0.2) to afford amino alcohol **25** (91 mg, 99%) as a white resin. Mp 117 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3.21 (d, 1H, H-4,  $J = 2.7$  Hz), 2.90 (ddd, 1H, H-5,  $J = 2.7$  Hz,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 12.1$  Hz), 2.49 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.27–2.18 (m, 1H, H-1'), 1.90–1.81 (m, 1H, H-6), 1.80–1.69 (m, 2H, H-3, H-7), 1.68–1.56 (m, 1H, H-2), 1.49–1.34 (m, 2H, H-5', H-6), 1.32–1.17 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-7), 1.11–0.98 (m, 3H, H-3', H-4'), 0.97–0.89 (m, 1H, H-2'), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.80 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J = 6.4$  Hz), 0.79–0.71 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.75 ppm), 0.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  79.3 (4-CH), 50.4 (5-CH), 49.2 (3a-C), 47.3 (1-CH), 44.7 (7a-C), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.7 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.6 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.7 (2-CH<sub>2</sub>), 24.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.5 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.2 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 295.2875 (Calcd 295.2875). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3473, 2985, 2872, 2100, 1468, 1382, 1023, 735.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +13$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15. General procedure C (reductive alkylation of amino alcohols)**

To a stirred solution of the respective amino alcohol **23** or **25** (0.30–0.40 mmol) and the required aldehyde (1.05–2.00 equiv) in methanol, acetic acid (1.10 equiv) and sodium cyanoborohydride (3 equiv) were added at room temperature under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 12 h, then quenched with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (3 mL) and diluted with water (10 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 15 mL) and the combined organic extracts were washed with water (30 mL), dried over sodium sulphate, and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was subjected to SCC as specified below to afford compounds **26a–g**, **27a–g**, **28a–c**, **29a–c** and **30**.

**5.6.15.1. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-5-Benzylamino-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (26a)**

Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and benzaldehyde (39.0  $\mu\text{L}$ , 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **26a** (76 mg, 58%) as a white solid. Mp 145 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.34–7.29 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7.24 (dd, 1H, H-4'',  $J = 2.9$  Hz,  $J = 5.9$  Hz), 3.94 (d, 1H, H-1'',  $J = 12.8$  Hz), 3.67 (d, 1H, H-1'',  $J = 12.8$  Hz), 3.30 (d, 1H, H-4,  $J = 10.4$  Hz), 2.48–2.42 (m, 1H, H-5), 2.07–1.73 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.55–1.46 (m, 1H, H-5'), 1.40–1.27 (m, 7H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-6, H-7), 1.16–1.06 (m, 3H, H-3', H-4), 1.02–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.92 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.86 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J = 6.4$  Hz), 0.88–0.81 (m, 3H, 6'-C, with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at

0.84 ppm), 0.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  140.6 (1''-C), 128.5 (2C, 2''-CH, 6''-CH), 128.2 (2C, 3''-CH, 5''-CH), 127.1 (4''-CH), 74.9 (4-CH), 58.8 (5-CH), 51.0 (3a-C), 50.9 (7a-C), 46.9 (1''-CH<sub>2</sub>), 46.3 (1-CH), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (7-CH<sub>2</sub>), 33.0 (1'-CH), 31.1 (4-CH<sub>2</sub>), 28.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.8 (5'-CH), 26.3 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.07 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 385.3380 (Calcd 385.3345). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3465, 3056, 2970, 2875, 1468, 1382, 1023, 750, 689.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -13$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.2. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-[(5-iodofuran-2-ylmethyl)-amino]-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (26b)**

Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and 5-iodo-2-furaldehyde (80.0 mg, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 8:2:0.2) to afford **26b** (146 mg, 86%) as a white solid. Mp 162 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.45 (d, 1H, H-4'',  $J = 3.2$  Hz), 6.11 (d, 1H, H-3'',  $J = 3.2$  Hz), 3.91 (d, 1H, H-1'',  $J = 14.4$  Hz), 3.72 (d, 1H, H-1'',  $J = 14.4$  Hz), 3.29 (d, 1H, H-4,  $J = 10.3$  Hz), 2.41 (ddd, 1H, H-5,  $J = 3.7$  Hz,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 10.8$  Hz), 1.97–1.72 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.61–1.45 (m, 1H, H-5'), 1.42–1.24 (m, 7H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-6, H-7), 1.17–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.02–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 5.8$  Hz), 0.86–0.83 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.83 ppm), 0.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  160.1 (5''-C), 120.9 (4''-CH), 109.8 (3''-CH), 86.2 (2''-C), 75.0 (4-CH), 58.7 (5-CH), 51.0 (3a-C), 46.9 (1-CH), 46.2 (7a-C), 43.9 (1''-CH<sub>2</sub>), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (1'-CH), 32.9 (7-CH<sub>2</sub>), 31.0 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.1 (5'-CH), 26.8 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.3 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 23.0 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.1 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 501.2151 (Calcd 501.2104). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3412, 3012, 2973, 1478, 1313, 1201, 1058, 839, 793.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -29$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.3. (1R,4S,5S,7aR)-5-(3-Chlorobenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-7a-methyloctahydroindene-4-ol (26c)**

Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and 3-chlorobenzaldehyde (50  $\mu\text{L}$ , 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **26c** (113 mg, 79%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.33 (s, 1H, H-2''), 7.25–7.18 (m, 3H, H-4'', H-5'', H-6''), 3.92 (d, 1H, H-1'',  $J = 13.1$  Hz), 3.65 (d, 1H, H-1'',  $J = 13.1$  Hz), 3.31 (d, 1H, H-4,  $J = 10.3$  Hz), 2.99 (s, 1H, NH), 2.44 (ddd, 1H, H-5,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 10.3$  Hz), 2.02–1.73 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.60–1.44 (m, 1H, H-5'), 1.44–1.24 (m, 7H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-6, H-7), 1.19–1.04 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.01–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.92 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J = 6.6$  Hz), 0.87–0.82 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.83 ppm), 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  142.8 (1''-C), 134.4 (3''-C), 128.3 (2''-CH), 129.8, 127.3, 126.3 (3C, 4''-CH, 5''-CH, 6''-CH), 74.9 (4-CH), 58.9 (5-CH), 50.9 (1'-CH<sub>2</sub>), 50.6 (3a-C), 46.9 (7a-C), 46.3 (1-CH), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (1'-CH), 33.0 (7-CH<sub>2</sub>), 31.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.1 (5'-CH), 26.8 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.4 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 23.0 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.1 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 419.2947 (Calcd 419.2955). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3493, 3011, 2996, 2891, 1499, 1312, 1031, 852, 778.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -11$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.4. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-[(furan-3-ylmethyl)-amino]-3a,7a-dimethyl-octahydroindene-4-ol (26d)**

Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and furan-3-carboxaldehyde (29  $\mu\text{L}$ , 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to

afford **26d** (86 mg, 67%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.36 (d, 2H, H-4'', H-5'',  $J$  = 8.7 Hz), 6.39 (s, 1H, H-2''), 3.82 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.3 Hz), 3.54 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.3 Hz), 3.30 (d, 1H, H-4,  $J$  = 10.4 Hz), 2.43 (ddd, 1H, H-5,  $J$  = 4.3 Hz,  $J$  = 7.2 Hz,  $J$  = 10.5 Hz), 2.04–1.77 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.61–1.46 (m, 1H, H-5'), 1.40–1.26 (m, 7H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-6, H-7), 1.11 (s, 3H, H-3', H-4'), 1.03–0.94 (m, 1H, H-2'), 0.92 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.2 Hz), 0.87 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 6.2 Hz), 0.86–0.81 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a at 0.83 ppm), 0.76 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  143.2 (2''-CH), 139.7 (5''-CH), 124.1 (3''-C), 110.4 (4''-CH), 74.7 (4-CH), 58.5 (5-CH), 50.8 (1''-CH<sub>2</sub>), 46.8 (3a-C), 46.2 (7a-C), 41.4 (1-CH), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.9 (7-CH<sub>2</sub>), 32.9 (1'-CH), 31.0 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.7 (5'-CH), 26.0 (2-CH<sub>2</sub>), 24.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 18.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.6 (CH<sub>3</sub>-7a), 13.9 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 375.3125 (Calcd 375.3137). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3501, 3066, 2981, 2870, 1472, 1378, 750, 689.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –18 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.5. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-(pent-4-enylamino)-octahydro-inden-4-ol (26e).** Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and pent-4-enal (36.0  $\mu\text{L}$ , 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **26e** (69 mg, 56%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.80 (ddt, 1H, H-4'',  $J$  = 6.7 Hz,  $J$  = 10.1 Hz,  $J$  = 16.9 Hz), 5.01 (dd, 1H, H-5'',  $J$  = 1.8 Hz,  $J$  = 17.1 Hz), 4.95 (dd, 1H, H-5'',  $J$  = 1.8 Hz,  $J$  = 17.1 Hz), 3.23 (d, 1H, H-4,  $J$  = 10.4 Hz), 2.79 (dt, 1H, H-1'',  $J$  = 7.1 Hz,  $J$  = 9.3 Hz), 2.44 (dt, 1H, H-1'',  $J$  = 7.1 Hz,  $J$  = 9.3 Hz), 2.32 (ddd, 1H, H-5,  $J$  = 4.5 Hz,  $J$  = 7.4 Hz,  $J$  = 10.7 Hz), 2.13–2.04 (m, 2H, H-3''), 1.98–1.73 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.62–1.44 (m, 3H, H-2'', H-5'), 1.37–1.21 (m, 7H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-6, H-7), 1.16–1.04 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.02–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 5.4 Hz), 0.86 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 6.0 Hz), 0.85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.84 (d, 3H, H-6',  $J$  = 6.0 Hz), 0.74 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  138.5 (4''-CH), 114.7 (5''-CH<sub>2</sub>), 74.7 (4-CH), 59.1 (5-CH), 50.7 (3a-C), 46.8 (7a-C), 46.2 (2C, 1-CH, 1'-CH<sub>2</sub>), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.9 (7-CH<sub>2</sub>), 32.9 (3''-CH<sub>2</sub>), 31.6 (1'-CH<sub>2</sub>), 31.1 (2''-CH<sub>2</sub>), 29.8 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.7 (5'-CH), 26.2 (2-CH<sub>2</sub>), 24.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 18.9 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 363.3493 (Calcd 363.3501). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3448, 3038, 2980, 2870, 1452, 1353, 841, 750, 689.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –9 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.6. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-5-(2,4-Dichlorobenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (26f).** Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and 2,4-dichlorobenzaldehyde (62.0 mg, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **26f** (112 mg, 73%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.37 (s, 1H, H-3''), 7.27 (d, 1H, H-6'',  $J$  = 8.2 Hz), 7.20 (d, 1H, H-5'',  $J$  = 8.2 Hz), 3.83 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.8 Hz), 3.77 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.8 Hz), 3.46 (d, 1H, H-4,  $J$  = 10.6 Hz), 2.80–2.52 (m, 1H, H-5), 2.30–2.21 (m, 1H, H-1'), 2.00–1.76 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.77–1.60 (m, 1H, H-2), 1.57–1.40 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.37–1.19 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.17–1.03 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.02–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.6 Hz), 0.85 (d,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.4 Hz, 3H), 0.84 (d, 3H, H-6',  $J$  = 6.4 Hz), 0.83 (s,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.71 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  136.1 (1''-C), 134.5 (2''-C), 133.6 (4''-C), 131.1 (6''-CH), 129.5 (3''-CH), 127.2 (5''-CH), 75.6 (4-CH), 56.4 (5-CH), 48.5 (3a-C), 47.4 (1''-CH<sub>2</sub>), 47.2 (1-CH), 45.0 (7a-C), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 23.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.3 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (CH<sub>3</sub>-7a),

19.1 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 453.2591 (Calcd 453.2565). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 3009, 2991, 2792, 1488, 1291, 1093, 1002, 856, 801.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –26 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.7. (1R,3aR,4S,5S,7aR)-5-(2,3-Dichlorobenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (26g).** Amino alcohol **23** (100 mg, 0.34 mmol) and 2,3-dichlorobenzaldehyde (62 mg, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **26g** (132 mg, 85%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.36 (d, 1H, H-4'',  $J$  = 8.0 Hz), 7.32 (d, 1H, H-6'',  $J$  = 7.7 Hz), 7.17 (t, 1H, H-5'',  $J$  = 7.8 Hz), 4.04 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.8 Hz), 3.79 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.8 Hz), 3.30 (d, 1H, H-4,  $J$  = 10.3 Hz), 2.99–2.91 (m, 1H, H-5), 2.47–2.39 (m, 1H, NH), 2.02–1.74 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.58–1.43 (m, 1H, H-5'), 1.43–1.23 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.16–1.07 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.00–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.6 Hz), 0.86 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 6.2 Hz), 0.86–0.83 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a at 0.83 ppm), 0.75 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  140.6 (1''-C), 133.3 (2''-C), 132.0 (3''-C), 129.2 (5''-CH), 128.0 (4''-CH), 127.4 (6''-CH), 75.0 (4-CH), 59.1 (5-CH), 50.9 (3a-C), 49.5 (1''-CH<sub>2</sub>), 46.9 (7a-C), 46.4 (1-CH), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (1'-CH), 33.0 (7-CH<sub>2</sub>), 31.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.1 (5'-CH), 26.8 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.5 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 23.0 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.1 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 453.2583 (Calcd 453.2565). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3442, 3032, 2995, 2912, 1500, 1311, 1023, 792.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –29 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.8. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-Benzylamino-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (27a).** Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and benzaldehyde (21  $\mu\text{L}$ , 0.36 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **27a** (111 mg, 85%) as a white solid. Mp 148 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.46–7.13 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 3.81 (d, 1H, 1''-H,  $J$  = 12.9 Hz), 3.67 (d,  $J$  = 12.9 Hz, 1H, 1''-H), 3.46 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, H-4), 2.82–2.62 (m, 1H, H-5), 2.39–2.31 (m, 1H, H-1'), 2.02–1.77 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.76–1.61 (m, 1H, H-2), 1.56–1.40 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.37–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.17–1.07 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.05–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J$  = 6.5 Hz), 0.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.83 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J$  = 5.8 Hz), 0.82 (d, 3H, H-6',  $J$  = 5.8 Hz), 0.72 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  140.3 (1''-C), 128.5 (2''-CH, 6''-CH), 128.2 (3''-CH, 5''-CH), 127.1 (4''-CH), 75.6 (4-CH), 56.7 (5-CH), 50.6 (1''-CH<sub>2</sub>), 48.4 (3a-C), 47.2 (1-CH), 45.0 (7a-C), 39.6 (7-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.9 (7-CH<sub>2</sub>), 31.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 23.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.3 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.10 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 385.3333 (Calcd 385.3345). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3467, 3026, 2997, 2853, 1452, 1298, 1023, 750, 689.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  +28 (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.9. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-([5-iodofuran-2-ylmethyl]-amino)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (27b).** Amino alcohol **25** (90 mg, 0.31 mmol) and 5-iodo-2-furaldehyde (74 mg, 0.34 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **27b** (115 mg, 75%) as a light yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.44 (d, 1H, H-4'',  $J$  = 3.1 Hz), 6.08 (d, 1H, H-3'',  $J$  = 3.1 Hz), 3.78 (d,  $J$  = 14.8 Hz, 1H, H-1''), 3.71 (d,  $J$  = 14.8 Hz, 1H, H-1''), 3.38 (d, 1H, H-4,  $J$  = 2.2 Hz), 2.69–2.62 (m, 1H, H-5), 2.35–2.27 (m, 1H, H-1'), 2.00–1.88 (m, 1H, H-6), 1.87–1.74 (m, 2H, H-3, H-7), 1.72–1.46 (m, 3H, H-2, H-3, H-5'), 1.37–1.21 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.18–1.05 (m, 3H, H-3', H-4'),

1.04–0.95 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.5 Hz), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 6.0 Hz), 0.84 (d, 3H, H-6', *J* = 6.0 Hz), 0.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 159.3 (5''-C), 120.7 (4''-CH), 110.1 (3''-CH), 86.3 (2''-C), 75.4 (4-CH), 55.6 (5-CH), 48.4 (3a-C), 47.1 (1-CH), 44.9 (7a-C), 42.4 (1'-CH<sub>2</sub>), 39.5 (7-CH<sub>2</sub>), 36.4 (6-CH<sub>2</sub>), 35.5 (1'-CH), 34.7 (3-CH<sub>2</sub>), 31.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (5'-CH), 24.1 (2-CH<sub>2</sub>), 22.8 (2C, 3'-CH<sub>2</sub>, 6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.2 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 501.2151 (Calcd 501.2104). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3400, 3008, 2996, 1532, 1413, 1121, 1013, 839, 801, 793. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +23 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.10. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(3-Chlorobenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-7a-methyloctahydroinden-4-ol (27c).**

Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and 3-chlorobenzaldehyde (50 μL, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **27c** (113 mg, 79%) as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.33 (s, 1H, H-2''), 7.25–7.18 (m, 3H, H-4'', H-5'', H-6''), 3.92 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.1 Hz), 3.65 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.1 Hz), 3.31 (d, 1H, H-4, *J* = 2.3 Hz), 2.99 (s, 1H, NH), 2.44 (ddd, 1H, H-5, *J* = 5.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 10.3 Hz), 2.02–1.73 (m, 5H, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7), 1.60–1.44 (m, 1H, H-5'), 1.44–1.24 (m, 7H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-3', H-6, H-7), 1.19–1.04 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.01–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.92 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.6 Hz), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 6.6 Hz), 0.87–0.82 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.83 ppm), 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 142.8 (1''-C), 134.4 (3''-CH), 128.3 (2''-CH), 129.8, 127.3, 126.3 (3C, 4''-C, 5''-CH, 6''-CH), 74.9 (4-CH), 58.9 (5-CH), 50.9 (1'-CH<sub>2</sub>), 50.6 (3a-C), 46.9 (7a-C), 46.3 (1-CH), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.6 (3-CH<sub>2</sub>), 36.0 (1'-CH), 33.0 (7-CH<sub>2</sub>), 31.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 28.1 (5'-CH), 26.8 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.4 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 23.0 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.0 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 14.1 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 419.2947 (Calcd 419.2955). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3493, 3011, 2996, 2891, 1499, 1312, 1031, 852, 778. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +27 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.11. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-[(furan-3-ylmethyl)-amino]-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (27d).**

Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and furan-3-carboxaldehyde (29 μL, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 7:3:0.2) to afford **27d** (107 mg, 84%) as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.37 (s, 1H, H-2''), 7.32 (d, 1H, H-5'', *J* = 4.2 Hz), 6.35 (d, 1H, H-4'', *J* = 4.2 Hz), 3.63 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.5 Hz), 3.57 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.5 Hz), 3.41 (d, 1H, H-4, *J* = 2.4 Hz), 2.70 (ddd, 1H, H-5, *J* = 2.4 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 11.7 Hz), 2.37–2.30 (m, 1H, H-1'), 2.00–1.89 (m, 1H, H-6), 1.89–1.77 (m, 2H, H-3, H-7), 1.75–1.60 (m, 1H, H-2), 1.56–1.40 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.36–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.17–1.05 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.94 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.5 Hz), 0.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 5.8 Hz), 0.83 (d, 3H, H-6', *J* = 5.8 Hz), 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 143.3 (2''-CH), 139.7 (5''-CH), 124.0 (3''-C), 110.4 (4''-CH), 75.6 (4-CH), 56.6 (5-CH), 48.4 (3a-C), 47.2 (1-CH), 45.0 (7a-C), 40.9 (6-CH<sub>2</sub>), 39.6 (1''-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.9 (7-CH<sub>2</sub>), 31.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 23.1 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.3 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 375.3125 (Calcd 375.3137). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3501, 3022, 2980, 2895, 1472, 882, 750, 689. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +26 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.12. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-(pent-4-enylamino)-octahydroinden-4-ol (27e).**

Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and pent-4-enal (36.0 μL, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described

in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **27e** (97 mg, 79%) as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.79 (ddt, 1H, H-4'', *J* = 6.7 Hz, *J* = 10.2 Hz, *J* = 16.9 Hz), 5.05–4.92 (m, 2H, H-5''), 3.35 (d, 1H, H-4, *J* = 2.4 Hz), 2.65–2.57 (m, 3H, H-5, H-1''), 2.37–2.28 (m, 1H, H-1'), 2.15–2.02 (m, 2H, H-3''), 1.98–1.90 (m, 1H, H-6), 1.88–1.76 (m, 2H, H-3, H-7), 1.70–1.39 (m, 5H, H-2, H-2', H-3, H-5'), 1.37–1.22 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.15–1.04 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.03–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.6 Hz), 0.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.81 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 6.2 Hz), 0.79 (d, 3H, H-6', *J* = 6.2 Hz), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 138.4 (4''-CH), 114.8 (5''-CH<sub>2</sub>), 75.8 (4-CH), 57.2 (5-CH), 48.3 (3a-C), 47.2 (1-CH), 45.9 (1''-CH<sub>2</sub>), 45.0 (7a-C), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.5 (3''-CH<sub>2</sub>), 31.4 (2''-CH<sub>2</sub>), 29.7 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.3 (2-CH<sub>2</sub>), 23.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.3 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 363.3489 (Calcd 363.3501). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3399, 2995, 2867, 1511, 1291, 841, 753. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +11 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.13. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(2,4-Dichlorobenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (27f).**

Amino alcohol **25** (90 mg, 0.31 mmol) and 2,4-dichlorobenzaldehyde (56.0 mg, 0.32 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **27f** (123 mg, 89%) as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.37 (s, 1H, H-3''), 7.27 (d, 1H, H-5'', *J* = 10.0 Hz), 7.20 (d, 1H, H-6'', *J* = 10.0 Hz), 3.83 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.8 Hz), 3.77 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.8 Hz), 3.46 (d, 1H, H-4, *J* = 2.5 Hz), 2.71–2.60 (m, 1H, H-5), 2.35–2.24 (m, 1H, H-1'), 2.01–1.77 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.73–1.66 (m, 1H, H-2), 1.53–1.40 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.36–1.20 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.15–0.98 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.93 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.6 Hz), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 6.4 Hz), 0.84 (d, 3H, H-6', *J* = 6.4 Hz), 0.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 136.1 (1''-C), 134.4 (2''-C), 133.4 (4''-C), 131.0 (5''-CH), 129.4 (3''-CH), 127.1 (6''-CH), 75.5 (4-CH), 56.3 (5-CH), 48.4 (3a-C), 47.4 (1''-CH<sub>2</sub>), 47.1 (1-CH), 44.9 (7-CH<sub>2</sub>), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.5 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 23.1 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.2 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 453.2596 (Calcd 453.2565). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3431, 3012, 3007, 2996, 2890, 1432, 1311, 1121, 1093, 854, 820. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +34 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.14. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(2,3-Dichlorobenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (27g).**

Amino alcohol **25** (90 mg, 0.31 mmol) and 2,3-dichlorobenzaldehyde (56.0 mg, 0.32 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **27g** (107 mg, 77%) as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.37 (d, 1H, H-4'', *J* = 7.9 Hz), 7.25 (d, 1H, H-6'', *J* = 7.8 Hz), 7.16 (t, 1H, H-5'', *J* = 7.8 Hz), 3.89 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.8 Hz), 3.83 (d, 1H, H-1'', *J* = 13.8 Hz), 3.47 (d, 1H, H-4, *J* = 2.5 Hz), 2.72–2.61 (m, 1H, H-5), 2.36–2.30 (m, 1H, H-1'), 1.96–1.79 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.73–1.62 (m, 1H, H-2), 1.54–1.42 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.36–1.19 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.14–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.97 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1', *J* = 6.6 Hz), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5', *J* = 5.4 Hz), 0.84–0.80 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.81 ppm), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 139.8 (1''-C), 133.3 (5''-C), 132.0 (3''-C), 129.2 (4''-CH), 128.2 (6''-CH), 127.2 (5''-CH), 75.5 (4-CH), 56.24 (5-CH), 48.6 (1''-CH<sub>2</sub>), 48.4 (3a-C), 47.1 (1-CH), 44.9 (7a-C), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.5 (1'-CH), 34.8

(7-CH<sub>2</sub>), 31.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (5'-CH), 24.1 (2-CH<sub>2</sub>), 23.1 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.2 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 453.2583 (Calcd 453.2565). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3442, 3032, 3002, 2983, 2871, 1413, 1332, 1231, 1023, 773. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +36 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.15. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-(4-methoxybenzylamino)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (28a).** Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and 4-methoxybenzaldehyde (44  $\mu$ L, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **28a** (104 mg, 73%) as colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.20 (d, 2H, H-2'', H-6'',  $J$  = 8.6 Hz), 6.85 (d, 2H, H-3'', H-5'',  $J$  = 8.6 Hz), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.74 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 12.7 Hz), 3.60 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 12.7 Hz), 3.44 (d, 1H, 4-H,  $J$  = 2.7 Hz), 2.78–2.65 (m, 1H, H-5), 2.42–2.31 (m, 1H, H-1'), 2.04–1.90 (m, 1H, H-6), 1.90–1.77 (m, 2H, H-3, H-7), 1.73–1.59 (m, 1H, H-2), 1.55–1.40 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.38–1.17 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.15–1.05 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.03–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.6 Hz), 0.86 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J$  = 5.8), 0.84 (d, 3H, H-6',  $J$  = 5.8 Hz), 0.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  156.9 (1''-C), 130.7 (4''-C), 127.5 (2C, 2''-CH, 6''-CH), 112.1 (2C, 3''-CH, 5''-CH), 73.8 (4-CH), 54.8 (5-CH), 53.5 (OCH<sub>3</sub>), 48.2 (1''-CH<sub>2</sub>), 46.6 (3a-C), 45.4 (1-CH), 43.2 (7a-C), 37.8 (6-CH<sub>2</sub>), 34.7 (3-CH<sub>2</sub>), 33.8 (1'-CH), 33.1 (7-CH<sub>2</sub>), 29.6 (4'-CH<sub>2</sub>), 27.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.2 (5'-CH), 22.4 (2-CH<sub>2</sub>), 21.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 21.1 (6'-CH<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>-5'), 19.5 (CH<sub>3</sub>-3a), 18.2 (CH<sub>3</sub>-7a), 17.29 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 415.3455 (Calcd 415.3450). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3491, 3031, 2956, 2870, 1414, 1342, 1085, 802. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +41 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.16. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(2,4-Dimethoxybenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (28b).** Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and 2,4-dimethoxybenzaldehyde (62  $\mu$ L, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.2) to afford **28b** (86 mg, 57%) as colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.07 (d, 1H, H-6'',  $J$  = 8.2 Hz), 6.44 (s, 1H, H-3''), 6.41 (d, 1H, H-5'',  $J$  = 8.2 Hz), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.71 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.1 Hz), 3.59 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.1 Hz), 3.47 (d, 1H, H-4,  $J$  = 2.7 Hz), 2.66–2.60 (m, 1H, H-5), 2.38–2.29 (m, 1H, H-1'), 1.99–1.83 (m, 2H, H-3, H-6), 1.81–1.74 (m, 1H, H-7), 1.70–1.59 (m, 1H, H-2), 1.57–1.39 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.38–1.22 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.19–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.05–0.97 (m, 1H, H-2'), 0.89 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.6 Hz), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.2 Hz), 0.84 (d, 3H, H-6',  $J$  = 6.2 Hz), 0.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  160.0 (2''-C), 158.6 (4''-C), 130.3 (6''-CH), 120.8 (1''-C), 103.6 (5''-CH), 98.5 (3''-CH), 75.2 (4-CH), 55.6 (5-CH), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 48.2 (3a-C), 47.0 (1-CH), 45.0 (7a-C), 44.9 (1''-CH<sub>2</sub>), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.5 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.4 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (5'-CH), 24.1 (2-CH<sub>2</sub>), 23.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.2 (CH<sub>3</sub>-3a), 19.9 (CH<sub>3</sub>-7a), 18.9 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 445.3546 (Calcd 445.3556). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3472, 3022, 2931, 2853, 1413, 1321, 1266, 1085, 873, 802. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +53 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.17. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-5-ethylamino-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (28c).** Amino alcohol **25** (100 mg, 0.34 mmol) and acetaldehyde (20  $\mu$ L, 0.35 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 7:3:0.2) to afford **28c** (83 mg, 75%) as colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  3.35 (d, 1H, H-4,

$J$  = 2.8 Hz), 2.68–2.52 (m, 3H, H-1'', H-5), 2.35–2.27 (m, 1H, H-1'), 1.99–1.90 (m, 1H, H-6), 1.87–1.76 (m, 2H, H-3, H-7), 1.68–1.59 (m, 1H, H-2), 1.49–1.36 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.34–1.21 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.14–1.04 (m, 6H, H-2'', H-3', H-4'), 1.01–0.93 (m, 1H, H-2'), 0.90 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.6 Hz), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.3 Hz), 0.84–0.79 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a at 0.81 ppm), 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  76.0 (4-CH), 57.1 (5-CH), 48.4 (3a-C), 47.1 (1-CH), 45.0 (7a-C), 40.7 (1''-CH<sub>2</sub>), 39.6 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.5 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 23.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.3 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.0 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 323.3158 (Calcd 323.3188). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3399, 2995, 2867, 1511, 1291, 841, 753. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +16 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.18. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(N-Benzyl-N-methylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (29a).** Amino alcohol **27a** (112 mg, 0.29 mmol) and a 34% aqueous solution of formaldehyde (50  $\mu$ L, 0.58 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **29a** (97 mg, 83%) as colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.36–7.21 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4, H-5'', H-6''), 3.75 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.3 Hz), 3.63 (d, 1H, H-4,  $J$  = 2.8 Hz), 3.40 (d, 1H, H-1'',  $J$  = 13.3 Hz), 2.42–2.33 (m, 2H, H-1', H-5), 2.15 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.04–1.83 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 1.75–1.64 (m, 1H, H-2), 1.63–1.41 (m, 2H, H-3, H-5'), 1.40–1.18 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.18–1.07 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.06–0.98 (m, 1H, H-2'), 0.93 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.6 Hz), 0.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J$  = 6.0 Hz), 0.83 (d, 3H, H-6',  $J$  = 6.0 Hz), 0.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  139.34 (1''-C), 128.8 (2C, 2''-CH, 6''-CH), 128.2 (2C, 3''-CH, 5''-CH), 126.8 (4''-CH), 75.5 (4-CH), 63.0 (5-CH), 58.1 (1''-CH<sub>2</sub>), 48.6 (3a-C), 47.2 (1-CH), 44.3 (7a-C), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 38.2 (NCH<sub>3</sub>), 36.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.7 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 22.8 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.2 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 19.7 (CH<sub>3</sub>-7a), 18.8 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 399.3523 (Calcd 399.3501). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3431, 3019, 2932, 2854, 1501, 1345, 1023, 743, 691. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +19 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).

**5.6.15.19. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(N,N-Dibenzylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroindene-4-ol (29b).** Amino alcohol **27a** (150 mg, 0.39 mmol) and benzaldehyde (67  $\mu$ L, 0.58 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **29b** (156 mg, 84%) as colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.35–7.17 (m, 10H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 3.81 (d, 2H, H-1'',  $J$  = 14.5 Hz), 3.76 (d, 2H, H-1'',  $J$  = 14.5 Hz), 3.65 (d, 1H, H-4,  $J$  = 2.8 Hz), 2.94–2.70 (m, 1H, H-5), 2.38–2.29 (m, 1H, H-1'), 2.01–1.90 (m, 1H, H-6), 1.90–1.80 (m, 2H, H-3, H-7), 1.77–1.63 (m, 1H, H-2), 1.59–1.41 (m, 3H, H-2, H-3, H-5'), 1.40–1.25 (m, 4H, H-1, H-2', H-3', H-7), 1.24–1.17 (m, 1H, H-6), 1.21–1.05 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.88 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-1',  $J$  = 6.1 Hz), 0.87 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-5',  $J$  = 5.8 Hz), 0.87 (d, 3H, H-6',  $J$  = 5.8 Hz), 0.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3a), 0.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7a). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  139.8 (2C, 1''-C), 128.7 (4C, 2''-C, 6''-C), 128.3 (4C, 3''-C, 5''-C), 126.8 (2C, 4''-C), 76.6 (4-CH), 61.0 (5-CH), 53.9 (2C, 1''-CH<sub>2</sub>), 49.0 (3a-C), 47.3 (1-CH), 44.6 (7a-C), 39.5 (6-CH<sub>2</sub>), 36.4 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.9 (7-CH<sub>2</sub>), 32.2 (4'-CH<sub>2</sub>), 29.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 24.2 (2-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>3</sub>-5'), 21.4 (CH<sub>3</sub>-3a), 20.7 (3'-CH<sub>2</sub>), 19.8 (CH<sub>3</sub>-7a), 19.0 (CH<sub>3</sub>-1'). HRMS Found 475.3718 (Calcd 475.3814). IR (NaCl, film, cm<sup>-1</sup>): 3467, 3025, 2932, 2857, 1452, 1304, 1298, 1023, 749, 684. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +47 (0.5; CHCl<sub>3</sub>).



1942

M. König et al. / Bioorg. Med. Chem. 21 (2013) 1925–1943

**5.6.15.20. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-5-(N-Benzyl-N-pent-4-enylamino)-1-((R)-1,5-dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyloctahydroinden-4-ol (29c).** Amino alcohol **27a** (150 mg, 0.39 mmol) and pent-4-enal (59  $\mu$ L, 0.58 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **29c** (146 mg, 82%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.40–7.17 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 5.72 (ddt, 1H, H-4''',  $J = 6.6$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 16.9$  Hz), 5.02–4.73 (m, 2H, H-5'''), 3.78 (d, 1H, H-1'',  $J = 14.1$  Hz), 3.66 (d, 1H, H-1'',  $J = 14.1$  Hz), 3.55 (d, 1H, H-4,  $J = 2.5$  Hz), 2.72–2.62 (m, 1H, H-5), 2.61–2.49 (m, 2H, H-1'''), 2.39–2.30 (m, 1H, H-1'), 2.01–1.93 (m, 1H, H-6), 1.92–1.83 (m, 4H, H-3, H-3''', H-7), 1.74–1.65 (m, 1H, H-2), 1.60–1.40 (m, 5H, H-1, H-2'', H-3, H-5'), 1.39–1.18 (m, 5H, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.19–1.05 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.96 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 6.6$  Hz), 0.87 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J = 5.9$  Hz), 0.86–0.83 (m, 3H, H-6', with underneath s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a at 0.84 ppm), 0.73 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  139.9 (1''-C), 138.2 (4'''-CH), 128.4 (2C, 2''-CH, 6''-CH), 128.1 (2C, 3''-CH, 5''-CH), 126.7 (4''-CH), 114.5 (5''-CH<sub>2</sub>), 75.8 (4-CH), 60.6 (5-CH), 53.4 (1''-CH<sub>2</sub>), 48.6 (3a-C), 48.1 (1'''-CH<sub>2</sub>), 47.1 (1-CH), 44.3 (7a-C), 39.4 (6-CH<sub>2</sub>), 36.3 (3-CH<sub>2</sub>), 35.6 (1'-CH), 34.8 (7-CH<sub>2</sub>), 31.8 (4'-CH<sub>2</sub>), 31.3 (3'''-CH<sub>2</sub>), 29.1 (2'-CH<sub>2</sub>), 27.8 (5'-CH), 24.1 (2-CH<sub>2</sub>), 24.0 (2'''-CH<sub>2</sub>), 22.7 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.5 ( $\text{CH}_3$ -5'), 21.2 ( $\text{CH}_3$ -3a), 20.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 19.6 ( $\text{CH}_3$ -7a), 18.8 ( $\text{CH}_3$ -1'). HRMS Found 453.3988 (Calcd 453.3970). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3442, 3012, 2949, 2867, 1412, 1319, 1023, 992, 917, 749.  $[\alpha]_D^{20} +39$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

**5.6.15.21. (1R,3aR,4R,5S,7aR)-1-((R)-1,5-Dimethylhexyl)-3a,7a-dimethyl-5-(N-methyl-N-pent-4-enylamino)-octahydroinden-4-ol (30).** Amino alcohol **27e** (150 mg, 0.41 mmol) and a 34% aqueous solution of formaldehyde (71  $\mu$ L, 0.58 mmol) in methanol (3 mL) were treated as described in procedure C. The crude product was subjected to SCC (petroleum ether/ethyl acetate/triethylamine 9:1:0.1) to afford **30** (137 mg, 87%) as colourless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.80 (ddt, 1H, H-4'',  $J = 6.6$  Hz,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 16.8$  Hz), 5.11–4.87 (m, 2H, H-5''), 3.44 (d, 1H, H-4,  $J = 2.4$  Hz), 2.67–2.47 (m, 1H, H-1'''), 2.46–2.28 (m, 2H, H-1'', H-5), 2.26–2.19 (m, 1H, H-1', with underneath s, 3H,  $\text{NCH}_3$  at 2.23 ppm), 2.11–1.75 (m, 5H, H-3, H-3'', H-6, H-7), 1.66–1.40 (m, 6H, H-1, H-2, H-2', H-3, H-5'), 1.38–1.17 (m, 5H, H-2, H-2', H-3', H-6, H-7), 1.16–1.06 (m, 3H, H-3', H-4'), 1.04–0.94 (m, 1H, H-2'), 0.91 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -1',  $J = 5.9$  Hz), 0.86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -3a), 0.84 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -5',  $J = 6.0$  Hz), 0.82 (d, 3H, H-6',  $J = 6.0$  Hz), 0.71 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -7a).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  138.6 (4''-CH), 114.7 (5''-CH<sub>2</sub>), 75.5 (4-CH), 62.7 (5-CH), 53.0 (1''-CH<sub>2</sub>), 48.5 (3a-C), 47.2 (1-CH), 44.3 (7a-C), 39.6 ( $\text{NCH}_3$ ), 38.4 (6-CH<sub>2</sub>), 36.5 (3-CH<sub>2</sub>), 35.8 (1'-CH), 34.9 (7-CH<sub>2</sub>), 31.8 (4'-CH<sub>2</sub>), 31.5 (3'''-CH<sub>2</sub>), 29.3 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.0 (5'-CH), 25.8 (2-CH<sub>2</sub>), 24.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 22.9 (6'-CH<sub>3</sub>), 22.6 ( $\text{CH}_3$ -5'), 21.3 ( $\text{CH}_3$ -3a), 20.5 (2''-CH<sub>2</sub>), 19.8 ( $\text{CH}_3$ -7a), 18.9 ( $\text{CH}_3$ -1'). HRMS Found 377.3659 (Calcd 377.3658). IR (NaCl, film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3401, 2951, 2867, 1497, 1346, 1201, 1037, 991, 916, 841, 753.  $[\alpha]_D^{20} +12$  (0.5;  $\text{CHCl}_3$ ).

## Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.041>. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

## References and notes

- King, F. D. *Medicinal Chemistry, Principles and Practice*; Royal Society of Chemistry **2002**, pp 64–90.
- Taba, I. J. *Clin. Invest.* **2002**, 110, 583.
- Kandutsch, A. A.; Russel, A. E. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 2253.
- Kandutsch, A. A.; Russel, A. E. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 2256.
- Bloch, K. E. *Crit. Rev. Biochem.* **1983**, 14, 47.
- Shrivastava, S.; Paila, Y. D.; Dutta, A.; Chattopadhyay, A. *Biochemistry* **2008**, 47, 5668.
- Simons, K.; Eehalt, R. J. *Clin. Invest.* **2002**, 110, 597.
- Keller, R. K.; Arnold, T. P.; Fliesler, S. J. *Lipid Res.* **2004**, 45, 347.
- Waterham, H. R.; Wanders, J. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1529, 340.
- Grundy, S. M.; Cleeman, J. L.; Bairey Merz, C. N.; Brewer, H. B., Jr.; Clark, L. T.; Hunninghake, D. B.; Pasternak, R. C.; Smith, S. C., Jr.; Stone, N. J. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, 44, 720.
- Wagner, B. K.; Gilbert, T. J.; Hanai, J.; Imamura, S.; Bodycombe, N. E.; Bon, R. S.; Waldmann, H.; Clemons, P. A.; Sukhatme, V. P.; Mootha, V. K. *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 900.
- Berardi, F.; Abate, C.; Ferorelli, S.; de Robertis, A. F.; Leopoldo, M.; Colabufo, N. A.; Nisoi, M.; Perrone, R. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7523.
- Kelley, R. L.; Herman, G. E. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, 2, 299.
- Herman, G. E. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, 12, R75.
- Liu, X. Y.; Dangel, A. W.; Kelley, R. L.; Zhao, W.; Denny, P.; Botcherby, M.; Cattana, B.; Peters, J.; Hunsicker, P. R.; Mallon, A. M.; Strivens, M. A.; Bate, R.; Miller, W.; Rhodes, M.; Brown, S. D.; Herman, G. E. *Nat. Genet.* **1999**, 22, 182.
- Braverman, H.; Wilcox, W. R.; Rimoim, D. L.; Smith, M.; Kratz, L.; Kelley, R. L.; Valle, D. *Nat. Genet.* **1999**, 22, 291.
- Has, C.; Bruckner-Truderman, L.; Müller, D.; Floeth, M.; Folkers, E.; Donnai, D.; Traupe, H. *Hum. Mol. Genet.* **1991**, 2009, 9.
- Moebius, F. F.; Fitzky, B. U.; Glossmann, H. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, 11, 106.
- Hanner, M.; Moebius, F. F.; Weber, F.; Grabner, M.; Striessnig, J.; Glossmann, H. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 7551.
- Fiechi, A.; Galli Kienle, M.; Scala, A.; Galli, G.; Grossi Paoletti, E.; Cattabeni, F.; Paoletti, R. *Proc. R. Soc. Lond.* **1972**, 180, 147.
- Nes, W. W.; Zhou, W.; Dennis, A. L.; Li, H.; Jia, Z.; Keith, R. A.; Piser, T. M. *Biochem. J.* **2002**, 367, 587.
- Kato, T.; Shoami, M.; Kawase, Y. *J. Pestic. Sci.* **1980**, 5, 69.
- Rahier, A.; Schmitt, P.; Huss, B.; Benveniste, P.; Pommer, E. H. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1986**, 25, 112.
- Moebius, F. F.; Reiter, R. J.; Bermoser, K.; Glossmann, H.; Cho, S. Y.; Paik, Y.-K. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 43, 591.
- Rahier, A.; Pierre, S.; Riveill, G.; Karst, F. *Biochem. J.* **2008**, 414, 247.
- Rahier, A.; Taton, M. *Biochemistry* **1996**, 35, 7069.
- Rahier, A.; Taton, M.; Bouvier-Navé, P.; Schmitt, P.; Benveniste, P.; Schuber, F.; Narula, A. S.; Cattel, L.; Anding, C.; Place, P. *Lipids* **1986**, 21, 52.
- Renard, D.; Perruchon, J.; Giera, M.; Müller, J.; Bracher, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 8123.
- Moebius, F. F.; Bermoser, K.; Reiter, R. J.; Hanner, M.; Striessnig, J.; Glossmann, H. *Biochemistry* **1996**, 35, 16871.
- Moebius, F. F.; Fitzky, B. U.; Lee, J. N.; Paik, Y.-K.; Glossmann, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 1998, 95.
- Taton, M.; Rahier, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 181, 465.
- Bae, S.-H.; Paik, Y.-K. *Biochem. J.* **1997**, 326, 609.
- Suárez, Y.; Fernández, C.; Gómez-Coronado, D.; Ferruelo, A. J.; Dávalos, A.; Martínez-Botas, J.; Lasunción, M. A. *Cardiovasc. Res.* **2004**, 64, 346.
- Burbiel, J.; Bracher, F. *Steroids* **2003**, 68, 587.
- Giera, M.; Renard, D.; Plössl, F.; Bracher, F. *Steroids* **2008**, 73, 288.
- Winda, A.; Grundmann, W. L. *Ann.* **1936**, 524, 295.
- Mayer, C. D.; Bracher, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 68, 11810.
- Mayer, C. D.; Allmendinger, L.; Bracher, F. *Tetrahedron* **2012**, 68, 11810.
- Barrett, A. G. M.; Barton, D. H. R.; Russell, R. A.; Widdowson, D. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 631.
- Giera, M.; Plössl, F.; Bracher, F. *Steroids* **2007**, 72, 633.
- Corey, E. J.; Lee, J.; Liu, D. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9149.
- Hoeger, C. A.; Johnston, A. D.; Okamura, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4690.
- Girard, C.; Conia, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 3327.
- Furukawa, J.; Nishimura, J.; Kawabata, N.; Kitayama, M. *Tetrahedron* **1971**, 27, 1799.
- Dauben, W. G.; Greenfield, L. J. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1597.
- Harrowven, D. C.; Pascoe, D. D.; Guy, I. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 425.
- Salunke, D. B.; Ravi, D. S.; Pore, V. S.; Mitra, D.; Hazra, B. G. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2652.
- Barnier, J. P.; Champion, J.; Conia, J. M. *Org. Synth.* **1981**, 60, 25.
- Barrero, A. F.; Herrador, M. M.; Artega, P.; Catalan, J. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3589.
- Constantino, M. G.; Valdemar, L. J.; Invernize, P. R. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 3529.
- Fang, Y. Q.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5560.
- Sun, Q.; Cai, S.; Peterson, B. R. *Org. Lett.* **2009**, 11, 567.
- Serrano, P.; Casas, J.; Zucco, M.; Emeric, G.; Egidio-Gabas, M.; Llebaria, A.; Delgado, A. J. *Comb. Chem.* **2007**, 9, 43.
- For a review on the chemistry of  $\alpha$ -azido ketones, see: Patonay, T.; Konya, K.; Juhasz-Toth, E. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2797.
- Brewster, W. K.; Nichols, D. E.; Riggs, R. M.; Mottola, D. M.; Lovenberg, T. W.; Lewis, M. H.; Mailman, R. B. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1756.
- Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents—Part 84: Microdilution—Special requirements for testing of fungi against antifungal agents, in: DIN 58940-84, Beuth Verlag; Berlin, 2002.

57. SANCO guideline (2009) *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Document No. SANCO/10684/2009.
58. Hagiwara, K.; Nakamura, Y.; Nishijima, M.; Yamakawa, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30, 835.
59. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
60. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1981**, 65, 55.



### 1.2.5.3 Beitrag am Artikel

Alle beschriebenen Substanzen wurden im Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese-Assay von mir qualitativ analysiert. Die Vielversprechendsten wurden auch dem quantitativen Assay auf Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese unterworfen und mit literaturbekannten Referenzinhibitoren verglichen. Zudem war ich für die Reinheitsbestimmung der Syntheseprodukte mittels HPLC verantwortlich. Die Syntheseplanung und Durchführung sowie die Erstellung des Artikels unterlagen allein Mathias König und Prof. Dr. Franz Bracher. Die Grafik Abbildung 6 und die Tabelle 1 in dem Artikel wurden von mir erstellt.

## 1.2.6 $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren von Melanie Krojer

Krojer M, Müller C, Bracher F. Steroidomimetic aminoalkyl spiroacetals as novel inhibitors of the enzyme  $\Delta^{8/7}$ -sterol isomerase in cholesterol biosynthesis. *Archiv der Pharmazie* 2013;346:1-15.

### 1.2.6.1 Zusammenfassung

Dieses Kapitel und das vorhergehende Kapitel 1.2.5 befassen sich mit  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren. Da die Inhibitoren zeitgleich synthetisiert wurden kann nicht von Generationen oder Weiterentwicklungen wie bei den OSC-Inhibitoren gesprochen werden.

Die Bedeutung der Entwicklung von  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren wurde bereits in Kapitel 1.2.5 besprochen.

Ziel dieser Arbeit war es eigentlich, wie in der Arbeit von Mathias König (vgl. Kapitel 1.2.5) [30], OSC-Inhibitoren herzustellen. Mathias König führte protonierbare Aminogruppen in Position C5 von Grundmanns Keton ein, Melanie Krojer hingegen ausgehend von der Carbonyl-Gruppe in Position C4.

Ausgehend vom Grundmanns Keton (vgl. ebenfalls Kapitel 1.2.1, 1.2.5, 1.2.8) und von Tetralonen (Nachahmung von Grundmanns Keton) wurden eine Reihe von Aminoalkyl-Spiroacetal-Verbindungen ( $n = 27$ ) synthetisiert (siehe Kapitel 1.2.6.2; Schema 1-4 im nachfolgenden Artikel) Insgesamt wurden 40 Verbindungen von Melanie Krojer im Cholesterol-Biosynthese-Assay von mir getestet. Durch die Einführung von sekundären und tertiären Aminen, die unter physiologischen Bedingungen zum Teil protoniert vorliegen, sollten HEIs imitiert werden (vgl. Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.5, 1.3.2.2). Auch hier sollte durch Grundmanns Keton, welches die Ringe C und D sowie die lipophile Seitenkette von Sterolen perfekt imitiert, eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms geschaffen werden, in dem zuerst das Substrat Oxidosqualen schon in eine steroidähnliche Konformation gebracht (vgl. Kapitel 1.2.1.2; Abbildung 2 im Artikel) und dann sukzessive zum Sterol cyclisiert wird.

Die Substanzen wurden sowohl im Cholesterol- als auch im Ergosterol-Biosynthese-Assay getestet. Im Ergosterol-Biosynthese-Assay konnte keine Aktivität festgestellt werden, obwohl bekannte Antimykotika (Ketoconazol und Itraconazol; vgl. Kapitel 1.3) ebenfalls cyclische Acetale sind. Der Agar-Diffusionstest bestätigte das Ergebnis aus dem Ergosterol-Biosynthese-Assay, da sich die Verbindungen dort als inaktiv erwiesen. Die Frage war nun, ob die Verbindungen einen Effekt an Humanzellen haben. Im MTT-Test (vgl. Kapitel 1.2.6.2 im Artikel Tabelle 1) zeigten die Verbindungen eine leichte bis keine Zytotoxizität. Die Werte lagen bei den im Cholesterol-Biosynthese-Assay aktiven Verbindungen ( $n = 7$ ) zwischen 16 und  $> 50 \mu\text{M}$  (Cisplatin  $5 \mu\text{M}$ ). Fünf Verbindungen konnten überraschenderweise als Inhibitoren der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase identifiziert werden, zwei zeigten eine Multienzymhemmung. Als natürliche Substrate der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase dienen Zymostenol im Kantusch-Russel-Pathway und Zymosterol im Bloch-Pathway (vgl. Kapitel 1.2.5  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren von Mathias König,

bzw. Abbildung 5). Da auch hier nur Zymostenol akkumulierte, wie bereits bei den Substanzen von Mathias König in Kapitel 1.2.5, kann von einer sehr hohen Enzymselektivität ausgegangen werden. Die protonierbare Aminogruppe befindet sich wie bei den Verbindungen von Mathias König nicht an der dem C8 des Sterolgrundgerüsts entsprechender Position, trotzdem kommt es zu einer Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Die Testung von bekannten Referenzinhibitoren (Tamoxifen, Tridemorph) zeigte immer eine Akkumulation von beiden Substraten, was eine zusätzliche Hemmung der  $\Delta^{24}$ -Reduktase nahelegte (vgl. Kapitel 1.2.5.2 im Artikel Abbildung 5, vgl. Kapitel 1.2.5.1). Die fünf aktiven Monoenzym-Inhibitoren wurden anschließend in einem quantitativen Vortest (Inkubation mit  $^{13}\text{C}$ -Acetat bei 1  $\mu\text{M}$ , siehe Kapitel 1.2.1.2) getestet. Die besten Verbindungen (**16i**, **16j**, **20c**) wurden anschließend einer  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung unterzogen, für Substanz **16i**, ein *N*-Benzylpiperidin-4-ylamino-Derivat des Spiroacetals von Grundmanns Keton, konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1,7  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Die Verbindungen von Melanie Krojer waren hinsichtlich der Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese um den Faktor circa 100 schwächer als die Verbindungen von Mathias König.

Neben der teuren Synthese ausgehend vom Grundmanns Keton ist es erstmals mit Tetralon-Derivaten (v.a. **20c**) gelungen, hochselektive Inhibitoren der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase herzustellen. Grundbausteine vom Tetralon-Typ bieten gegenüber Grundmanns Keton deutliche Vorteile: a) günstiger, b) steroidomimetisch mit mehr Modifizierungsmöglichkeiten am Grundgerüst, c) bessere physikochemische Eigenschaften, d) höhere Stabilität.

Die ersten Substanzen dieser Tetralon-Klasse hatten im Vergleich zu den Derivaten von Grundmanns Keton von Mathias König (vgl. Kapitel 1.2.5) zwar höhere  $\text{IC}_{50}$ -Werte im Cholesterol-Biosynthese-Assay, jedoch war die Substanzbibliothek deutlich kleiner. Durch weiterführende Arbeiten könnte ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Substanzklasse erreicht werden. Neue Inhibitoren dieser Klasse könnten nicht nur selektiv sein sondern auch hoch potent.

## 1.2.6.2 Artikel

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2013, 346, 1–15

1

### Full Paper

## Steroidomimetic Aminomethyl Spiroacetals as Novel Inhibitors of the Enzyme $\Delta 8,7$ -Sterol Isomerase in Cholesterol Biosynthesis

Melanie Krojer, Christoph Müller, and Franz Bracher

Department of Pharmacy – Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany

Grundmann's ketone is converted to a spiroacetal containing a 5-hydroxymethyl-5-nitro-1,3-dioxane moiety whose hydroxymethyl group can be esterified or directly substituted with primary and secondary amines. Among the resulting aminomethyl spiroacetals, several ones bearing diamino residues were found to be inhibitors of the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase in cholesterol biosynthesis. The complex bicyclic building block derived from Grundmann's ketone could be replaced by a properly substituted tetraline scaffold, without noteworthy loss in activity. This opens the opportunity to perform further structural modifications for the design of new steroidomimetic inhibitors of human  $\Delta 8,7$ -isomerase.

**Keywords:** Acetal / Cholesterol biosynthesis / Enzyme inhibitors / Isomerase / Steroidomimetic

Received: August 9, 2013; Revised: September 16, 2013; Accepted: September 17, 2013

DOI 10.1002/ardp.201300296

### Introduction

The enzymes of the biosynthetic pathways leading to cholesterol in man and ergosterol in fungi and trypanosomes are important targets for therapy with low-molecular drugs. Cholesterol is essential for the various functions of vertebral plasma membranes [1], and relevant for the embryonic progress and morphogenesis [2]. Further, cholesterol is the biosynthetic precursor for steroid hormones and bile acids. Disruptions in cholesterol metabolism cause various diseases, among them cardiovascular indispositions induced by increased blood cholesterol levels (hypercholesterinaemia) [3]. Presently, these disorders are treated mainly with statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase, an enzyme acting early in the pre-squalene part of cholesterol biosynthesis. A number of severe side-effects of the statins [4] led to efforts aimed at developing new cholesterol-lowering drugs with other molecular mechanisms of action. For this purpose the post-squalene part of the cholesterol biosynthesis pathway offers attractive targets [5]. On the other

side, the inborn lack of late enzymes of cholesterol biosynthesis is known to cause some rare but very serious disorders. For example, CHILD (congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects) syndrome [6] and Conradi-Hünermann-Happle syndrome [7] are dysmorphic syndromes of variable severity due to mutations of the gene encoding human  $3\beta$ -hydroxysteroid  $\Delta 8,7$ -sterol isomerase [hSI; EC 5.3.3.5; also known as emopamil-binding protein (EBP)] [8]. Specific inhibitors of such enzymes are expected to be useful tools for getting deeper insight into these disorders [9].

Ergosterol is the main sterol in the cytoplasmatic membranes of fungi and trypanosomes, and disruption of ergosterol biosynthesis is the main strategy for treatment of fungal [10] and trypanosomal infections [11]. Further, inhibitors of ergosterol biosynthesis in plant-pathogenic fungi play a central role in crop protection [12]. The azoles are the most widely used antifungal drugs, but due to emerging resistance against these drugs (e.g., fluconazole), there is urgent need for developing novel antifungals [13]. The post-squalene part of ergosterol biosynthesis still offers new targets to be exploited [14].

Due to the tremendous importance of steroids as hormones and membrane constituents, numerous approaches have been developed for the inhibition of relevant enzymes in

**Correspondence:** Prof. Franz Bracher, Department of Pharmacy – Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Bute-  
nandstr. 5–13, 81377 Munich, Germany.

**E-mail:** franz.bracher@cup.uni-muenchen.de

**Fax:** +49-89-218077802

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

sterol biosynthesis, and a wide variety of chemical structures can be found in compounds targeting the biosynthesis of cholesterol and ergosterol. Since the single steps of these biosynthetic pathways are understood in detail for centuries, considerable effort has been undertaken to design new inhibitors on a rational basis. In order to mimic the substrates or high-energy intermediates (HEI) of these enzymatic reactions, numerous steroids bearing modifications in the tetracyclic core [15–19] or the side chain [20–26] have been developed as inhibitors of sexual hormone, cholesterol, and ergosterol biosynthesis. Alternatively, steroidomimetic compounds have been described to efficiently inhibit particular enzymes in steroid biosynthesis. In estrogen biosynthesis the enzymes 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase can be inhibited by compounds that mimic some of the four rings of the steroid scaffold, e.g., biphenyls as ring AC mimics [27], (partially hydrogenated) arylindenes and hydroxyphenylnaphthols as ring A-CD mimics [28–30], and vinylbenzo[b]thiophenes as ring AB mimics [31]. *N*-substituted azadecalines mimic rings A and B in plant [32] and fungal sterol biosynthesis [33]. Recently, our group demonstrated that Grundmann's ketone (1) [34], easily accessible by ozonolysis of cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>), is a suitable, correctly configured building block providing rings C and D, as well as the side chain of steroids for the synthesis of sterol biosynthesis inhibitors. Through suitable chemical modifications we obtained aminopropylindenes of type 2 as inhibitors of the enzyme oxidosqualene cyclase (lanosterol synthase) from various organisms [35], and aminoalcohols of type 3 as potent, selective inhibitors of mammalian  $\Delta$ 8,7-sterol isomerase [36] (Fig. 1).

In continuation of this work, we intended to introduce new aminoalkyl residues to the scaffold 1. Aliphatic amino groups are of special interest in this context, since they are

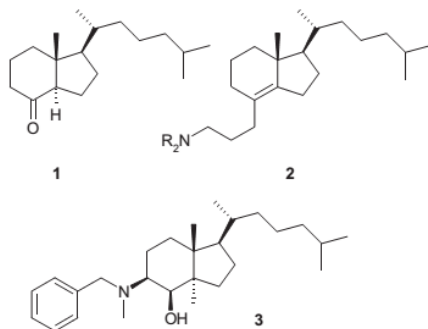
protonated at physiological pH, and thus are able to mimic carbocationic HEIs of enzymatic transformations. Since mimics of the HEI have a higher affinity for the active site of the enzyme than the regular substrates, steroidomimetics containing protonable nitrogen atoms in pertinent positions have the potential to strongly inhibit enzymes in ergosterol and cholesterol biosynthesis [37]. On the other hand, it is difficult to predict the minute target enzyme, since numerous enzymatic transformations in the post-squalene part of sterol biosynthesis go through carbocationic HEIs, e.g., those catalyzed by the enzymes sterol  $\Delta$ 8,7-isomerase,  $\Delta$ 7-sterol reductase,  $\Delta$ 24-sterol reductase, and  $\Delta$ 14-sterol reductase [37]. For this reason most of the established protonable sterol biosynthesis inhibitors show low selectivity. Besides inhibition of  $\Delta$ 8,7-sterol isomerase, ifenprodil and MDL28815 also inhibit  $\Delta$ 14-sterol reductase [38]; trifluoperidol, AY9944, and fenpropimorph show additional inhibition of  $\Delta$ 7-sterol reductase [39], trifluoperazine, tamoxifen, and U18666A additionally inhibit  $\Delta$ 24-sterol reductase [40].

In this project we aimed at the introduction of amino groups via conversion of Grundmann's ketone (1) to spiroacetals (A) using 1,2- or 1,3-diols bearing the required protonable residues or precursors thereof. We selected the spiroacetal moiety due to its expected easy introduction and sufficient stability. Further, the antifungal spiroxamine (4), a sterol  $\Delta$ 8,7-isomerase inhibitor used in crop protection [41], shows a comparable spiroacetal moiety, and cyclic acetal (1,3-dioxolane) groups are also present in theazole antifungals (inhibitors of lanosterol demethylase) ketoconazole (5) and itraconazole (Fig. 2). Since we have previously developed screening systems that allow the identification of inhibitors of any enzymes in the post-squalene part of cholesterol biosynthesis [42] and the post-lanosterol part of ergosterol biosynthesis [43], we had a tool in hand to detect any emerging effect in this field, no matter which of the considered enzyme(s) were inhibited.

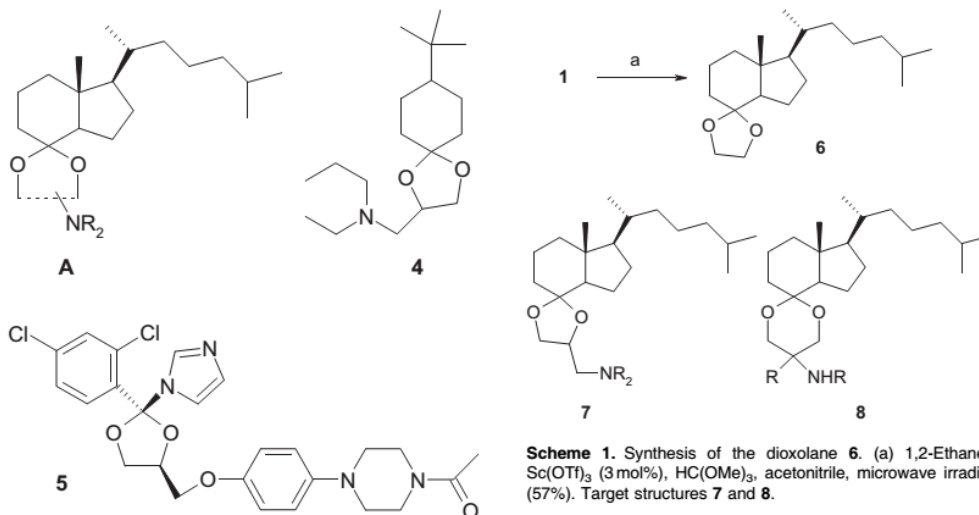
## Results and discussion

### Chemistry

Grundmann's ketone (1) was obtained from cholecalciferol by ozonolysis using our recently improved protocol [36] on a multigram scale. For the attempted introduction of the amino residues at C-4 of ketone 1, we first worked out a suitable protocol for the acetalization with diols. In a model reaction, 1 was reacted with 1,2-ethanediol in the presence of various catalysts that had been described for related reactions in the literature before. Standard protocols using Brønsted acids (e.g., 4-toluenesulfonic acid [44]) or iodine [45] as catalysts gave no conversion to the 1,3-dioxolane 6 at all. Finally, we found that the Lewis acid scandium(III) triflate [46] catalyzes this reaction well, and after some optimization (additives,



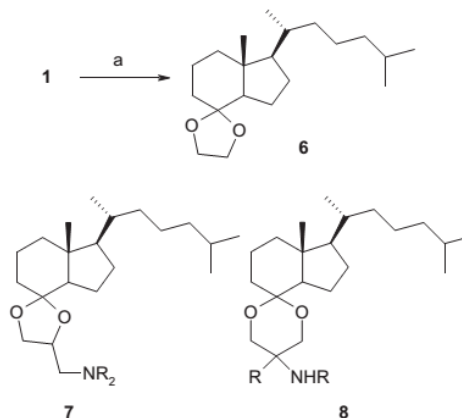
**Figure 1.** Grundmann's ketone (1) and recently developed inhibitors of enzymes in sterol biosynthesis (2 and 3) derived thereof.



**Figure 2.** General structure of the target compounds of this work (**A**) and two inhibitors of ergosterol biosynthesis containing acetal moieties: spiroamine (**4**) and ketoconazole (**5**).

solvents, reaction conditions) we found that acetalization can be performed in 45% yield using 3 mol% of the catalyst, trimethyl orthoformate as dehydrating agent [47] in acetonitrile under reflux, and the yield can even be enhanced to 57% by microwave irradiation (Scheme 1).

For the preparation of analogous spiroacetals of type **7**, containing aminoalkyl residues in the 1,3-dioxolane ring, we investigated the acetalization of **1** with various 3-amino-1,2-propanediols (3-amino, 3-*N*-methylamino, 3-*N,N*-dimethylamino, 3-pyrrolidin-1-yl, 3-morpholin-4-yl), but did not observe any conversions. This is most likely due to the fact that the Lewis acid catalyst is deactivated by the amino residues. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) and 2-amino-1,3-diol could not be converted at all, and even the *N*-Cbz derivative of 2-amino-1,3-diol [48], in which the basicity of the amino group is eliminated, did not give the desired 5-*Cbz*-amino-1,3-dioxane of type **8** (Scheme 1). Therefore, we intended to prepare a spiroacetal bearing a non-basic residue first, and then convert this to the desired amino(alkyl) derivative. Acetalization of Grundmann's ketone (**1**) with glycerol under the conditions described above resulted in almost quantitative conversion of the ketone, but gave an inseparable mixture of isomeric 1,3-dioxolanes and 1,3-dioxanes. For this reason we focussed on symmetric acetal rings exclusively in our further investigations. Acetalization with 2-methylene-1,3-propanediol gave the 5-methylene-1,3-



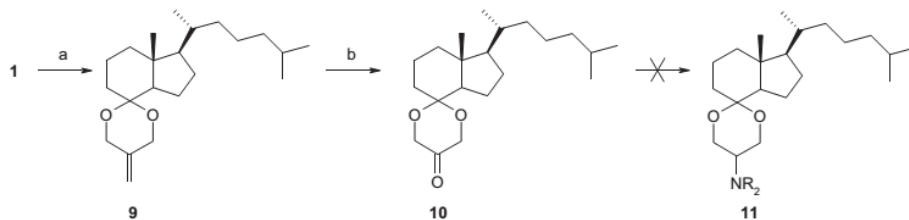
**Scheme 1.** Synthesis of the dioxolane **6**. (a) 1,2-Ethanediol,  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  (3 mol%),  $\text{HC}(\text{OMe})_3$ , acetonitrile, microwave irradiation (57%). Target structures **7** and **8**.

dioxane (**9**) in 37% yield. Ozonolysis of methylene compound **9** gave the 1,3-dioxan-5-one **10**, a formal dihydroxyacetone acetal of Grundmann's ketone, in poor yield (25%). The poor yields in both of these steps are most likely due to steric hindrance, since analogous conversions starting from cyclohexanone proceed in high yields [49]. Unfortunately, and despite broad variations of reagents and reaction conditions, we did not succeed in converting ketone **10** into corresponding 4-amino-1,3-dioxanes **11** (Scheme 2).

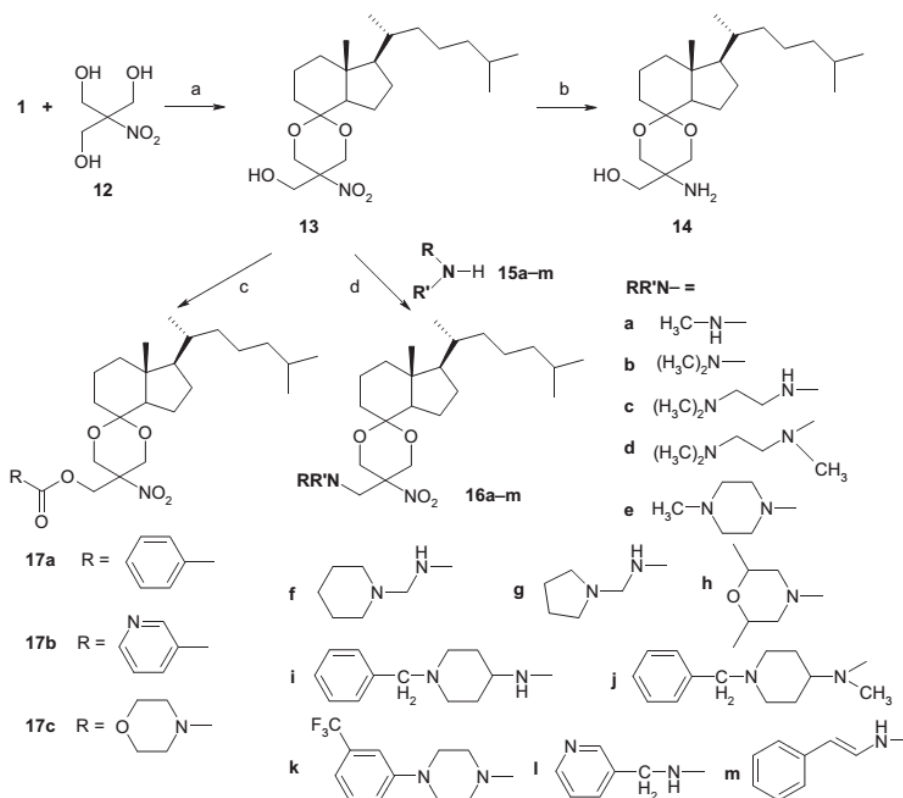
Eventually, we found that tris(hydroxymethyl)nitromethane (**12**) readily undergoes acetalization with ketone **1** under scandium(III) triflate catalysis to give the 5-hydroxymethyl-5-nitro-1,3-dioxane **13**.

Reduction of the nitro group should give a primary amine **14**, which upon *N*-alkylation should be a central building block for the preparation of a library of aminoacetals. To our surprise, first attempts to reduce the nitro group by transfer hydrogenation with ammonium formate, as previously described for related substrates with Raney nickel [50] or palladium catalysts [51], failed completely. Finally, hydrogenation with Raney nickel and hydrazine as the hydrogen transfer agent gave the desired primary amine **14** in 25% yield (Scheme 3). The poor yield in this reduction step as well as the expectable difficulties in functionalizations of this sterically hindered amine prevented us from further investigations on **14**.

But the 5-hydroxymethyl-5-nitro-1,3-dioxane **13** opened the opportunity to prepare a large collection of amino derivatives **16a–m** by direct displacement of the primary hydroxyl group with primary and secondary amines. As postulated by



**Scheme 2.** Approach through dihydroxyacetone acetal **10**: (a) 2-Methylene-1,3-diol,  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  (3 mol%),  $\text{HC}(\text{OMe})_3$ , acetonitrile, microwave irradiation (37%); (b)  $\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , pyridine,  $-78^\circ\text{C}$  (25%).



**Scheme 3.** Aminomethyl spiroacetals and related esters: (a)  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  (3 mol%),  $\text{HC}(\text{OMe})_3$ , acetonitrile, microwave irradiation (43%); (b) Raney nickel, hydrazine hydrate, EtOH,  $20^\circ\text{C}$  (25%); (c) acid chloride, pyridine,  $20^\circ\text{C}$  (35–41%); (d) amines **15a–m**, EtOH,  $70^\circ\text{C}$  (21–52%).

Malinowski [52], the hydroxyl group is activated by a hydrogen bond with the nitro group and therefore can be displaced by simply heating with appropriate amines. A large number of primary and secondary amines **15** (for structures see Scheme 3) were converted to the respective 5-amino-methyl-5-nitro-1,3-dioxanes **16** by heating in ethanol for 16 h in yields ranging from 21 to 52%. Amines containing more than one reactive group (1,2-ethanediamine, *N*-methyl-1,2-ethanediamine, 2-(aminomethyl)piperidine) did not give the desired products.

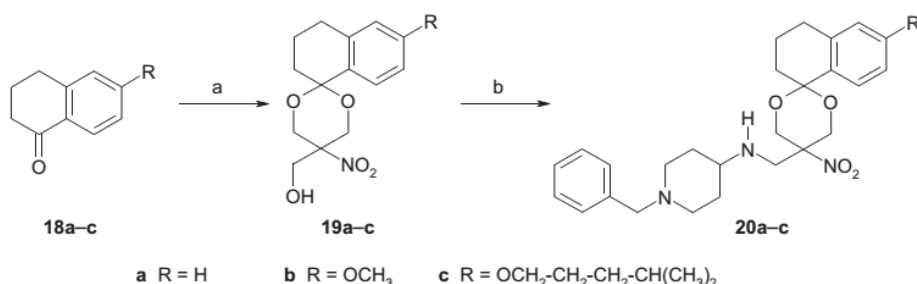
The primary hydroxyl group in 5-hydroxymethyl-5-nitro-1,3-dioxanes is accessible for esterification [52]; therefore, the benzoate (**17a**) and nicotinate esters (**17b**), as well as the morpholino carbamate (**17c**), were prepared using the respective acid chlorides and pyridine as a base (Scheme 3).

The results of the screenings on inhibition of cholesterol and ergosterol biosynthesis (see below) clearly demonstrated that the *N*-benzylpiperidin-4-ylamino derivative **16i** was the by far most active compound obtained so long. This prompted us to investigate the role of the perhydroindene scaffold derived from Grundmann's ketone (**1**), which had been introduced in order to get maximum mimicry of the rings C and D and the lipophilic side chain of the steroidal substrates of the enzymes. Obviously, our concept worked well, yielding **16i** as a promising lead structure, but the high costs for preparation of precursor **1** and the poor yields obtained in several conversions were disadvantageous. So we investigated whether Grundmann's ketone (**1**) can be replaced by other, cheaper and more reactive bicyclic ketones. Inspired by reports in the literature that tetralines can function as ring CD equivalents in steroidomimetics [27, 28], we prepared tetraline analogs of compound **16i** starting from appropriate 1-tetralones (**18a–c**) (Scheme 4). The acetalization of 1-tetralone (**18a**) with tris(hydroxymethyl)nitromethane (**12**) under the conditions described above (3 mol% scandium(III) triflate, acetonitrile, trimethyl orthoformate, microwave irradiation,

reflux) gave the desired spiroacetal **19a** in only 13% yield, so we examined other catalysts. Finally, we found that acetalization proceeds very well under solvent-free conditions by employing 1-tetralone (**18a**), four equivalents of tris(hydroxymethyl)nitromethane, one equivalent of triethyl orthoformate, and the catalyst tetrabutylammonium tribromide (1 mol%) [53] at room temperature for 48 h [54]. Aminolysis of the resulting 5-hydroxymethyl-5-nitro-1,3-dioxane **19a** with 4-amino-1-benzylpiperidine (**15i**) gave the tetraline-derived aminomethyl spiroacetal **20a** in poor yield. This product did not show the expected bioactivity, and we attributed this to the absence of an equivalent of the sterol side chain in this molecule. Hence, we prepared two analogs bearing readily introducible alkoxy residues at a geometrically proper ring position (C-6 of the 1-tetralone building block). The methoxy (**20b**) and the isohexyloxy derivatives were prepared in the same manner as **20a** from appropriate alkoxytetralones **18b** and **18c** (Scheme 4).

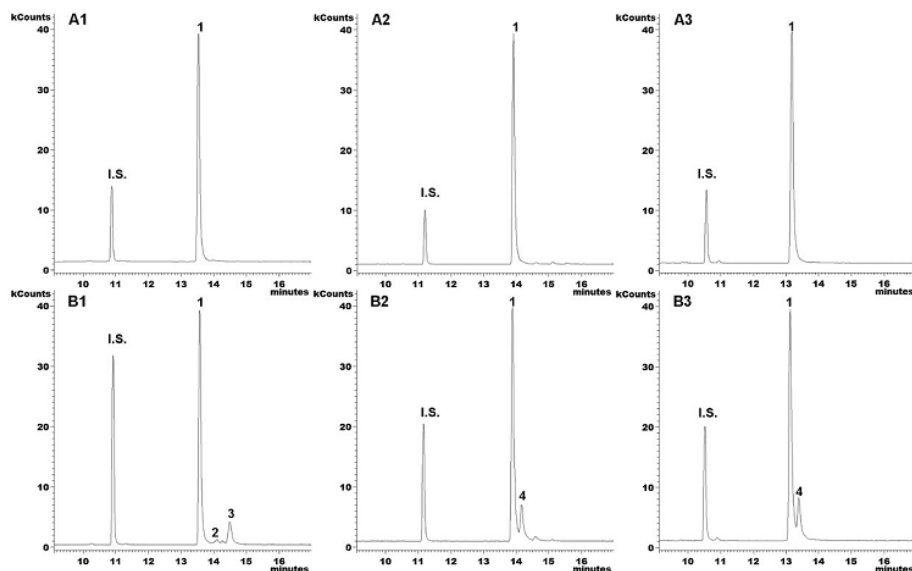
### Screenings

The compounds were subjected to our in-house cellular screening systems for the identification of target enzymes in the post-squalene part of cholesterol biosynthesis in the human leukemia cell line HL 60. Whereas untreated control cells contain cholesterol as the only detectable sterol (see upper row of chromatograms in Fig. 3), incubation with enzyme inhibitors leads to the accumulation of other sterols, which are identified by GC-MS. In this assay the compounds **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, esters **17a–c**, and **19a–c** were found to be completely inactive. In the series of the aminomethyl spiroacetals **16** derived from Grundmann's ketone, most of the compounds showed no effect, the (pyrrolidin-1-yl)ethylamino compound **16g** caused accumulation of several new sterols, indicating multienzyme inhibition, whereas with the homologous (piperidin-1-yl)ethylamino compound **16f** only cholesta-8-en-3 $\beta$ -ol (zymostenol), a substrate of human sterol



**Scheme 4.** Synthesis of the tetraline analogs of lead compound **16i**: (a) Bu<sub>4</sub>NBr<sub>3</sub> (1 mol%), HC(OEt)<sub>3</sub>, 20°C (50–89%); (b) **15i**, EtOH, 70°C (6–48%).





**Figure 3.** Extracted ion chromatograms of the accumulating sterols after treatment of HL 60 cells with inhibitors; A1–A3: blank sample analysis; B1–B3: samples treated with inhibitors; A1: control ( $m/z$  217, 368, 349, 351); B1: compound **20b** (50  $\mu$ M) ( $m/z$  217, 368, 349, 351); A2: control ( $m/z$  217, 368, 458); B2: compound **16i** (50  $\mu$ M) ( $m/z$  217, 368, 458); A3: control ( $m/z$  217, 368, 458); B3: compound **20c** (50  $\mu$ M) ( $m/z$  217, 368, 458); peaks: I.S. = cholestane (internal standard), **1** = cholesterol, **2** = cholesta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol (7-dehydrocholesterol), **3** = cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol, **4** = cholesta-8-en-3 $\beta$ -ol (zymostenol).

$\Delta$ 8,7-isomerase [36], accumulated. The same effect was found upon incubation with the diamines **16c**, **16i**, and **16j**. In the tetraline series ring-unsubstituted tetraline **20a** was completely inactive; the methoxy analog **20b** led to an accumulation of several sterols, among them cholesta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol and cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol (7-dehydrocholesterol), substrates of the enzymes 7-dehydrocholesterol reductase and  $\Delta$ 24-reductase. Incubation with compound **20c**, however, led to a significant accumulation of zymostenol, a clear indication for an inhibition of human sterol  $\Delta$ 8,7-isomerase (Table 1 and Fig. 3).

For the most active  $\Delta$ 8,7-isomerase inhibitors (identified by semiquantitative evaluation of the chromatograms) of this series we determined their effect on overall cholesterol biosynthesis in a cellular assay [42]. In this whole-cell assay HL 60 cells are incubated with various concentrations of test substances in the presence of 2- $^{13}$ C-acetate. Due to the incorporation of 4–7  $^{13}$ C atoms into cholesterol molecules biosynthesized during the incubation period, newly synthesized cholesterol can be distinguished from unlabeled matrix cholesterol that was present in the cells before incubation, by

GC-MS. From the dose-response curves obtained by determination of  $^{13}$ C-labeled cholesterol and after normalization to the protein content, the  $IC_{50}$  values describing the overall effects of the inhibitors on cholesterol biosynthesis in the cellular system are calculated (Table 1).

The *N*-benzylpiperidin-4-ylamino derivative **16i** was the most active ( $IC_{50}$  = 1.7  $\mu$ M) compound; its *N*-methyl analog **16j** ( $IC_{50}$  = 4.7  $\mu$ M) and the isohexyloxytetraline analog **20c** ( $IC_{50}$  = 4.5  $\mu$ M) were slightly less active.

Since in a routine agar diffusion assay for antimicrobial activities on dermatophytes, molds, and yeasts (data not shown here), none of the compounds described here showed notable antifungal activity, inhibition of ergosterol biosynthesis by these compounds was not probable. Nevertheless, the cholesterol biosynthesis inhibitors identified above were subjected to our in-house qualitative assay [43] for the identification of target enzymes in the post-squalene part of ergosterol biosynthesis in three different strains. All compounds were found to be completely inactive in this assay.

All compounds were further subjected to an MTT assay [55] for general cytotoxicity (Table 1). Cisplatin ( $IC_{50}$  = 5  $\mu$ M) was

**Table 1.** Results of the screening on inhibition of cholesterol biosynthesis and general cytotoxicity (MTT assay). All experiments were performed in triplicate.

Compound	Effect on cholesterol biosynthesis/target enzyme	IC <sub>50</sub> (μM) for inhibition of total cholesterol biosynthesis	Cytotoxicity in MTT assay, IC <sub>50</sub> (μM)
6	–		23
9	–		22
10	–		19
13	–		23
14	–		24
16a	–		18
16b	–		23
16c	$\Delta 8,7$ -Isomerase		16
16d	–		26
16e	–		11
16f	$\Delta 8,7$ -Isomerase		22
16g	Multienzyme inhibitor		17
16h	–		8
16i	$\Delta 8,7$ -Isomerase	1.7	13
16j	$\Delta 8,7$ -Isomerase	4.7	30
16k	–		>50
16l	–		14
16m	–		50
17a	–		28
17b	–		46
17c	–		20
19a	–		>50
19b	–		>50
19c	–		>50
20a	–		>50
20b	Multienzyme inhibitor		>50
20c	$\Delta 8,7$ -Isomerase	4.5	>50

used as a reference. None of the aminomethyl spiroacetals **16** derived from Grundmann's ketone showed strong cytotoxicity, most of them are very slightly cytotoxic (IC<sub>50</sub> = 10–20 μM); in contrast, the aminomethyl spiroacetals **20a–c** derived from tetralones are devoid of cytotoxicity.

## Discussion

We have worked out convenient protocols for the acetalization of Grundmann's ketone (**1**), and the spiroacetal **13** containing a 5-hydroxymethyl-5-nitro-1,3-dioxane moiety provides an easy access to esters (**17a–c**) and variably substituted aminomethyl spiroacetals **16**. Whereas the esters and compounds bearing monoamino residues (**16a,b,h,k,l,m**) are inactive in a cholesterol biosynthesis assay, diamino side-chains lead to significant effects. Depending on structural features that are not yet fully understood, the compounds are either multienzyme inhibitors in the post-squalene part of cholesterol biosynthesis (**16g**) or selective inhibitors of the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase.

A very promising structural element in these diamines are a secondary amino group next to the 1,3-dioxane ring; the corresponding *N*-methyl analogs are inactive (see **16c/16d**) or at least less active (see **16i/16j**). A distal *N*-benzyl residue leads to the by far most active inhibitors (**16i/16j**). Due to the very costly synthesis of the most active compound **16i** and its undesired slight cytotoxicity, we prepared steroidmimetic analogs **20a–c** of this compound in which the building block derived from expensive Grundmann's ketone (**1**) is replaced by a tetraline ring. The screening results of these compounds clearly indicate that it is not sufficient to introduce the tetraline ring as a steroid ring CD mimic, but the lipophilic side chain has to be covered as well. By this way we invented an easy-to-prepare isohexyloxytetraline-derived analog of compound **16i**, which is a potent inhibitor of the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase as well (IC<sub>50</sub> = 4.5 vs. 1.7 μM) and fortunately free of cytotoxicity.

In contrast to the inhibitors derived from Grundmann's ketone (**1**), the tetraline-type inhibitor **20c** can be prepared from an inexpensive precursor in a few steps, and being a solid, it has better physicochemical properties and stability. Most importantly, the tetralone building block offers the opportunity to perform a broad range of structural modifications for further optimization, whereas the hydrocarbon parts of Grundmann's ketone (representing rings C and D and the side chain of the sterols) are not suitable substrates for chemical modifications.

Work is in progress to further optimize the enzyme inhibitors described here.

## Experimental

### Materials and methods

IR-spectra: FT-IR Paragon 1000, Perkin-Elmer (Wellesley, USA); MS: 5989 A MS-Engine, Hewlett Packard (Agilent Technologies, Palo Alto, USA); electron ionization (EI) 70 eV, chemical ionization (CI) with CH<sub>4</sub> (300 eV); HR-MS: GC/MS system JMS-GCmate II, Jeol (Peabody, USA); NMR: Jeol GSX 400 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz) (Peabody, USA); melting points: Büchi Melting Point B-540 (Flawil, Switzerland); flash column chromatography (FCC): silica gel 60 (230–400 mesh, E. Merck, Darmstadt, Germany); optical rotation: Polarimeter 241 MC (Perkin Elmer; Waltham, USA); microwave reactor: Discovery (CEM, Matthews, USA); ozone generator: Ozonova Typ OG700-10WC (Jeske Ozontechnik, Rudersberg, Germany).

### Chemistry

#### General Procedure 1: Scandium(III) triflate-catalyzed acetalization of ketones **1** and **18a–c**

To a solution of the ketone (1.0 equiv.) and the required diol (2.0 equiv.) dissolved in acetonitrile (2 mL per mmol ketone), scandium(III) triflate (3 mol%) and trimethyl orthoformate (2.0 equiv.) are added, and the mixture is refluxed for 2 h under microwave irradiation (*P* = 80 W). Then sodium carbonate

solution (10%; 4 mL per mmol ketone) is added and the mixture is extracted with dichloromethane (3 × 2 mL per mmol ketone). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified by FCC (isohexane/ethyl acetate mixtures).

**General Procedure 2: Tetrabutylammonium tribromide-catalyzed acetalization of ketones 1 and 18a–c**

A mixture of the ketone (1.0 equiv.), tris(hydroxymethyl)nitromethane (12, 4.0 equiv.), triethyl orthoformate (1.0 equiv.), and tetrabutylammonium tribromide (1 mol%) is stirred at room temp. for 48 h. Then sodium carbonate solution (10%; 10 mL per mmol ketone) is added and the mixture is extracted with dichloromethane (3 × 10 mL per mmol ketone). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified using the protocol described for the particular product below.

**General Procedure 3: Conversion of hydroxymethylacetals 13 and 19a–c to aminomethylacetals 16a–m and 20a–c**

A solution of the hydroxymethylacetal (1.0 equiv.) and the required primary or secondary amine (3 equiv. unless stated otherwise) in anhydrous ethanol (1 mL per mmol hydroxymethylacetal) is heated in a closed vessel at 70 °C for 16 h. After cooling to room temperature the mixture is poured into sodium carbonate solution (10%; 20 mL per mmol hydroxymethylacetal) and extracted with dichloromethane (3 × 20 mL per mmol hydroxymethylacetal). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified by FCC using an appropriate eluent.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-spiro[1,3-dioxolane-2,4'-octahydroindene] (6)**

Prepared following General Procedure 1 from 104 mg (0.40 mmol) Grundmann's ketone (1) and 1,2-ethanediol. Eluent: isohexane/ethyl acetate 98:2.

Yield: 72 mg (57%); colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ (ppm) = 3.94–3.87 (m, 4H, 4-H, 5-H), 1.90–1.78 (m, 1H, 3a'-H), 1.71–1.10 (m, 19H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.98 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.86 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ (ppm) = 111.38 (spiro-C), 64.58 (C-4), 63.91 (C-5), 54.99 (C-1'), 51.42 (C-3a'), 45.10 (C-7a'), 39.49 (C-5'), 35.88 (C-6'), 34.96 (C-7'), 34.49 (C-1''), 32.17 (C-5''), 28.01 (C-2'), 27.13 (C-3'), 24.91 (C-3''), 24.36 (C-2''), 22.99 (C-6''), 22.79 (C-7a'-CH<sub>3</sub>), 22.56 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.66 (1''-CH<sub>3</sub>), 19.38 (C-4''); MS (CI): m/z (%) = 309 (100, M<sup>+</sup> + 1), 265 (16); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film) ν (cm<sup>-1</sup>): 2952, 2871, 1467, 1381, 1336, 1146, 1057, 928; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 36.5 (c = 0.014, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>: 308.2715. Found: 308.2719.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-5-methylene-1'-(1,5-dimethylhexyl)-spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (9)**

Prepared following General Procedure 1 from 250 mg (0.950 mmol) Grundmann's ketone (1) and 2-methylene-1,3-propanediol. Eluent: isohexane/ethyl acetate 96:4.

Yield: 117 mg (37%); colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm): 4.82 (2d, 2H, J = 2.4, 2.4 Hz, 5-CH<sub>2</sub>), 4.32–4.24 (m, 4H, 4-H, 6-H), 2.13 (t, 1H, J = 8.9 Hz, 3a'-H), 1.83–1.33 (m, 15H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 7'-H, 1''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.18 (m, 4H, 6'-H, 2''-H), 1.04 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR

(100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) = 141.73 (spiro-C), 107.35 (5-CH<sub>2</sub>), 100.76 (C-5), 63.16 (C-4), 63.12 (C-6), 55.13 (C-1'), 50.88 (C-3a'), 44.52 (C-7a'), 39.51 (C-5'), 36.94 (C-6'), 33.99 (C-1''), 33.84 (C-7'), 28.46 (C-2'), 28.14 (C-5''), 25.79 (C-3'), 25.27 (C-3''), 25.03 (C-2''), 22.57 (C-6''), 22.39 (7a'-CH<sub>3</sub>), 21.54 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.66 (1''-CH<sub>3</sub>), 18.92 (C-4''); MS (CI): m/z (%) = 335 (100, M<sup>+</sup> + 1), 247 (20); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film) ν (cm<sup>-1</sup>): 2954, 1674, 1467, 1367, 1367, 1092, 901; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 74.5 (c = 0.010, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>: 334.2872. Found: 334.2879.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene]-5-one (10)**

A solution of 1.66 g (4.93 mmol) of the methylene acetal 9 in 3 mL dichloromethane and 1 mL pyridine is cooled to –78 °C and ozone (flow: 25 L h<sup>-1</sup>) is bubbled through the stirred solution until a blue color persists (about 10 min). Then sodium carbonate solution (10%; 20 mL) is added and the mixture is extracted with dichloromethane (3 × 30 mL). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified by FCC (isohexane/ethyl acetate 98:2).

Yield: 617 mg (37%); colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) = 4.29–4.05 (m, 4H, 4-H, 6-H), 2.11–2.07 (m, 1H, 3a'-H), 1.94–1.25 (m, 19H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.08 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.86 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) = 208.96 (C-5), 103.03 (spiro-C), 67.05 (C-4), 67.03 (C-6), 56.91 (C-1'), 51.48 (C-3a'), 45.02 (C-7a'), 39.99 (C-5'), 37.43 (C-6'), 34.25 (C-1''), 33.99 (C-7'), 28.63 (C-2'), 28.30 (C-5''), 27.30 (C-3'), 25.85 (C-3''), 25.05 (C-2''), 23.05 (C-6''), 22.87 (7a'-CH<sub>3</sub>), 21.75 (5''-CH<sub>3</sub>), 20.19 (1''-CH<sub>3</sub>), 19.63 (C-4''); MS (CI): m/z (%) = 337 (82, M<sup>+</sup> + 1), 247 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film) ν (cm<sup>-1</sup>): 2954, 1801, 1749, 1709, 1467, 1375, 1235, 1095, 929; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 73.8 (c = 0.016, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>: 336.2665. Found: 336.2664.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-5-Hydroxymethyl-7a'-methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (13)**

- Prepared following General Procedure 1 from 6.83 g (25.8 mmol) Grundmann's ketone (1) and tris(hydroxymethyl)nitromethane. Eluent: isohexane/ethyl acetate 8:2. Yield: 4.36 g (43%); light brown oil.
- Prepared following General Procedure 2 from 1.65 g (6.23 mmol) Grundmann's ketone (1) and tris(hydroxymethyl)nitromethane. Yield: 854 mg (34%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) = 4.41 (d, 1H, J = 12.9 Hz) and 4.38 (d, 1H, J = 12.8 Hz) (4-H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.03 (d, 1H, J = 12.8 Hz) and 3.98 (d, 1H, J = 13.0 Hz) (4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.95 (s, 2H, 1'''-H), 2.19 (s, 1H, 1'''-OH), 1.99–1.96 (m, 1H, 3a'-H), 1.88–1.78 (m, 2H, 5'-H), 1.59–1.49 (m, 9H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H), 1.34–1.29 (m, 3H, 1''-H, 2''-H), 1.24–1.12 (m, 5H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.97 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.86–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) = 101.89 (spiro-C), 86.79 (C-5), 63.73 (C-1'''), 60.85 (C-6), 60.55 (C-4), 53.63 (C-1'), 51.59 (C-3a'), 44.54 (C-7a'), 39.40 (C-5'), 36.43 (C-6'), 34.38 (C-7'), 34.21 (C-1''), 28.07 (C-5''), 27.69 (C-2') 26.06 (C-3'), 25.05 (C-3''), 24.89 (C-2''), 22.53 (C-6''), 22.38 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.10 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.57 (1''-CH<sub>3</sub>), 18.65 (C-4''); MS (CI): m/z (%) = 398 (14, M<sup>+</sup> + 1), 247 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film) ν (cm<sup>-1</sup>): 2956, 1710, 1550, 1469, 1348, 1262, 1216, 1115, 1062, 758; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 38.7 (c = 0.012, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub>: 397.2828. Found: 397.2825.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-5-Amino-5-hydroxymethyl-7a'-methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (14)**

To freshly prepared Raney nickel (prepared from 2.5 g Ni-Al alloy, 3.1 g sodium hydroxide and 12 mL water at 70 °C for 2 h, then washed with 3 × 40 mL water and with 4 × 50 mL ethanol) a solution of 750 mg (1.89 mmol) nitro compound **13** in 15 mL EtOH is added with stirring, followed by 5.2 mL (103 mmol) hydrazine hydrate. The suspension is stirred at room temperature for 16 h and then filtered through celite. The filtrate is evaporated and the residue purified by FCC (isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1).

Yield: 170 mg (25%); brown oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm): 4.42 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz) and 4.40 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{eq}}$ , 6- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 4.04 (d, 1H,  $J = 13.0$  Hz) and 3.99 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{ax}}$ , 6- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 3.95 (s, 2H, 1''-H), 1.98 (t, 1H,  $J = 8.1$  Hz, 3a'-H), 1.83 (m, 1H, 3'-H), 1.63–1.08 (m, 18H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.99 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 102.40 (spiro-C), 87.31 (C-5), 64.20 (C-1'''), 61.35 (C-6), 61.05 (C-4), 54.09 (C-1'), 52.16 (C-3a'), 45.04 (C-7a'), 39.90 (C-5'), 36.93 (C-6'), 34.90 (C-7'), 34.72 (C-1''), 28.56 (C-5''), 28.16 (C-2'), 26.60 (C-3'), 25.54 (C-3''), 25.37 (C-2''), 23.04 (C-6''), 22.89 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.63 (5''-CH<sub>3</sub>), 20.07 (1''-CH<sub>3</sub>), 19.14 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 368 (60,  $\text{M}^+ + 1$ ), 247 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1546, 1466, 1366, 1339, 1118, 1026, 757;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 45.7$  ( $c = 0.012$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NO}_3$ : 367.3086. Found: 367.3099.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-5-(N-methylamino)-methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16a)**

Prepared following General Procedure 3 from 571 mg (1.44 mmol) **13** and 2.00 mL of an ethanolic methylamine solution (33%). Eluent: isohexane/ethyl acetate 7:3.

Yield: 183 mg (32%); brown oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.46–4.42 (m, 2H, 4- $\text{H}_{\text{eq}}$ , 6- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 4.01 (d, 1H,  $J = 13.1$  Hz) and 3.96 (d, 1H,  $J = 13.0$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{ax}}$ , 6- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 2.90 (s, 2H, 1''-H), 2.36 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.00–1.94 (m, 1H, 3a'-H), 1.80–1.75 (m, 2H, 3'-H), 1.58–1.48 (m, 8H, 2'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H), 1.34–1.13 (m, 9H, 1'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.95 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.87–0.85 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 102.12 (spiro-C), 87.49 (C-5), 62.60 (C-6), 62.35 (C-4), 55.04 (C-1'''), 54.27 (C-1'), 53.04 (C-3a'), 45.08 (C-7a'), 39.91 (C-5'), 37.50 (N-CH<sub>3</sub>), 36.76 (C-6'), 35.22 (C-7'), 34.92 (C-1''), 28.58 (C-5''), 27.22 (C-2'), 27.09 (C-3'), 25.45 (C-3''), 24.80 (C-2''), 23.14 (C-6''), 23.03 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.87 (5''-CH<sub>3</sub>), 20.02 (1''-CH<sub>3</sub>), 19.07 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 411 (100,  $\text{M}^+ + 1$ ), 147 (40); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1548, 1468, 1468, 1366, 1336, 1118, 1092, 758;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 43.5$  ( $c = 0.011$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_4$ : 410.3144. Found: 410.3205.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-5-(N,N-dimethylaminomethyl)-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16b)**

Prepared following General Procedure 3 from 1.00 g (2.52 mmol) **13**, 0.300 g (3.73 mmol) dimethylamine hydrochloride, and 0.5 mL triethylamine. Eluent: isohexane/ethyl acetate 8:2.

Yield: 245 mg (23%); yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm): 4.40 (2d, 2H,  $J = 13.0$  Hz, 12.9 Hz, 4- $\text{H}_{\text{eq}}$ , 6- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 4.00 (d, 1H,  $J = 13.0$  Hz) and 3.96 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{ax}}$ , 6- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 2.71 (s, 2H, 1''-H), 2.20 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.99–1.93 (m, 1H, 3a'-H), 1.77–1.75 (m, 2H, 5'-H), 1.56–1.12 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H,

3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.94 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.86–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 101.93 (spiro-C), 87.16 (C-5), 62.79 (C-6), 62.63 (C-4), 62.38 (C-1'''), 53.01 (C-1'), 52.99 (C-3a'), 47.89 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.07 (C-7a'), 39.89 (C-5'), 36.76 (C-6'), 35.23 (C-7'), 34.99 (C-1''), 34.90 (C-5''), 28.57 (C-2'), 27.25 (C-3'), 25.44 (C-2''), 24.75 (C-3''), 23.12 (7a'-CH<sub>3</sub>), 23.05 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.86 (C-6''), 20.02 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.07 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 495 (12,  $\text{M}^+ + 1$ ), 128 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1549, 1457, 1373, 1332, 1143, 1080, 758;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 40.1$  ( $c = 0.011$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$ : 424.3301. Found: 424.3299.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-5-[N-(N,N-dimethylaminoeth-2-yl)-aminomethyl]-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16c)**

Prepared following General Procedure 3 from 700 mg (1.76 mmol) **13** and N,N-dimethylethylenediamine (**15c**). Eluent: dichloromethane/methanol 95:5.

Yield: 175 mg (21%); yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.41 (d, 1H,  $J = 12.3$  Hz) and 4.33 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{eq}}$ , 6- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 4.02 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz) and 3.98 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{ax}}$ , 6- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 3.06 (s, 2H, 1''-H), 2.61 (t, 2H,  $J = 5.8$  Hz, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.31 (t, 2H,  $J = 5.8$  Hz, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.21 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz, 3a'-H), 2.18 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.86–1.69 (m, 2H, 5'-H), 1.67–1.06 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.03 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.89–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 101.49 (spiro-C), 86.63 (C-5), 61.86 (C-6), 61.80 (C-4), 58.75 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 55.10 (C-1'), 52.65 (C-1'''), 48.46 (C-3a'), 47.89 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 45.23 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 44.45 (C-7a'), 39.54 (C-5'), 36.80 (C-6'), 34.00 (C-1''), 33.98 (C-7'), 29.54 (C-2'), 28.08 (C-5''), 25.87 (C-3'), 25.18 (C-2'', C-3''), 22.60 (C-6''), 22.52 (1''-CH<sub>3</sub>), 21.43 (7a'-CH<sub>3</sub>), 19.69 (5''-CH<sub>3</sub>), 18.68 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 468 ( $\text{M}^+ + 1$ , 56), 101 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 1547, 1467, 1366, 1338, 1216, 1115, 1034, 757;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 40.2$  ( $c = 0.013$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_4$ : 467.3723. Found: 467.3730.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-5-[N-(N,N-dimethylaminoeth-2-yl)-N-methylaminomethyl]-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16d)**

Prepared following General Procedure 3 from 1.00 g (2.52 mmol) **13** and N,N,N'-trimethylethylenediamine (**15d**). Eluent: isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1.

Yield: 331 mg (27%); colorless oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm): 4.32 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz) and 4.26 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz) (4- $\text{H}_{\text{eq}}$ , 6- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 4.03 (2d, 2H,  $J = 12.6$  Hz, 12.4 Hz, 4- $\text{H}_{\text{ax}}$ , 6- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 2.97 (s, 2H, 1''-H), 2.54–2.43 (m, 2H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.28 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.15 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.13–2.09 (m, 1H, 3a'-H), 1.82–1.76 (m, 2H, 5'-H), 1.65–1.08 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.01 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 101.82 (spiro-C), 86.26 (C-5), 62.23 (C-1'''), 61.97 (C-6), 61.72 (C-4), 58.26 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 58.01 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 54.93 (C-1'), 53.94 (C-3a'), 50.02 (C-7a'), 46.16 (N-CH<sub>3</sub>), 45.05 (N-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 45.00 (N-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 40.15 (C-5'), 37.16 (C-6'), 34.77 (C-1''), 34.63 (C-7'), 29.58 (C-2'), 28.63 (C-5''), 26.06 (C-2''), 26.03 (C-3''), 25.67 (C-3'), 23.14 (C-6''), 23.02 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.23 (7a'-CH<sub>3</sub>), 20.17 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.12 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 482 (16,  $\text{M}^+ + 1$ ), 115 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2953, 1546, 1464, 1366, 1337, 1117, 1030, 756;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 27.8$  ( $c = 0.016$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_4$ : 481.3880. Found: 481.3863.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16e)**

Prepared following General Procedure 3 from 460 mg (1.16 mmol) **13** and 1-methylpiperazine (**15e**). Eluent: isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1.

Yield: 215 mg (39%); yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.35 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz) and 4.28 (d, 1H,  $J = 10.7$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{eq}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{eq}}$ ), 4.02 (d, 1H,  $J = 9.7$  Hz) and 3.99 (d, 1H,  $J = 9.4$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{ax}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{ax}}$ ), 2.93–2.86 (m, 2H,  $1'''\text{-H}$ ), 2.49 (t, 4H,  $J = 4.8$  Hz, piperazine-2-H, piperazine-6-H), 2.32 (s, 4H, piperazine-3-H, piperazine-5-H), 2.19 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.12 (t, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $3\text{-a}'\text{-H}$ ), 1.85–1.79 (m, 2H,  $5'\text{-H}$ ), 1.57–1.11 (m, 17H,  $1'\text{-H}$ ,  $2'\text{-H}$ ,  $3'\text{-H}$ ,  $6'\text{-H}$ ,  $7'\text{-H}$ ,  $1''\text{-H}$ ,  $2''\text{-H}$ ,  $3''\text{-H}$ ,  $4''\text{-H}$ ,  $5''\text{-H}$ ), 1.02 (s, 3H,  $7\text{-a}'\text{-CH}_3$ ), 0.90–0.87 (m, 9H,  $1''\text{-CH}_3$ ,  $6''\text{-H}$ ,  $5''\text{-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 101.94 (spiro-C), 86.24 (C-5), 62.29 (C-6), 62.13 (C-4), 60.93 (C-1'''), 55.77 (piperazine-C-3, piperazine-C-5), 55.39 (piperazine-C-2, piperazine-C-6), 54.75 (C-1'), 50.03 (C-3a'), 46.30 (N-CH<sub>3</sub>), 45.03 (C-7a'), 40.09 (C-5'), 37.13 (C-6'), 34.80 (C-7'), 34.61 (C-1''), 29.73 (C-5''), 28.62 (C-2'), 26.24 (C-3'), 25.52 (C-2''), 23.09 (C-3''), 23.01 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.26 (1''-CH<sub>3</sub>), 20.14 (C-6''), 20.14 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.10 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 480 (12,  $\text{M}^+ + 1$ ), 113 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2962, 1540, 1456, 1261, 1166, 1097, 1016, 800;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 32.7$  ( $c = 0.015$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_4$ : 479.3723. Found: 479.3725.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitro-5-[[2-(piperidin-1-yl)ethyl]aminomethyl]spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16f)**

Prepared following General Procedure 3 from 500 mg (1.26 mmol) **13** and 1-(2-aminoethyl)piperidine (**15f**). Eluent: isohexane/ethyl acetate 7:3.

Yield: 136 mg (21%); yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.41 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz) and 4.34 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{eq}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{eq}}$ ), 4.02 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz) and 3.99 (d, 1H,  $J = 12.4$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{ax}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{ax}}$ ), 3.28 (s, 2H, piperidine-2-H, piperidine-6-H), 3.13 (d, 2H,  $J = 4.3$  Hz,  $1'''\text{-H}$ ), 2.85 (t, 2H,  $J = 6.5$  Hz, piperidine-CH<sub>2</sub>), 2.63 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz, piperidine-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.27 (s, 2H, piperidine-2-H, piperidine-6-H), 2.20 (dd, 1H,  $J = 4.8$  Hz, 8.3 Hz,  $3\text{-a}'\text{-H}$ ), 1.84–1.80 (m, 2H,  $5'$ ), 1.61–1.15 (m, 26H,  $1'\text{-H}$ ,  $2'\text{-H}$ ,  $3'\text{-H}$ ,  $6'\text{-H}$ ,  $7'\text{-H}$ ,  $1''\text{-H}$ ,  $2''\text{-H}$ ,  $3''\text{-H}$ ,  $4''\text{-H}$ ,  $5''\text{-H}$ , piperidine-3-H, piperidine-4-H, piperidine-5-H), 1.02 (s, 3H,  $7\text{-a}'\text{-CH}_3$ ), 0.88–0.86 (m, 9H,  $1''\text{-CH}_3$ ,  $6''\text{-H}$ ,  $5''\text{-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 102.06 (spiro-C), 87.24 (C-5), 62.43 (C-6), 62.32 (C-4), 58.64 (C-1'''), 55.63 (piperidine-CH<sub>2</sub>), 55.14 (C-1'), 53.17 (piperidine-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 48.85 (C-3a'), 47.73 (C-7a'), 44.96 (C-5'), 40.03 (C-6'), 37.28 (C-1''), 34.50 (C-7'), 34.47 (C-5''), 30.14 (C-2'), 28.60 (piperidine-C-2), 28.58 (piperidine-C-6), 26.62 (C-3'), 26.38 (piperidine-C-3), 26.21 (piperidine-C-5), 25.69 (piperidine-C-4), 25.68 (C-2''), 25.01 (C-3''), 24.28 (7a'-CH<sub>3</sub>), 23.05 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.96 (C-6''), 21.88 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.18 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 508 (22,  $\text{M}^+ + 1$ ), 141 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2933, 1547, 1466, 1366, 1348, 1117, 1041, 756;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 30.4$  ( $c = 0.007$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_4$ : 508.4114. Found: 508.4112.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitro-5-[[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]aminomethyl]spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16g)**

Prepared following General Procedure 3 from 854 mg (2.15 mmol) **13** and 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine (**15g**). Eluent: isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1.

Yield: 253 mg (26%); yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.41 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz) and 4.33 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{eq}}$ ,

$6\text{-H}_{\text{eq}}$ ), 4.02 (d, 1H,  $J = 13.1$  Hz) and 3.98 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{ax}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{ax}}$ ), 3.05 (s, 2H,  $1'''\text{-H}$ ), 2.64 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz, pyrrolidine-CH<sub>2</sub>), 2.48 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz, pyrrolidine-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.46–2.39 (m, 4H, pyrrolidine-2-H, pyrrolidine-5-H), 2.19 (t, 1H,  $J = 8.8$  Hz,  $3\text{-a}'\text{-H}$ ), 1.87–1.76 (m, 1H,  $1'\text{-H}$ ), 1.69–1.76 (m, 4H, pyrrolidine-3-H, pyrrolidine-4-H), 1.61–1.10 (m, 18H,  $2'\text{-H}$ ,  $3'\text{-H}$ ,  $5'\text{-H}$ ,  $6'\text{-H}$ ,  $7'\text{-H}$ ,  $1''\text{-H}$ ,  $2''\text{-H}$ ,  $3''\text{-H}$ ,  $4''\text{-H}$ ,  $5''\text{-H}$ ), 1.02 (s, 3H,  $7\text{-a}'\text{-CH}_3$ ), 0.87–0.84 (m, 9H,  $1''\text{-CH}_3$ ,  $6''\text{-H}$ ,  $5''\text{-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 101.52 (spiro-C), 86.69 (C-5), 61.89 (C-6), 61.79 (C-4), 55.52 (pyrrolidine-CH<sub>2</sub>), 55.09 (C-1'), 54.05 (pyrrolidine-C-2), 54.04 (pyrrolidine-C-5), 52.67 (C-1'''), 49.23 (pyrrolidine-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 48.35 (C-3a'), 44.46 (C-7a'), 39.53 (C-5'), 36.77 (C-6'), 33.97 (C-1'', C-7'), 29.62 (C-2'), 28.09 (C-5''), 28.09 (C-2''), 25.86 (C-3'), 25.19 (pyrrolidine-C-3), 25.15 (pyrrolidine-C-5), 23.52 (C-3''), 22.56 (C-6''), 22.48 (1''-CH<sub>3</sub>), 21.37 (7a'-CH<sub>3</sub>), 19.65 (5''-CH<sub>3</sub>), 18.67 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 494 (32,  $\text{M}^+ + 1$ ), 127 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2956, 1547, 1466, 1366, 1348, 1215, 1140, 1117, 757;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 38.3$  ( $c = 0.016$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_4$ : 493.3880. Found: 493.3903.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-(2,6-dimethylmorpholin-4-yl)-methyl-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16h)**

Prepared following General Procedure 3 from 1.00 g (2.52 mmol) **13** and 2,6-dimethylmorpholine (**15h**). Eluent: isohexane/ethyl acetate 95:5.

Yield: 215 mg (28%); colorless oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.39 (d, 2H,  $J = 12.8$  Hz), ( $4\text{-H}_{\text{eq}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{eq}}$ ), 4.00 (d, 1H,  $J = 13.1$  Hz) and 3.96 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{ax}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{ax}}$ ), 3.58–3.50 (m, 2H, morpholine-2-H, morpholine-6-H), 2.76 (s, 2H,  $1'''\text{-H}$ ), 2.46 (m, 2H, morpholine-3-H, morpholine-5-H), 1.98–1.94 (m, 3H,  $3\text{-a}'\text{-H}$ , morpholine-3-H, morpholine-5-H), 1.86–1.75 (m, 2H,  $5'\text{-H}$ ), 1.55–1.13 (m, 17H,  $1'\text{-H}$ ,  $2'\text{-H}$ ,  $3'\text{-H}$ ,  $6'\text{-H}$ ,  $7'\text{-H}$ ,  $1''\text{-H}$ ,  $2''\text{-H}$ ,  $3''\text{-H}$ ,  $4''\text{-H}$ ,  $5''\text{-H}$ ), 1.04 (d, 6H,  $J = 6.3$  Hz, morpholine-2-CH<sub>3</sub>, morpholine-6-CH<sub>3</sub>), 0.96 (s, 3H,  $7\text{-a}'\text{-CH}_3$ ), 0.87–0.85 (m, 9H,  $1''\text{-CH}_3$ ,  $6''\text{-H}$ ,  $5''\text{-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 101.44 (spiro-C), 86.17 (C-5), 71.65 (morpholine-C-2), 71.64 (morpholine-C-6), 62.10 (C-6), 61.73 (C-4), 60.92 (morpholine-C-3), 60.90 (morpholine-C-5), 60.54 (C-1'''), 52.99 (C-1'), 52.74 (C-3a'), 44.56 (C-7a'), 39.40 (C-5'), 36.32 (C-4'), 34.69 (C-7'), 34.39 (C-1''), 30.12 (C-5''), 28.06 (C-2'), 26.63 (C-3'), 24.99 (C-2''), 24.38 (C-3''), 22.58 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.53 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.41 (C-6''), 19.57 (5''-CH<sub>3</sub>), 18.71 (morpholine-2-CH<sub>3</sub>, morpholine-6-CH<sub>3</sub>), 18.61 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 425 (100,  $\text{M}^+ + 1$ ), 114 (6); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3417, 2953, 1722, 1550, 1466, 1366, 1336, 1261, 1112, 1047, 802;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 37.9$  ( $c = 0.011$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); HRMS: calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_5$ : 494.3720. Found: 494.3726.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-5-(N-Benzylpiperidin-4-yl)-aminomethyl-7a'-methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16i)**

Prepared following General Procedure 3 from 500 mg (1.26 mmol) **13** and 4-amino-1-benzylpiperidine (**15i**). Eluent: isohexane/ethyl acetate 7:3.

Yield: 190 mg (26%); yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.31–7.29 (m, 4H, phenyl-2-H, phenyl-3-H, phenyl-5-H, phenyl-6-H), 7.26–7.21 (m, 1H, phenyl-4-H), 4.40 (d, 1H,  $J = 10.1$  Hz) and 4.32 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{eq}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{eq}}$ ), 4.03 (d, 1H,  $J = 10.2$  Hz) and 3.99 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz) ( $4\text{-H}_{\text{ax}}$ ,  $6\text{-H}_{\text{ax}}$ ), 3.46 (s, 2H,  $1'''\text{-H}$ ), 3.10 (s, 2H, phenyl-CH<sub>2</sub>), 2.79 (d, 2H,  $J = 9.3$  Hz, piperidine-2-H, piperidine-6-H), 2.40–2.35 (m, 1H, piperidine-4-H), 2.17 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz,  $3\text{-a}'\text{-H}$ ), 1.99 (t, 2H,  $J = 8.7$ , piperidine-2-H, piperidine-6-H),

1.67–1.52 (m, 4H, piperidine-3-H, piperidine-5H), 1.64–1.12 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.04 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.91–0.87 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 139.36 (phenyl-C-1), 129.59 (phenyl-C-2, phenyl-C-6), 128.64 (phenyl-C-3, phenyl-C-5), 127.41 (phenyl-C-4), 102.06 (spiro-C), 87.11 (C-5), 63.43 (C-1'''), 62.31 (C-6), 62.23 (C-4), 55.95 (piperidine-C-4), 55.35 (C-1'), 52.77 (piperidine-C-2, piperidine-C-6), 49.99 (phenyl-CH<sub>2</sub>), 49.25 (C-3a'), 45.01 (C-7a'), 40.08 (C-5'), 37.17 (C-6'), 34.49 (C-1''), 32.51 (piperidine-C-5), 30.28 (C-7'), 29.94 (piperidine-C-3), 29.56 (C-5''), 28.56 (C-2'), 26.24 (C-3'), 23.08 (C-2''), 22.89 (C-3''), 20.12 (7a'-CH<sub>3</sub>), 19.16 (1''-CH<sub>3</sub>), 17.88 (C-6''), 17.86 (5''-CH<sub>3</sub>), 15.06 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 570 (16, M<sup>+</sup>+1), 203 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2952, 1546, 1467, 1366, 1340, 1113, 1026, 757, 698;  $[\alpha]_D^{20}$  = 36.0 ( $c$  = 0.012, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 569.4193. Found: 569.4200.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-5-(N-Benzylpiperidin-4-yl)-N-methylaminomethyl-7a'-methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16j)**

Prepared following General Procedure 3 from 1.00 g (2.52 mmol) **13** and 1-benzyl-4-(N-methylamino)piperidine (**15j**). Eluent: isohexane/ethyl acetate/triethylamine 8:2:0.1.

Yield: 248 mg (26%); yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.31–7.28 (m, 4H, phenyl-2-H, phenyl-3-H, phenyl-5-H, phenyl-6-H), 7.25–7.21 (m, 1H, phenyl-4-H), 4.41 (d, 2H,  $J$  = 12.8 Hz, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.01 (d, 1H,  $J$  = 13.1 Hz) and 3.97 (d, 1H,  $J$  = 12.9 Hz) (4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.44 (s, 2H, 1'''-H), 2.89 (d, 2H,  $J$  = 11.5 Hz, piperidine-2-H, piperidine-6-H), 2.85 (s, 2H, 2-H, phenyl-CH<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.19 (t, 1H,  $J$  = 7.0 Hz, 3a'-H), 2.03–1.96 (m, 1H, piperidine-4-H), 1.89 (t, 2H,  $J$  = 10.8 Hz, piperidine-2-H, piperidine-6-H), 1.79–1.78 (m, 2H, 3'-H), 1.62–1.12 (m, 23H, piperidine-3-H, piperidine-5H, 1'-H, 2'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.96 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.86 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 139.43 (phenyl-C-1), 129.55 (phenyl-C-2, phenyl-C-6), 128.66 (phenyl-C-3, phenyl-C-5), 127.43 (phenyl-C-4), 101.80 (spiro-C), 87.41 (C-5), 63.81 (C-1'''), 63.37 (N-CH<sub>3</sub>), 62.62 (C-6), 62.30 (C-4), 58.25 (piperidine-C-4), 53.79 (C-1'), 52.90 (piperidine-C-2, piperidine-C-6), 45.08 (phenyl-CH<sub>2</sub>), 40.30 (C-3a'), 39.91 (C-7a'), 36.79 (C-5'), 35.30 (C-6'), 34.96 (C-1''), 28.58 (piperidine-C-5), 28.44 (C-7'), 28.40 (piperidine-C-3), 28.39 (C-5''), 27.35 (C-2'), 27.22 (C-3'), 25.46 (C-2''), 24.71 (C-3''), 23.22 (7a'-CH<sub>3</sub>), 23.10 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.91 (C-6''), 20.06 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.10 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 584 (42, M<sup>+</sup>+1), 217 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2952, 1548, 1455, 1366, 1338, 1117, 1050, 757;  $[\alpha]_D^{20}$  = 32.0 ( $c$  = 0.015, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 583.4349. Found: 583.4344.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitro-5-[4-(3-trifluoromethylphenyl)piperazin-1-ylmethyl]-spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16k)**

Prepared following General Procedure 3 from 260 mg (0.87 mmol) **13** and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (**15k**). Eluent: isohexane/ethyl acetate 9:1.

Yield: 112 mg (21%); yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.34 (t, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, phenyl-5-H), 7.07–7.03 (m, 3 H, phenyl-2-H, phenyl-4-H, phenyl-6-H), 4.43 (d, 2H,  $J$  = 12.9 Hz, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.04 (d, 1H,  $J$  = 13.0 Hz) and 4.01 (d, 1H,  $J$  = 12.8 Hz) (4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.17–3.14 (m, 4 H, piperazine-2-H, piperazine-6-H), 3.05 (s, 2H, 1'''-H), 2.34–2.32 (m, 4 H, piperazine-2-H, piperazine-3-H, piperazine-6-H), 1.97 (t, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, 3a'-H), 1.56–1.13 (m, 19 H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.97

(s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.85 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 131.10 (q,  $J$  = 31.6 Hz, phenyl-C-3), 125.86 (phenyl-C-6), 124.51 (q,  $J$  = 267 Hz, CF<sub>3</sub>), 123.15 (phenyl-C-5), 118.85 (q,  $J$  = 1.2 Hz, phenyl-C-2), 115.61 (phenyl-C-1), 112.03 (q,  $J$  = 3.6 Hz, phenyl-C-4), 101.53 (spiro-C), 86.15 (C-5), 62.08 (C-6), 61.74 (C-4), 60.27 (C-1'''), 54.62 (piperazine-C-3, piperazine-C-5), 53.33 (C-1'), 53.23 (C-3a'), 48.83 (piperazine-C-2, piperazine-C-6), 44.57 (C-7a'), 39.39 (C-5'), 36.33 (C-6'), 34.64 (C-7'), 34.36 (C-1''), 28.07 (C-5''), 26.53 (C-2'), 24.99 (C-3'), 24.93 (C-2''), 24.45 (C-3''), 22.55 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.44 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.38 (C-6''), 19.54 (5''-CH<sub>3</sub>), 18.62 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 610 (52, M<sup>+</sup>+1), 247 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2954, 1708, 1610, 1548, 1450, 1319, 1237, 1164, 1124, 949, 757;  $[\alpha]_D^{20}$  = 34.5 ( $c$  = 0.012, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 609.3753. Found: 609.3765.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitro-5-(3-pyridinyl)methylaminomethyl-spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16l)**

Prepared following General Procedure 3 from 460 mg (1.16 mmol) **13** and 1.06 g (9.82 mmol, 8.5 equiv.) 3-(aminomethyl)pyridine (**15l**). Eluent: isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1.

Yield: 292 mg (52%); brown oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 8.47–8.46 (m, 2H, pyridine-2-H, pyridine-6-H), 7.62 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, pyridine-4-H), 7.24 (dd, 1H,  $J$  = 4.8 Hz, 7.8 Hz, pyridine-5-H), 4.41 (d, 1H,  $J$  = 12.7 Hz) and 4.33 (d, 1H,  $J$  = 12.8 Hz) (4-H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.00 (d, 1H,  $J$  = 12.7 Hz) and 3.9 (d, 1H,  $J$  = 12.8 Hz) (4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.77 (s, 2H, pyridine-CH<sub>2</sub>), 3.07 (s, 2 H, 1'''-H), 2.08 (t, 1H,  $J$  = 8.7 Hz, 3a'-H), 1.77–1.72 (m, 2H, 5'-H), 1.53–1.12 (m, 17 H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.00 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.87–0.84 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 150.17 (pyridine-C-2), 149.29 (pyridine-C-6), 136.06 (pyridine-C-5), 135.43 (pyridine-C-3), 123.89 (pyridine-C-4), 102.20 (spiro-C), 86.77 (C-5), 62.31 (C-6), 62.22 (C-4), 55.30 (C-1'), 51.82 (C-1'''), 51.81 (pyridine-CH<sub>2</sub>), 49.65 (C-3a'), 44.88 (C-7a'), 39.99 (C-5'), 37.20 (C-6'), 34.62 (C-7'), 34.46 (C-1''), 29.56 (C-2'), 28.56 (C-5''), 26.20 (C-3'), 25.98 (C-2''), 25.65 (C-3''), 23.05 (C-6''), 22.94 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.08 (5''-CH<sub>3</sub>), 20.11 (1''-CH<sub>3</sub>), 19.08 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 488 (66, M<sup>+</sup>+1), 121 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2954, 1546, 1466, 1366, 1339, 1118, 1026, 757;  $[\alpha]_D^{20}$  = 50.6 ( $c$  = 0.009, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 487.3410. Found: 487.3401.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitro-5-[N-methyl-N-((E)-phenylprop-1-en-3-yl)-aminomethyl]spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (16m)**

Prepared following General Procedure 3 from 770 mg (1.94 mmol) **13** and (E)-N-methyl-(phenylprop-1-en-3-yl)amine (**15m**). Eluent: isohexane/ethyl acetate 9:1.

Yield: 295 mg (29%); colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.38 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz, phenyl-2-H, phenyl-6-H), 7.31 (t, 2H,  $J$  = 7.5 Hz, phenyl-3-H, phenyl-5-H), 7.23 (t, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, phenyl-4-H), 6.48 (d, 1H,  $J$  = 15.9 Hz, phenyl-CH), 6.16 (dt, 1H,  $J$  = 15.8 Hz, 6.7 Hz, phenyl-CH=CH), 4.38 (d, 1H,  $J$  = 12.7 Hz) and 4.32 (d, 1H,  $J$  = 13.6 Hz) (4-H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.04 (d, 1H,  $J$  = 12.5 Hz) and 4.01 (d, 1H,  $J$  = 12.4 Hz) (4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.18 (d, 2H,  $J$  = 6.7 Hz, =CH-CH<sub>2</sub>), 2.98 (d, 2H,  $J$  = 4.2 Hz, 1'''-H), 2.30 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.12 (t, 1H,  $J$  = 8.5 Hz, 3a'-H), 1.84–1.75 (m, 2H, 5'-H), 1.60–1.15 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.00 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.87–0.85 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,

$\text{CD}_2\text{Cl}_2$ :  $\delta$  (ppm) = 137.37 (phenyl-C-1), 133.57 (phenyl-CH), 129.10 (phenyl-C-3, phenyl-C-5), 128.12 (phenyl-C-4), 127.04 (phenyl-CH=CH), 126.88 (phenyl-C-2, phenyl-C-6), 101.86 (spiro-C), 86.37 (C-5), 62.33 (C-6), 62.25 (C-4), 62.10 (=CH-CH<sub>2</sub>), 60.18 (C-1'''), 54.84 (C-1'), 49.63 (C-3a'), 44.95 (N-CH<sub>3</sub>), 44.79 (C-7a'), 40.09 (C-5'), 37.09 (C-6'), 34.76 (C-7'), 34.62 (C-1''), 29.84 (C-2'), 28.56 (C-5''), 26.19 (C-3'), 26.00 (C-2''), 25.55 (C-3''), 23.04 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.98 (C-6''), 22.16 (7a'-CH<sub>3</sub>), 20.09 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.07 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 527 (10, M<sup>+</sup>+1), 160 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2954, 1681, 1548, 1538, 1455, 1337, 1117, 1026, 968, 757;  $[\alpha]_D^{20}$  = 44.3 ( $c$  = 0.007, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 526.3771. Found: 526.3780.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-5-Benzoyloxymethyl-7a'-methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (17a)**

A solution of 453 mg (1.14 mmol) **13** in 8 mL pyridine is cooled to 0°C and 183 mg (1.30 mmol) benzoyl chloride is added in small portions with stirring. The mixture is stirred at 0°C for 30 min and at room temperature for 1 h, then sodium carbonate solution (10%; 50 mL) is added, followed by extraction with dichloromethane (3 × 50 mL). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified by FCC (isohexane/ethyl acetate 9:1).

Yield: 200 mg (35%); colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.97 (d, 2H,  $J$  = 8.0 Hz, phenyl-2-H, phenyl-6-H), 7.61 (t, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, phenyl-4-H), 7.47 (t, 2H,  $J$  = 7.7 Hz, phenyl-3-H, phenyl-5-H), 4.65 (s, 2H, 1''-H), 4.55 (d, 1H,  $J$  = 13.1 Hz) and 4.54 (d, 1H,  $J$  = 12.7 Hz) (4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.16 (d, 1H,  $J$  = 13.0 Hz) and 4.11 (d, 1H,  $J$  = 13.0 Hz) (4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 1.97 (t, 2H,  $J$  = 8.0 Hz, 5'-H), 1.87–1.78 (m, 1H, 3a'-H), 1.63–1.15 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.00 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.89–0.87 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 165.84 (C=O), 134.25 (phenyl-C-1), 131.01 (phenyl-C-6), 130.20 (phenyl-C-2), 129.47 (phenyl-C-4), 129.31 (phenyl-C-3), 129.16 (phenyl-C-5), 102.61 (spiro-C), 85.17 (C-5), 64.61 (C-1'''), 61.51 (C-6), 61.25 (C-4), 53.79 (C-1'), 52.70 (C-3a'), 45.09 (C-7a'), 39.90 (C-5'), 36.85 (C-6'), 35.03 (C-7'), 34.79 (C-1''), 28.58 (C-5''), 27.88 (C-2'), 26.84 (C-3'), 25.53 (C-2''), 25.23 (C-3''), 23.07 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.91 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.80 (C-6''), 20.08 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.12 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 502 (44, M<sup>+</sup>+1), 105 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2954, 1731, 1602, 1556, 1452, 1347, 1266, 1109, 758, 709;  $[\alpha]_D^{20}$  = 42.0 ( $c$  = 0.016, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 501.3090. Found: 501.3088.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-nitro-5-(pyridin-3-yl-carbonyloxymethyl)spiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (17b)**

A solution of 400 mg (1.01 mmol) **13** and 540 mg (3.03 mmol) nicotinoyl chloride hydrochloride in 2 mL pyridine and 1 mL ethanol is stirred at room temp. for 48 h; then sodium carbonate solution (10%; 50 mL) is added, followed by extraction with dichloromethane (3 × 50 mL). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified by FCC (isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1).

Yield: 205 mg (41%); pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 9.12 (s, 1H, pyridine-2-H), 8.79 (d, 1H,  $J$  = 6.8 Hz, pyridine-6-H), 8.21 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, pyridine-4-H), 7.41 (dd, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, 7.0 Hz, pyridine-5-H), 4.70 (s, 2H, 1''-H), 4.54 (d, 1H,  $J$  = 13.0 Hz) and 4.51 (d, 1H,  $J$  = 12.8 Hz) (4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.15 (d, 1H,  $J$  = 13.1 Hz) and 4.10 (d, 1H,  $J$  = 12.9 Hz) (4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 2.00 (t, 1H,  $J$  = 7.9 Hz, 3a'-H), 1.95–1.76 (m, 2H, 5'-H), 1.65–1.11 (m, 17H, 1'-H,

2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 1.25 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.90–0.86 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 164.25 (C=O), 154.22 (pyridine-C-6), 150.92 (pyridine-C-2), 137.05 (pyridine-C-5), 124.78 (pyridine-C-3), 123.52 (pyridine-C-4), 102.20 (spiro-C), 84.41 (C-5), 64.33 (C-1'''), 60.97 (C-6), 60.70 (C-4), 53.56 (C-1'), 51.58 (C-3a'), 44.57 (C-7a'), 39.39 (C-5'), 36.38 (C-6'), 34.42 (C-7'), 34.22 (C-1''), 30.07 (C-5''), 28.07 (C-2'), 27.68 (C-3'), 26.12 (C-2''), 25.04 (C-3''), 24.87 (7a'-CH<sub>3</sub>), 22.53 (1''-CH<sub>3</sub>), 22.37 (C-6''), 22.12 (5''-CH<sub>3</sub>), 19.55 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 503 (100, M<sup>+</sup>+1), 307 (26), 247 (26); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3319, 2954, 1737, 1591, 1555, 1468, 1367, 1347, 1276, 1110, 1025, 738;  $[\alpha]_D^{20}$  = 35.3 ( $c$  = 0.012, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 502.3043. Found: 502.3045.

**(1'R,3a'R,7a'R,1''R)-7a'-Methyl-1'-(1,5-dimethylhexyl)-5-(morpholin-4-yl-carbonyloxymethyl)-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,4'-octahydroindene] (17c)**

A solution of 470 mg (1.18 mmol) **13** and 205 mg (1.37 mmol) 4-morpholinocarbonyl chloride in 8 mL pyridine is stirred at room temp. for 16 h; then sodium carbonate solution (10%; 25 mL) is added, followed by extraction with dichloromethane (3 × 30 mL). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate and evaporated. The residue is purified by FCC (isohexane/ethyl acetate/triethylamine 6:4:0.1).

Yield: 238 mg (40%); yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 4.44 (m, 2H, 4-H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.40 (s, 2H, 1''-H), 4.09–3.93 (m, 2H, 4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.61 (d, 4H,  $J$  = 16.2 Hz, morpholine-2-H, morpholine-6-H), 3.38 (d, 4H,  $J$  = 23.9 Hz, morpholine-3-H, morpholine-5-H), 1.99–1.85 (m, 2H, 5'-H), 1.80 (m, 1H, 3a'-H), 1.37–1.09 (m, 17H, 1'-H, 2'-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.97 (s, 3H, 7a'-CH<sub>3</sub>), 0.88–0.86 (m, 9H, 1''-CH<sub>3</sub>, 6''-H, 5''-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) = 152.87 (C=O), 101.19 (spiro-C), 84.23 (C-5), 65.66 (morpholine-C-2), 65.46 (morpholine-C-6), 63.85 (C-1'''), 60.10 (C-6), 59.83 (C-4), 52.18 (C-1'), 51.99 (C-3a'), 43.76 (C-7a'), 43.50 (morpholine-C-5), 43.27 (morpholine-C-3), 38.57 (C-6'), 35.45 (C-5'), 33.77 (C-7'), 33.50 (C-1''), 27.26 (C-5''), 26.16 (C-3'), 25.63 (C-2'), 24.17 (C-2''), 23.72 (C-3''), 21.72 (1''-CH<sub>3</sub>), 21.58 (C-6''), 21.55 (5''-CH<sub>3</sub>), 18.71 (7a'-CH<sub>3</sub>), 17.75 (C-4''); MS (CI):  $m/z$  (%) = 510 (42, M<sup>+</sup>+1), 354 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3450, 2955, 1717, 1553, 1437, 1365, 1347, 1240, 1118, 1025, 763;  $[\alpha]_D^{20}$  = 44.4 ( $c$  = 0.011, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS: calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>: 510.3305. Found: 510.3307.

**1',2',3',4'-Tetrahydro-5-hydroxymethyl-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,1'-naphthalene] (19a)**

Prepared following General Procedure 2 from 1.10 g (7.52 mmol) 1-tetralone (**18a**). The crude product is recrystallized from ethanol.

Yield: 1.61 g (77%); light brown powder; m.p.: 133.1°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.56 (d, 1H,  $J$  = 7.0 Hz, 8'-H), 7.25–7.18 (m, 2H, 5'-H, 6'-H), 7.08 (d, 1H,  $J$  = 7.0 Hz, 5'-H), 4.71 (d, 2H,  $J$  = 13.4 Hz, 4-H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.19 (d, 2H,  $J$  = 13.3 Hz, 4-H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.92 (s, 2H, 1''-H), 2.81 (t, 2H,  $J$  = 6.4 Hz, 4'-H), 2.27–2.21 (m, 2H, 2'-H), 1.99–1.83 (m, 2H, 3'-H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 136.49 (C-6'), 135.65 (C-4a'), 128.15 (C-8a'), 127.72 (C-7'), 125.80 (C-8'), 125.70 (C-5'), 97.47 (spiro-C), 86.93 (C-5), 63.26 (C-4, C-6), 61.37 (C-1''), 28.36 (C-4'), 26.26 (C-2'), 18.81 (C-3'); MS (CI):  $m/z$  (%) = 280 (100, M<sup>+</sup>+1), 103 (26); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2936, 1549, 1458, 1327, 1130, 1058, 906, 763; HRMS: calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>: 279.1107. Found: 279.1112.



**1',2',3',4'-Tetrahydro-5-hydroxymethyl-6'-methoxy-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,1'-naphthalene] (19b)**

Prepared following General Procedure 2 from 1.23 g (7.00 mmol) 6-methoxy-1-tetralone (**18b**). The crude product is recrystallized from ethanol.

Yield: 1.92 g (89%); pale red powder; m.p.: 139.0°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm): 7.38 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 7'-H), 6.72 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 8'-H), 6.58 (s, 1H, 5'-H), 4.65 (d, 2H,  $J = 13.4$  Hz, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 4.17 (d, 2H,  $J = 13.4$  Hz, 4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 3.88 (s, 2H, 1''-H), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.76 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz, 4'-H), 2.23–2.18 (m, 2H, 2'-H), 1.89–1.83 (m, 2H, 3'-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 160.18 (C-6'), 139.61 (C-8a'), 129.92 (C-7'), 128.71 (C-4a'), 112.91 (C-5'), 112.83 (C-8'), 98.64 (spiro-C), 88.06 (C-5), 64.49 (C-1''), 62.64 (C-4, C-6), 55.68 (OCH<sub>3</sub>), 29.95 (C-4'), 27.32 (C-2'), 20.27 (C-3'); MS (CI):  $m/z$  (%) = 310 (100,  $\text{M}^+ + 1$ ), 280 (50); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2939, 1656, 1596, 1549, 1466, 1348, 1250, 1125, 1032; HRMS: calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ : 309.1212. Found: 309.1215.

**1',2',3',4'-Tetrahydro-5-hydroxymethyl-5-nitro-6'-(4-methylpentyl)-spiro[1,3-dioxane-2,1'-naphthalene] (19c)**

690 mg (4.25 mmol) 6-hydroxy-1-tetralone and 1.17 g (8.50 mmol) potassium carbonate are dispersed in 4.3 mL of dimethylformamide; then 0.93 mL (6.38 mmol) of 1-bromo-4-methylpentane is added, and the mixture is stirred at room temperature for 16 h. Then 50 mL water is added and the mixture is extracted with ethyl acetate (3  $\times$  50 mL). The combined organic layers are washed with 1 M hydrochloric acid (2  $\times$  50 mL) and with water, then dried over magnesium sulfate, and evaporated.

The crude product 6-(4-methylpentyl)-1-tetralone (**18c**; 936 mg) is converted to the acetal following General Procedure 2 using 2.29 g (15.2 mmol) tris(hydroxymethyl)nitromethane, 20 mg (0.04 mmol) tetrabutylammonium tribromide, and 0.5 mL triethyl orthoformate. The crude product is recrystallized from dichloromethane/isohexane.

Overall yield: 810 g (50%); pale yellow solid; m.p.: 112.6°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.35 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 7'-H), 6.70 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 8'-H), 6.56 (s, 1H, 5'-H), 4.69–4.59 (m, 2H, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.17 (2d, 2H,  $J = 13.4$  Hz, 13.5 Hz, 4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.90 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz, 1''-H), 3.85 (s, 2H, 1'''-H), 2.74 (t, 2H,  $J = 6.3$  Hz, 4'-H), 2.25–2.16 (m, 2H, 2'-H), 1.90–1.80 (m, 2H, 3'-H), 1.79–1.69 (m, 2H, 2''-H), 1.64–1.53 (m, 1H, 4''-H), 1.34–1.25 (m, 2H, 3''-H), 0.91 (d, 3H,  $J = 7.3$  Hz, 4''-CH<sub>3</sub>), 0.90 (d, 3H,  $J = 6.6$ , 5''-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 159.72 (C-6'), 139.56 (C-8a'), 129.75 (C-7'), 128.66 (C-4a'), 113.46 (C-5'), 113.39 (C-8'), 98.64 (spiro-C), 88.09 (C-5), 68.76 (C-1''), 64.37 (C-1'''), 62.66 (C-4, C-6), 35.57 (C-3''), 29.96, (C-4') 28.38 (C-4''), 27.65 (C-2''), 27.28 (C-2'), 22.83 (4''-CH<sub>3</sub>, C-5''), 20.30 (C-3'); MS (CI):  $m/z$  (%) = 380 (100,  $\text{M}^+ + 1$ ), 350 (74); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3416, 2955, 1609, 1551, 1537, 1504, 1470, 1437, 1347, 1247, 1170, 1133, 1053, 845; HRMS: calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_6$ : 379.1995. Found: 379.1995.

**1',2',3',4'-Tetrahydro-5-(N-benzylpiperidin-4-yl)-aminomethyl-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,1'-naphthalene] (20a)**

Prepared following General Procedure 3 from 960 mg (3.44 mmol) tetralone acetal **19a** and 4-amino-1-benzylpiperidine (**15i**). Eluent: isohexane/ethyl acetate 7:3.

Yield: 99 mg (6%); white solid; m.p.: 100.6°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.29 (m, 3H, 5'-H, 6'-H, phenyl-6-H), 7.25–7.07 (m, 6H, 7'-H, 8'-H, phenyl-2-H, phenyl-3-H, phenyl-4-H, phenyl-5-H),

4.72–4.68 (m, 2H, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.45–4.32 (m, 2H, 4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.54 (s, 2H, phenyl-CH<sub>2</sub>), 3.46 (s, 2H, 1''-H), 2.84–2.73 (m, 6H, 2'-H, 4'-H, piperidine-6-H), 2.50 (s, 1H, piperidine-4-H), 2.28 (m, 4H, piperidine-5-H, piperidine-2-H), 1.89–1.84 (m, 4H, piperidine-3-H, 3'-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 138.37 (C-8a'), 137.75 (phenyl-C-1), 137.74 (C-4a'), 137.16 (C-6'), 129.49 (phenyl-C-2), 129.12 (phenyl-C-6), 128.70 (phenyl-C-4), 128.62 (phenyl-C-3), 127.46 (phenyl-C-5), 127.34 (C-7'), 126.63 (C-5'), 126.51 (C-8'), 98.67 (spiro-C), 85.42 (C-5), 63.40 (C-1''), 62.55 (C-4), 60.54 (C-6), 52.82 (piperidine-C-4), 52.81 (piperidine-C-2, piperidine-C-6), 49.72 (phenyl-CH<sub>2</sub>), 29.71 (piperidine-C-3), 29.52 (piperidine-C-6), 27.34 (C-4'), 26.75 (C-2'), 20.18 (C-3'); MS (CI):  $m/z$  (%) = 482 (70,  $\text{M}^+ + 1$ ), 103 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2937, 1540, 1454, 1351, 1337, 1030, 1110, 924, 760; HRMS: calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$ : 452.2549. Found: 452.2544.

**1',2',3',4'-Tetrahydro-5-(N-benzylpiperidin-4-yl)-aminomethyl-6'-methoxy-5-nitrospiro[1,3-dioxane-2,1'-naphthalene] (20b)**

Prepared following General Procedure 3 from 1.00 g (3.23 mmol) tetralone acetal **19b** and 4-amino-1-benzylpiperidine (**15i**). The crude product is recrystallized from dichloromethane/isohexane.

Yield: 768 mg (48%); white powder; m.p.: 126.3°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.35 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 7'-H), 7.31–7.28 (m, 4H, phenyl-2-H, phenyl-3-H, phenyl-5-H, phenyl-6-H), 7.25–7.23 (m, 1H, phenyl-4-H), 6.71 (dd, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 2.7 Hz, 8'-H), 6.57 (s, 1H, 5'-H), 4.64 (d, 2H,  $J = 13.3$  Hz, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.15 (d, 2H,  $J = 13.3$  Hz, 4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.45 (s, 2H, 1''-H), 2.96 (s, 2H, phenyl-CH<sub>2</sub>), 2.80–2.73 (m, 4H, 4'-H, piperidine-6-H), 2.35–2.32 (m, 1H, piperidine-4-H), 2.27–2.19 (m, 2H, 2'-H), 1.97 (t, 2H,  $J = 10.8$  Hz, piperidine-2-H), 1.87–1.81 (m, 2H, 3'-H), 1.78–1.75 (m, 2H, piperidine-3-H), 1.34–1.17 (m, 2H, piperidine-5-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 160.08 (C-6'), 139.56 (C-8a'), 139.47 (phenyl-C-1), 130.20 (C-4a'), 129.46 (phenyl-C-2, phenyl-C-6), 128.80 (phenyl-C-4), 128.61 (phenyl-C-3, phenyl-C-5), 127.34 (C-7'), 112.92 (C-5'), 112.69 (C-8'), 98.41 (spiro-C), 87.95 (C-5), 63.78 (C-4, C-6), 63.38 (C-1''), 56.04 (piperidine-C-4), 55.66 (OCH<sub>3</sub>), 52.75 (piperidine-C-2, piperidine-C-6), 50.06 (phenyl-CH<sub>2</sub>), 33.32 (piperidine-C-3, piperidine-C-6), 30.01 (C-4'), 27.12 (C-2'), 20.35 (C-3'); MS (CI):  $m/z$  (%) = 482 (30,  $\text{M}^+ + 1$ ), 203 (100); IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2937, 1610, 1546, 1504, 1466, 1346, 1248, 1129, 1035, 755; HRMS: calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5$ : 483.2733. Found: 483.2960.

**1',2',3',4'-Tetrahydro-5-(N-benzylpiperidin-4-yl)-aminomethyl-5-nitro-6'-(4-methylpentyl)-spiro[1,3-dioxane-2,1'-naphthalene] (20c)**

Prepared following General Procedure 3 from 810 mg (2.13 mmol) tetralone acetal **19c** and 4-amino-1-benzylpiperidine (**15i**). The crude product is recrystallized from dichloromethane/isohexane.

Yield: 410 mg (34%); light brown solid; m.p.: 88.7°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.31–7.23 (m, 6H, 7'-H, phenyl-2-H, phenyl-3-H, phenyl-4-H, phenyl-5-H, phenyl-6-H), 6.69 (d, 1H,  $J = 7.0$  Hz, 8'-H), 6.56 (s, 1H, 5'-H), 4.64 (d, 2H,  $J = 10.7$  Hz, 4H<sub>eq</sub>, 6-H<sub>eq</sub>), 4.17 (d, 2H,  $J = 10.6$  Hz, 4H<sub>ax</sub>, 6-H<sub>ax</sub>), 3.89 (t, 2H,  $J = 5.3$  Hz, 1''-H), 3.45 (s, 4H, 1'''-H, phenyl-CH<sub>2</sub>), 2.77 (m, 4H, piperidine-4-H, piperidine-6-H), 2.74 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz, 4'-H), 2.35–2.34 (m, 1H, piperidine-4-H), 2.22–2.20 (m, 2H, 2'-H), 1.97–1.95 (m, 4H, piperidine-3-H, piperidine-5-H), 1.85–1.82 (m, 2H, 3'-H), 1.76–1.72 (m, 2H, 2''-H), 1.60–1.57 (m, 1H, 4''-H), 1.33–1.26 (m, 2H, 3''-H), 0.91 (d, 6H,  $J = 5.3$  Hz, 4''-CH<sub>3</sub>, 5''-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{MeOH-d}_4$ ):



$\delta$  (ppm) = 157.22 (C-6'), 139.69 (C-8a'), 138.62 (phenyl-C-1), 130.86 (C-4a'), 129.45 (phenyl-C-2, phenyl-C-6), 128.80 (phenyl-C-4), 128.62 (phenyl-C-3, phenyl-C-5), 128.16 (C-7'), 113.44 (C-5'), 110.16 (C-8'), 101.47 (spiro-C), 85.15 (C-5), 63.92 (C-1'''), 53.11 (C-4, C-6), 48.46 (C-1''), 45.67 (piperazine-C-4), 40.95 (piperazine-C-2, piperazine-C-6), 38.79 (phenyl-CH<sub>2</sub>), 33.80 (C-3''), 31.45 (piperazine-C-3, piperazine-C-6), 28.48 (C-4'), 25.30 (C-4''), 23.11 (C-2''), 20.99 (4''-CH<sub>3</sub>), 20.86 (C-5''), 17.52 (C-2'), 14.10 (C-3'); MS (CI):  $m/z$  (%) = 582 (80, M<sup>+</sup>+1), 280 (100); IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, film)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2939, 1608, 1545, 1453, 1345, 1246, 1123, 741, 699; HRMS: calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 552.3437. Found: 552.3435.

## Screenings

### Cholesterol biosynthesis assay

This assay for the identification of the target enzyme in the post-squalene part of cholesterol biosynthesis is based on the GC-MS analysis of changes in the sterol pattern after incubation with a test substance (qualitative assay).

For qualitative analysis a Varian 3800 gas chromatograph was coupled with a Varian Saturn 2200 ion trap. The autosampler was a CombiPal from CTC Analytics (Zwingen, Switzerland). Instrument control and data analysis were conducted with a Varian Workstation 6.9 SP 1. The injector (Varian 1177, Darmstadt, Germany) was held at 250°C and operated in splitless mode (hold time 1 min). For separation an Agilent VF-5ms capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, 10 m EZ-Guard column; Böblingen, Germany) was used with helium (purity 99.999%) as carrier gas at a constant flow rate of 1.4 mL min<sup>-1</sup>. The transfer line was held at 270°C. The oven program started at 50°C held for 1 min, and ramped to 260°C with 50°C min<sup>-1</sup>, followed by a gradient of 4°C min<sup>-1</sup> to 310°C held for 0.5 min. The MS was operated in full scan mode from 9 to 12 min at a mass range from 50 to 450  $m/z$  and from 12 to 18 min at a mass range from 100 to 650  $m/z$ . The sterols were identified by comparison with authentic standard substances or by alignment with data from the NIST<sup>TM</sup> 2005 mass spectral database.

The quantitative assay for the effect of inhibitors on total cholesterol biosynthesis is based on the GC-MS determination of labeled cholesterol resulting from incorporation of sodium <sup>13</sup>C-acetate into newly biosynthesized cholesterol.

Both experiments were performed on HL 60 cells (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Braunschweig, Germany). For details see ref. [42].

### Ergosterol biosynthesis assay

This assay works in principle in the same manner as the one described above, and is performed on the fungal cell lines *Candida glabrata*, *Yarrowia lipolytica*, and *Saccharomyces cerevisiae*, all obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). For details see ref. [43].

### MTT assay for general cytotoxicity [55]

HL 60 cells were maintained in RPMI 1640 medium (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) containing 10% fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories, Cölbe, Germany) without antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Solutions of the compounds in DMSO (1 µL, concentrations ranging from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) were incubated with 99 µL of a suspension of HL 60 cells (9 × 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>) in RPMI 1640 medium with 10% FBS in 96-well plates for 24 h at 37°C. Then, 10 µL of MTT solution in PBS (5 mg mL<sup>-1</sup>) was added and the plate was incubated for another 2 h. The cells were quenched with 190 µL of DMSO, and after 1 h of continuous shaking of the plates, a photometric evaluation on an ELISA plate reader MRX II (Dynex Technologies, Denkendorf, Germany; Software: Revelation 4.06) using the wavelength of 550 nm followed. The IC<sub>50</sub> values were calculated by using Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Cisplatin was used as the reference drug.

The authors thank Martina Stadler for technical assistance and Dr. Lars Allmendinger for support in NMR analysis.

The authors have declared no conflict of interest.

## References

- [1] I. Taba, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 583–590.
- [2] H. R. Waterham, R. J. A. Wanders, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 340–356.
- [3] S. M. Grundy, J. I. Cleeman, C. N. Bairey Merz, H. B. Brewer, Jr., L. T. Clark, D. B. Hunninghake, R. C. Pasternak, S. C. Smith, Jr., N. J. Stone, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *44*, 720–732.
- [4] B. K. Wagner, T. J. Gilbert, J. Hanai, S. Imamura, N. E. Bodycombe, R. S. Bon, H. Waldmann, P. A. Clemons, V. P. Sukhatme, V. K. Mootha, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 900–904.
- [5] F. Berardi, C. Abate, S. Ferorelli, A. F. de Robertis, M. Leopoldo, N. A. Colabufo, M. Nisoi, R. Perrone, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7523–7531.
- [6] X. Y. Liu, A. W. Dangel, R. I. Kelley, W. Zhao, P. Denny, M. Botcherby, B. Cattanch, J. Peters, P. R. Hunsicker, A. M. Mallon, M. A. Strivens, R. Bate, W. Miller, M. Rhodes, S. D. Brown, G. E. Herman, *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 182–187.
- [7] C. Has, L. Bruckner-Tuderman, D. Müller, M. Floeth, E. Folkers, D. Donnai, H. Traupe, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 1951–1955.
- [8] F. F. Moebius, B. U. Fitzky, H. Glossmann, *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *11*, 106–114.
- [9] R. I. Kelley, G. E. Herman, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 299–341.
- [10] G. Van Minnebruggen, I. E. J. A. Francois, B. P. A. Cammue, V. Vroome, M. Borgers, B. Shroot, *Open Mycol. J.* **2010**, *4*, 22–32.
- [11] W. de Souza, J. C. F. Rodrigues, *Interdisciplinary Perspectives in Infectious Diseases*, Volume 2009, Article ID 642502, Hindawi Publishing Corp, Cairo, New York, **2009**.

- [12] B. C. Baldwin, *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, 18, 61–62.
- [13] D. Lamb, D. Kelly, S. Kelly, *Drug Resist. Updates* **1999**, 2, 390–402.
- [14] R. A. Akins, *Med. Mycol.* **2005**, 43, 285–318.
- [15] J. Burbiel, F. Bracher, *Steroids* **2003**, 68, 587–594.
- [16] C. P. Woloshuk, H. D. Sisler, S. R. Dutky, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, 16, 81–86.
- [17] R. S. Burden, D. T. Cooke, G. A. Carter, *Phytochemistry* **1989**, 28, 1791–1804.
- [18] A. Rahier, M. Taton, *Biochemistry* **1996**, 35, 7069–7076.
- [19] L. El kibel, B. Choucair, M. Dherbomez, Y. Letourneux, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 4075–4078.
- [20] S. E. Barrie, G. A. Potter, P. M. Goddard, B. P. Haynes, M. Dowsett, M. Jarman, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, 50, 267–273.
- [21] P. Beuchet, M. Dherbomez, L. Elkiel, G. Charles, Y. Letourneux, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1599–1600.
- [22] R. J. Cenedella, P. S. Sexton, K. Krishnan, D. F. Covey, *Lipids* **2005**, 40, 635–640.
- [23] D. W. Nes, W. Zhou, K. Ganapathy, J. Liu, R. Vatsyayan, S. Chamala, K. Hernandez, M. Miranda, *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, 481, 210–218.
- [24] J. Liu, W. D. Nes, *Molecules* **2009**, 14, 4690–4706.
- [25] M. Giera, D. Renard, F. Plössl, F. Bracher, *Steroids* **2008**, 73, 299–308.
- [26] D. Renard, J. Perruchon, M. Giera, J. Müller, F. Bracher, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 8123–8137.
- [27] G. M. Allan, N. Vicker, H. R. Lawrence, H. J. Tutill, J. M. Day, M. Huchet, E. Ferrandis, M. J. Reed, A. Purohit, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4438–4456.
- [28] M. A. E. Pinto-Bazurco, M. Negri, C. Jagusch, U. Müller-Vieira, T. Lauterbach, R. W. Hartmann, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5009–5018.
- [29] J. S. Wright, H. Shadnia, J. M. Anderson, T. Durst, M. Asim, M. El-Salfiti, C. Choueiri, M. A. C. Pratt, S. C. Ruddy, R. Lau, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, P. J. O'Brien, L. Wan, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 433–448.
- [30] S. Marchais-Oberwinkler, M. Wetzel, E. Ziegler, P. Kruchten, R. Werth, C. Henn, R. W. Hartmann, M. Frotscher, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 534–547.
- [31] N. Matsunaga, T. Kaku, F. Itoh, T. Tanaka, T. Hara, H. Miki, M. Iwasaki, T. Aono, M. Yamaoka, M. Kusaka, A. Tasaka, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2251–2273.
- [32] A. Rahier, M. Taton, P. Schmitt, P. Benveniste, P. Place, C. Anding, *Phytochemistry* **1985**, 24, 1223–1232.
- [33] F. F. Moebius, R. J. Reiter, K. Bermoser, H. Glossmann, S. Y. Cho, Y. K. Paik, *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 591–598.
- [34] A. Windaus, W. Grundmann, *L. Ann.* **1936**, 524, 295–299.
- [35] S. Lange, M. Keller, S. Oliaro-Bosso, G. Balliano, F. Bracher, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 758–764.
- [36] A. M. König, C. Müller, F. Bracher, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 1925–1943.
- [37] M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 287–294.
- [38] F. F. Moebius, K. Bermoser, R. J. Reiter, M. Hanner, J. Striessnig, H. Glossmann, *Biochemistry* **1996**, 35, 16871–16878.
- [39] M. Taton, A. Rahier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 181, 465–473.
- [40] Y. Suárez, C. Fernández, D. Gómez-Coronado, A. J. Ferruelo, A. Dávalos, J. Martínez-Botas, M. A. Lasunción, *Cardiovasc. Res.* **2004**, 64, 346–355.
- [41] D. Debieu, J. Bach, A. Arnold, S. Brousset, M. Gredt, M. Taton, A. Rahier, C. Malosse, P. Leroux, *Pestic. Biochem. Physiol.* **2000**, 67, 85–94.
- [42] M. Giera, F. Plössl, F. Bracher, *Steroids* **2007**, 72, 633–642.
- [43] C. Müller, V. Staudacher, J. Krauß, M. Giera, F. Bracher, *Steroids* **2013**, 78, 483–493.
- [44] G. G. Tsantali, J. Dimtsas, C. A. Tsoleridis, I. M. Takakis, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 258–265.
- [45] B. K. Banik, M. Chapa, J. Marquez, M. Cardona, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 2341–2343.
- [46] a) K. Ishihara, Y. Karumi, M. Kubota, H. Yamamoto, *Synlett* **1996**, 839–841; b) K. Takenouchi, R. Sogawa, K. Manabe, H. Saitoh, Q. Gao, D. Miura, S. Ishizuka, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 89–90, 31–34.
- [47] G. C. Look, M. M. Murphy, D. A. Campbell, M. A. Gallop, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2937–2940.
- [48] T. Wharton, L. J. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 3545–3554.
- [49] K. S. Kim, S. D. Hong, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5909–5913.
- [50] E. Schipper, E. Chinery, J. Nichols, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 4145–4148.
- [51] S. Ram, R. E. Ehrenkauf, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3415–3418.
- [52] S. Malinowski, T. Urbanski, *Roczn. Chim.* **1951**, 25, 183–212.
- [53] R. Gopinath, J. Sk. Haque, B. K. Patel, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5842–5845.
- [54] In the analogous acetalization of Grundmann's ketone (**1**) this catalyst was inferior (34% yield) to the scandium triflate catalyst (43% yield).
- [55] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.

### **1.2.6.3 Beitrag am Artikel**

Melanie Krojer und Prof. Dr. Franz Bracher waren für die Syntheseplanung und Durchführung verantwortlich. Die biologische Testung im Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese-Assay, Identifizierung des Target-Enzyms und Einordnung der biologischen Aktivität bei Inhibition war mein wissenschaftlicher Beitrag sowie die Erstellung von Abbildung 3 im Artikel. Die Auswertung der Daten und Erstellung des Manuskripts unterlag Prof. Dr. Franz Bracher.

## 1.2.7 7-Dehydrocholesterolreduktase-Inhibitoren

*Horling A, Müller C, Barthel R, Bracher F, Imming P. A new class of selective and potent 7-dehydrocholesterol reductase inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry 2012;55:7614-22.*

### 1.2.7.1 Zusammenfassung

Die 7-Dehydrocholesterolreduktase (7-DHCR) ist das letzte Enzym im Kandutsch-Russell-Pathway des Cholesterol-Biosyntheseweges (vgl. Abbildung 5), welches aus Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol (7-DHC) durch Reduktion der Doppelbindung in Position C7 Cholesta-5-en-3 $\beta$ -ol (= Cholesterol) bildet (vgl. Kapitel 1.2.7.2, im Artikel Schema 1). Die rezessive, autosomal vererbte Stoffwechselerkrankung Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS) beruht auf einem Gendefekt der 7-DHCR. Dadurch kann im menschlichen Körper kein oder fast kein Cholesterol mehr gebildet werden. Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol und dessen oxidierte Formen stehen im Verdacht, für die Ausprägungen des Phänotyps verantwortlich zu sein. Die Inzidenz dieser Erkrankung liegt zwischen 10.000-80.000, je nach zugehöriger Rasse. Syndactylie von Zehen, Mikroenzephalie, geistige Retardiertheit und gastrointestinale Beschwerden sind die häufigsten Erscheinungsbilder des Syndroms (vgl. Kapitel 1.2). Früherkennung durch Messung von 7-DHC im Fetus und sofortige Gaben von Cholesterol können die Ausprägung der Krankheit mindern, die Behandlung erfolgt symptomatisch.

Die anfängliche Idee hinter der Herstellung von Berberinderivaten im Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Imming war, dass sie ähnlich wie Berberin eine antimykotische Wirkung haben sollen. Durch umfassende Testung in den Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese-Assays und mit Hilfe von unspezifischen Toxizitätstests, wie Agar-Diffusionstest, MHK-Bestimmung und MTT-Test, konnte gezeigt werden, dass die ersten neu synthetisierten Verbindungen keinen Effekt auf die Ergosterol-Biosynthese bzw. auf das Pilzwachstum haben. Jedoch zeigten einige Verbindungen eine Hemmung der humanen 7-DHCR und der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase in HL60 Zellen. In Vorversuchen konnte jedoch in niedrigen Konzentrationen hauptsächlich die 7-DHCR gehemmt werden, was den Schluss nahe legte, dass die Substanzen eine höhere Affinität zur 7-DHCR als zur  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase haben. Daraufhin wurden die Strukturen optimiert. Die folgenden Verbindungen waren hoch selektiv. Insgesamt wurden 15 verschiedene Tetrahydroisochinolin-Derivate hergestellt, von denen sich fünf als selektive Inhibitoren der 7-DHCR erwiesen. Die interessantesten Verbindungen werden in dem Artikel beschreiben, wobei die Verbindung **5f** eine 200-fach höhere Wirkung auf die Cholesterol-Biosynthese besitzt als der „beste bekannte“ Referenzinhibitor BM 15.766 Sulfat (2,3 nM gegenüber 500 nM). Andere angebliche Referenzinhibitoren erwiesen sich unter den Testbedingungen als Multienzyminhibitoren (z.B. AY9944).

Die Verbindungen können leicht in einer dreistufigen Synthese hergestellt werden. Phenethylaminderivate reagieren im ersten Schritt mit Phenylelessigsäurederivaten zu Amidinen, welche im Anschluss mit Lithiumaluminiumhydrid zu sekundären Aminen reduziert werden. In einer

Mannichreaktion unter Zuhilfenahme von Formaldehyd kommt es schließlich zum Ringschluss (siehe Kapitel 1.2.7.2 im Artikel Schema 4).

Aufgrund der hohen Wirksamkeit, insbesondere von Verbindung **5f**, sind die Substanzen sehr gut geeignet als molekulare Werkzeuge für *in vitro/vivo*-Studien, zumal sie eine sehr geringe unspezifische Toxizität besitzen. Durch Hemmung der Cholesterol-Biosynthese, bei zeitgleicher Anreicherung von 7-DHC lassen sich molekulare Mechanismen zur Pathogenese des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms erforschen. Das Ausbleiben der antimykotischen Wirkung lässt sich dadurch erklären, dass es in Pilzzellen keine 7-DHCR gibt und damit der Angriffspunkt der Verbindungen fehlt (vgl. Kapitel 1.3.1.2).

## 1.2.7.2 Artikel

## A New Class of Selective and Potent 7-Dehydrocholesterol Reductase Inhibitors

Aline Horling,<sup>†</sup> Christoph Müller,<sup>‡</sup> Richard Barthel,<sup>†</sup> Franz Bracher,<sup>‡</sup> and Peter Imming<sup>\*†</sup>

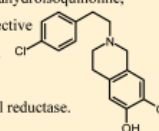
<sup>†</sup>Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Strasse 4, 06120 Halle, Germany

<sup>‡</sup>Department für Pharmazie, Zentrum für Pharmaforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5-13, D-81377, Germany

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** We prepared a number of *N*-phenethyltetrahydroisoquinolines structurally related to protoberberines. They were tested for activity against bacteria, fungi, and human leukemia HL-60 cells and also for inhibition of biosynthesis: ergosterol in yeasts and cholesterol in human cells. In the latter assay panel, several of the compounds were distinguished by a strong and selective inhibition of 7-dehydrocholesterol reductase (7-DHCR, EC 1.3.1.21), an enzyme responsible for the conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol in the last step of cholesterol biosynthesis. In a whole-cell assay, the most active compound **Sf** showed a much stronger inhibition of overall cholesterol biosynthesis ( $IC_{50}$  2.3 nM) than BM 15.766 ( $IC_{50}$  500 nM), presently the most selective known inhibitor of 7-DHCR. Since a defect of 7-dehydrocholesterol reductase is associated with Smith–Lemli–Opitz syndrome (SLOS), the potent and selective inhibitors reported here will enable more detailed investigation of the pathogenesis of SLOS.

A new phenethyltetrahydroisoquinoline, distinguished by selective and potent inhibition of human 7-dehydrocholesterol reductase.



### INTRODUCTION

Cholesterol has different functions in human physiology. It is an important structural component of the mammalian cell membrane and also a precursor molecule for glucocorticoids, mineralocorticoids, neurosteroids, and steroid sex hormones. A known autosomal recessive trait, the Smith–Lemli–Opitz syndrome (SLOS), is associated with the pivotal role of cholesterol, especially during embryonic development and morphogenesis.<sup>1</sup> The worldwide incidence of SLOS is 1 in 10 000–80 000 births, depending on ethnic group. It is accompanied by severe abnormalities, observed in most of the patients, such as microcephaly, short nose with anteverted nares, retrognathia, cutaneous syndactyly of second to third toe, feeding difficulties in the gastrointestinal tract, mental retardation, and brain growth retardation.<sup>1</sup> The syndrome was first described by Smith, Lemli, and Opitz in 1964.<sup>2</sup> As recently as 1994, a defect of 7-dehydrocholesterol reductase (7-DHCR, EC 1.3.1.21), the enzyme that catalyzes the reduction of 7-dehydrocholesterol (cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol) to cholesterol (cholesta-5-en-3 $\beta$ -ol) in the last step of cholesterol biosynthesis (Scheme 1), was identified as the biochemical cause of this clinically complex syndrome.<sup>3–5</sup> The route of cholesterol biosynthesis from lanosterol via 7-dehydrocholesterol is called the Kandutsch–Russell pathway.<sup>6,7</sup> A defect of 7-DHCR leads to a deficit in cholesterol and an accumulation of 7-dehydrocholesterol, which together with its oxidized derivatives is embryotoxic, also having a negative influence on total cholesterol transfer.<sup>5,8,9</sup> An early diagnosis of SLOS with external substitution of cholesterol will alleviate the symptoms of SLOS.<sup>10,11</sup>

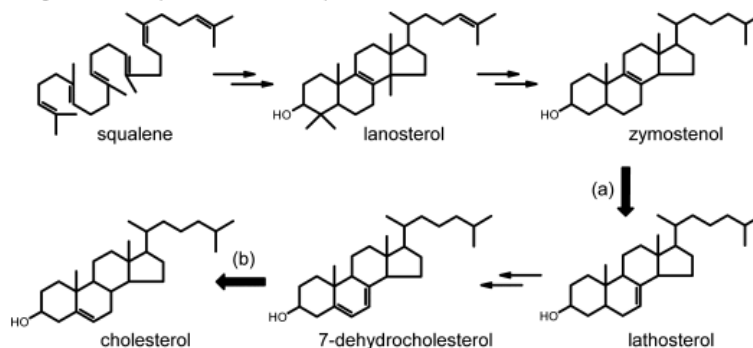
For a better understanding of SLOS, the molecular mechanisms, including details of the effects of 7-dehydrocho-

lesterol and its oxidation products, have to be further investigated.<sup>12</sup> This needs selective 7-DHCR inhibitors that inhibit cholesterol biosynthesis at the stage of 7-dehydrocholesterol, simulating aspects of SLOS in vitro. Several 7-DHCR inhibitors (AY 9944, BM 15.766, and YM 9429; Scheme 2) have been published, but all of them have severe disadvantages. AY 9944 inhibits several enzymes of cholesterol biosynthesis including upstream enzymes, most notably  $\Delta 8,7$ -isomerase.<sup>8,13,14</sup> This inhibition of two enzymes leads to an accumulation of other sterols, mainly zymostenol (cholesta-8-en-3 $\beta$ -ol), blurring the similarity with the situation in SLOS. The inhibitor BM 15.766 is a known selective inhibitor of 7-dehydrocholesterol reductase but not a potent one.<sup>15</sup> In rat hepatocytes, cholesterol synthesis was reported to have been almost totally inhibited by BM 15.766 at a concentration of as much as 10  $\mu$ M.<sup>15</sup> BM 15.766 has lower toxicity than AY 9944, the latter displaying higher lethality toward rats.<sup>16</sup> YM 9429 was investigated only in a few studies.<sup>17</sup> Just as with AY 9944, inhibition of related enzymes was not completely excluded, and inhibition of 7-DHCR was even weaker than with BM 15.766.<sup>17</sup> Furthermore, YM 9429 is considered to be potentially teratogenic.<sup>17</sup> Consequently, no suitable 7-DHCR inhibitor for investigation of the SLOS pathobiochemistry mechanism is available at present.

In various pharmacological studies, protoberberines have shown antibacterial, antifungal, antileishmanial, and antispasmodic effects.<sup>18–21</sup> Protoberberines are characterized by many reported activities and many possibilities of binding to targets.<sup>22</sup> Berberine was recently found to inhibit the hepatic HMG-CoA

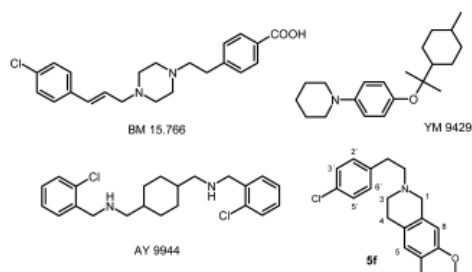
Received: May 2, 2012

Published: August 13, 2012

Scheme 1. Post-Squalene Pathway of Cholesterol Biosynthesis<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>(a) Catalyzed by  $\Delta 8,7$ -isomerase. (b) Catalyzed by 7-dehydrocholesterol reductase (7-DHCR).

Scheme 2. Structures of Known Inhibitors of 7-Dehydrocholesterol Reductase and the Herein-Reported Potent and Selective Inhibitor 5f

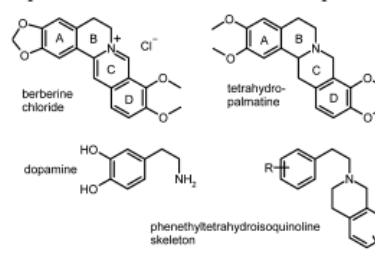


reductase in hyperhomocysteinemic rats and to reduce the cholesterol level in liver.<sup>23</sup> HMG-CoA reductase catalyzes the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis. This prompted us to take a closer look at the effect of some protoberberine alkaloids on cholesterol biosynthesis in mammalian cells and on ergosterol biosynthesis in fungal cells. Since the molecular targets for inhibition (and thus the structural requirements for inhibitors) were unknown, we decided to go for a broader approach, including not only berberine but also the related alkaloid tetrahydropalmatine (nonquaternary) and phenethyltetrahydroisoquinolines (formal seco analogues having higher conformational flexibility). The test compounds were selected without taking the constitution of known 7-DHCR inhibitors into account, as we did not know at the outset where the effect on cholesterol catabolism and metabolism might reside. We rather relied on the effectiveness of the assay method in identifying a molecular target through a whole-cell approach. In order to keep undesired effects in view, the compounds were also screened for antibacterial and antifungal activities and general cytotoxicity for human cells. The investigations led to the discovery of the synthetic phenethyltetrahydroisoquinoline 5f as a highly potent and selective inhibitor of 7-DHCR in cholesterol biosynthesis, displaying no effect on ergosterol biosynthesis in fungi and very low cytotoxicity.

## RESULTS

**Chemistry.** In the course of studies with protoberberines and related alkaloid analogues,<sup>24</sup> we prepared a series of phenethyltetrahydroisoquinolines. Since the phenethylamine moiety seems to be essential for the various pharmacological effects of protoberberines, we decided to include this motif in all synthetic analogues. Compared to the parent alkaloids berberine and palmatine, ring B has formally been opened, whereas ring C has been reduced to the tetrahydro form in the synthetic analogues in order to avoid getting quaternary ammonium compounds (Scheme 3). Drugs containing

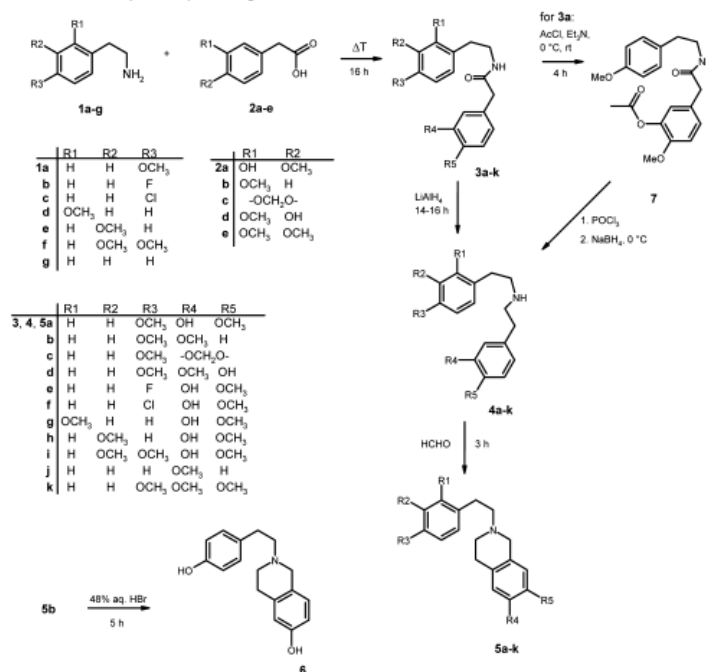
Scheme 3. Target Phenethyltetrahydroisoquinoline Skeleton in Comparison with Parent Alkaloids and Dopamine



quaternary ammonium groups are characterized by high hydrophilicity, causing low permeability through biological membranes and restricted *in vivo* distribution. Several investigations document the low absolute bioavailability of berberine.<sup>25,26</sup> Its log *P* value was determined to be  $-1.5$ .<sup>27</sup> In contrast, the nonquaternary tetrahydropalmatine was reported to cross biological membranes rapidly. Its maximum concentration in plasma after oral administration was reached within 30 min.<sup>28,29</sup> The phenethyltetrahydroisoquinoline skeleton retains the dopamine moiety included in (proto)berberine alkaloids.

The phenethyltetrahydroisoquinoline 5a was synthesized in four steps (Scheme 4). The synthetic strategy builds on protocols previously described;<sup>30–32</sup> however, the literature contains many discrepancies and contradictions in experimental

Scheme 4. Syntheses of Phenethyltetrahydroisoquinolines



detail. We have investigated each step extensively in order to find the best strategy for different substitution patterns. In the Experimental Section and Supporting Information, detailed procedures are provided for the derivatives reported here. The first step comprises a condensation reaction of the phenethylamine **1a** and the phenylacetic acid **2a** without activation of the carboxylic acid to give the amide **3a** in excellent yield. Normally, amines and carboxylic acids would form only a salt, but in refluxing xylenes with azeotropic removal of the reaction water, we were able to get the amides. This straightforward procedure also relies on the thermostability of the educts and products.

Due to its incompatibility with phosphorus oxychloride used in a later step of the sequence, the phenolic moiety of **3a** had to be protected by acetylation. The protected amide **7** was treated with phosphorus oxychloride to give an imidoil chloride, which in turn was smoothly converted to the amine **4a** by a mild reduction protocol.<sup>33</sup> In the course of this reduction, the acetyl protecting group was removed quantitatively. Mannich reaction of **4a** with formalin in methanol finally yielded **5a**. For the ring to be closed in the desired way, the solvent, concentration of the starting material, and pH (1–2) had to be diligently chosen. For the Mannich-type cyclization, forming ring C of phenethyltetrahydroisoquinolines, an activated phenyl ring is absolutely necessary. Derivatives that bear no +M or +I substituents at the phenyl ring annulated to the future piperidine ring cannot be closed by the Mannich reaction. We have investigated this reaction under a variety of pH conditions. The formation of phenethyltetrahydroisoquinolines

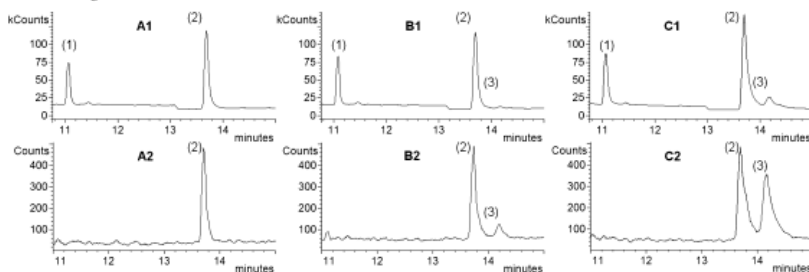
that were substituted only with a methylenedioxy group or methoxy groups was achieved by Mannich reaction in methanol independent of pH value. C-6-hydroxylated compounds, in contrast, needed to be synthesized at pH 1–2. At higher pH, two products were furnished by C-6 and C-8 hydroxylation.

In order to reduce the steps of the synthesis of further phenethyltetrahydroisoquinolines and avoid the possible formation of phosphoric acid esters, reduction of the amide with phosphorus oxychloride followed by sodium borohydride was replaced by a reduction with lithium aluminum hydride, resulting in easier workup and better yields. With this method, only three steps were needed to prepare the target compounds **5b–k** since protection of the phenolic groups was no longer required (Scheme 4). Again, the Mannich-type cyclizations occurred regioselectively if reaction conditions were adjusted properly (see Experimental Section). Demethylation of dimethoxy compound **5b** was achieved in refluxing 48% aqueous hydrobromic acid, yielding the diphenol **6**.

**Pharmacology. Cytotoxic Activity.** For the detection of undesired cytotoxic activities, the substances were subjected to a preliminary screening for unspecific cytotoxicity in an MTT assay on HL-60 cells (human promyelocytic leukemia cells).<sup>34</sup> The reference inhibitor cisplatin showed an IC<sub>50</sub> value of 5 μM in this assay, whereas none of the compounds under investigation here showed significant cytotoxicity (IC<sub>50</sub> values >50 μM; data not shown).

**Antibacterial and Antifungal Activity.** The compounds were subjected to a standard disk diffusion antimicrobial sensitivity test (agar diffusion assay) with different strains of



Scheme 5. Chromatograms of Sterol Fractions Isolated after Treatment with or without Inhibitor<sup>a</sup>

<sup>a</sup>(A1–C1) Full scan mode ( $m/z$  100–650); (A2–C2) selected ion mode for identification of 7-dehydrocholesterol ( $m/z$  351, 325, 366). (A1) Blank sample, full scan; (A2) blank sample, selected ion scan; (B1) BM 15.766, 1  $\mu$ M, full scan; (B2) BM 15.766, 1  $\mu$ M, selected ion scan; (C1) 5f, 1  $\mu$ M, full scan; (C2) 5f, 1  $\mu$ M, selected ion scan. (Peak 1) Cholestane (internal standard); (peak 2) cholesterol; (peak 3) 7-dehydrocholesterol.

Gram-positive or Gram-negative bacteria, yeasts, and fungi. The activities, expressed as diameters of zone of inhibition, were compared to those found for reference inhibitors, viz. the antibacterial tetracycline and the antimycotic clotrimazole.<sup>35</sup> None of the compounds showed significant antibacterial activity, and in the screening for antifungal activity, only compounds 5a, 5e, and 5i showed some moderate effects against *Hyphopichia burtonii* (data not shown).

**Screening for Ergosterol Biosynthesis Inhibition in Yeasts.** In the first step, MIC (minimal inhibitory concentration) values against the yeasts *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Yarrowia lipolytica* were determined according to DIN 58940-84.<sup>36</sup> Clotrimazole as a positive control showed an MIC value of <1  $\mu$ g/mL; all other compounds gave values >20  $\mu$ g/mL. These values, in combination with the data from the agar diffusion assay, showed that the antifungal potency of the substances investigated here was orders of magnitude lower than the 7-DHCR inhibition of some of them (v.i.).

However, inhibition of single enzymes of ergosterol biosynthesis need not necessarily result in cell death. Consequently, the effect of our compounds on ergosterol biosynthesis was studied in order to detect the inhibition of one or several biosynthetic steps. The compounds were subjected to a whole-cell assay with a liquid–liquid microextraction workup after cell lysis for the isolation of sterols, and subsequent gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis of the sterol pattern. Qualitative analysis of the effects of all compounds, including the known inhibitors AY 9944 and BM 15.766, on three different yeasts (*C. glabrata*, *S. cerevisiae*, and *Y. lipolytica*) was performed at two different inhibitor concentrations (20 and 10  $\mu$ g/mL). The inhibition of any enzyme of the post-squalene part of ergosterol biosynthesis would lead to a characteristic change in the sterol composition.<sup>37</sup> With all compounds tested, GC–MS analysis showed no significant change in the sterol pattern, and no abnormal sterols were detected compared to blank samples.

**Screening for Inhibition of Cholesterol Biosynthesis.** The effect on cholesterol biosynthesis was determined in an in vitro assay developed by us, based on incubation with HL-60 cells, followed by lysis of the cells, liquid–liquid microextraction, and GC–MS analysis of the resulting sterol pattern.<sup>13,38</sup> By simply identifying accumulating sterols and comparing the sterol patterns with those resulting from incubation with known enzyme inhibitors, this assay indicates which enzymes in the

post-squalene part of cholesterol biosynthesis are inhibited (qualitative results). The inhibitory potency of a discrete inhibitor (quantitative results) has to be investigated in an additional test.

**Qualitative Results.** The sterol patterns resulting from incubation with our compounds were compared to blank samples obtained by incubation of HL-60 cells without inhibitor. Compounds 5a and 5e caused an accumulation of 7-dehydrocholesterol (7-DHC; see Scheme 1) at low concentration levels, and at higher levels an accumulation of both 7-DHC and zymostenol. Consequently, these compounds inhibit both  $\Delta 8,7$ -isomerase (marker sterol zymostenol) and 7-dehydrocholesterol reductase (marker sterol 7-dehydrocholesterol).<sup>4,38</sup> In contrast, compounds 5b, 5c, 5j, and 5k caused an accumulation of zymostenol only (see Supporting Information), indicative of a selective inhibition of the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase. Compound 5d had no effect on cholesterol biosynthesis.

Most importantly, compounds 5f, 5g, 5h, 5i, and 6 displayed a sterol pattern characteristic of selective 7-dehydrocholesterol reductase inhibition. Compounds 5g and 6 caused an accumulation of 7-dehydrocholesterol at higher concentration levels only, whereas 5f, 5h, and 5i effected this at very low levels.

The results obtained with known inhibitors of 7-DHCR as reference compounds agreed with the literature, leading to the expected accumulation effects and thus validating the data found for the new compounds. AY 9944 inhibited both  $\Delta 8,7$ -isomerase and 7-dehydrocholesterol reductase.<sup>7,8,13,14</sup> Giera et al.<sup>38</sup> observed that AY 9944 inhibits 7-dehydrocholesterol reductase at 0.1  $\mu$ M and two upstream enzymes,  $\Delta 14$ -reductase and  $\Delta 8,7$ -isomerase, at 10  $\mu$ M. Similar results were published by Fernández et al.<sup>9</sup> BM 15.766 was reported to be more selective for 7-DHCR<sup>9,15</sup> (see Scheme 5). The phenethylamines 5f, 5h, and 5i showed the same effects on HL-60 cells that BM 15.766 had (accumulation of 7-dehydrocholesterol) but led to significantly stronger accumulation of the substrate sterol at the inhibitor concentrations investigated here.

**Quantitative Results.** The next step was quantitative determination of the inhibitory potency of the most promising substances. They were selected by visual inspection of the peaks of accumulating 7-dehydrocholesterol in the chromatograms obtained in the qualitative assay described above. In order to avoid having to use isolated enzymes of each step of cholesterol

biosynthesis, we recently established a whole-cell assay for determination of the effect of inhibitors on total cholesterol biosynthesis.<sup>38</sup> The  $IC_{50}$  values were determined for phenethyltetrahydroisoquinolines **5f**, **5h**, and **5i** and for BM 15.766. In order to distinguish newly synthesized cholesterol from the large amounts of matrix cholesterol already present in the cells, incubation of the cells was performed in the presence of  $2-^{13}C$ -acetate in this assay. Due to the incorporation of several labeled acetate units into cholesterol, newly synthesized sterol can be determined selectively by GC-MS.<sup>38</sup> The  $IC_{50}$  values determined in this way correspond to percent inhibition of cholesterol biosynthesis in the whole-cell assay. The results are shown in Table 1. Compound **5f** displayed exceptionally high inhibitory activity.

**Table 1.**  $IC_{50}$  Values for Inhibition of Total Cholesterol Biosynthesis through Determination of  $^{13}C$  Incorporation into Newly Synthesized Cholesterol

compd	relative molecular mass	$IC_{50}$ value (nM)	confidence interval <sup>a</sup> (nM)	$R^2$ <sup>b</sup>
BM 15.766 sulfate	483.0	500	430–570	0.975
<b>5f</b>	317.8	2.3	2.0–2.6	0.979
<b>5h</b>	313.4	120	95–150	0.908
<b>5i</b>	343.4	7300	6,100–8,700	0.958

<sup>a</sup>Confidence interval for the  $IC_{50}$  value was 95%. <sup>b</sup> $R^2$  = goodness of fit of the dose–response curves.

## DISCUSSION

Since none of the new phenethyltetrahydroisoquinolines showed considerable cytotoxicity toward HL-60 cells in a MTT colorimetric assay ( $IC_{50}$  values  $>50 \mu M$ ), the compounds were considered to be nontoxic against human cells. In the agar diffusion assay, all compounds of interest were found to be not toxic against bacteria. Only compounds **5a**, **5e**, and **5i** showed poor inhibitory activity against one of the yeasts tested (*H. burtonii*). Despite the poor antifungal activity found in the agar diffusion assay, we investigated the effect of the phenethyltetrahydroisoquinolines on ergosterol biosynthesis in three yeast strains. None of the compounds gave rise to detectable changes in the sterol pattern of the yeasts, indicating that the enzymes of the post-squalene part of ergosterol biosynthesis are not targets of the compounds. Particularly with regard to the results obtained in the screening for inhibition of cholesterol biosynthesis in human cells, this is not surprising because no enzyme similar to the human 7-dehydrocholesterol reductase (v.i.) exists in yeasts and fungi.<sup>39,40</sup> Inhibition of other fungal enzymes in ergosterol biosynthesis had nevertheless been conceivable but was excluded with this assay.

In a whole-cell screening assay for inhibition of cholesterol biosynthesis in human cells, two established inhibitors of cholesterol biosynthesis from different chemical classes, AY 9944 and BM 15.766 (Scheme 2), were used as reference substances. Biochemically, AY 9944 was known to inhibit both  $\Delta 14$ -reductase and  $\Delta 8,7$ -isomerase at higher concentrations and 7-dehydrocholesterol reductase at lower concentrations.<sup>9,41</sup> BM 15.766 inhibits 7-dehydrocholesterol reductase selectively but with low potency. By reproducing these results with our screening system, we confirmed the validity of data obtained in the first step, namely, identification of the target enzymes. Phenethyltetrahydroisoquinolines **5a** and **5e** were found to

inhibit both  $\Delta 8,7$ -isomerase and 7-dehydrocholesterol reductase at higher concentration levels, while they exhibited selective inhibition of 7-DHCR at lower concentrations. Compounds **5b**, **5c**, **5j**, and **5k** selectively inhibited the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase. Compound **5d** showed no effect on cholesterol biosynthesis. Five compounds (**5f**–**5i** and **6**), were found to inhibit 7-DHCR only, with **5f**, **5h**, and **5i** showing the strongest inhibitory activity (Table 1). The  $IC_{50}$  values presented in Table 1 refer to inhibition of overall cholesterol biosynthesis in a whole-cell assay, but since 7-DHCR is the very last enzyme in this multistep biosynthesis, in all likelihood they reflect the selective inhibition of this enzyme. This is corroborated by two observations: (1) even at the much higher inhibitor concentration of  $50 \mu M$ , no other steroids were found to accumulate; and (2) nonselective inhibitors (**5a**, **5e**) were detected by our method. Furthermore, 7-DHCR is the very last enzyme in cholesterol biosynthesis, and for this reason downstream effects concealing the inhibition of additional enzymes in this biosynthesis can be excluded.

In view of the low number of compounds tested, structure–activity relationships (SAR) have a very tentative nature at this stage. However, all inhibitors of 7-DHCR (**5f**–**5i**, **6**), including the nonselective inhibitors **5a** and **5e**, have a hydroxy group at C-6 of the tetrahydroisoquinoline moiety in common. Additionally, all these compounds except **6** bear a methoxy group in the 7-position.

None of the selective inhibitors of  $\Delta 8,7$ -isomerase (**5b**, **5c**, **5j**, and **5k**) showed this substitution pattern. Derivatives that lacked a hydroxy group at C-6 and methoxy group at C-7 did not inhibit 7-DHCR. Hydroxylation at C-7 and introduction of a methoxy group in position 6 of the phenethyltetrahydroisoquinoline scaffold (**5d**) resulted in a loss of effects on cholesterol biosynthesis. So for the phenethyltetrahydroisoquinoline scaffold, the 6-hydroxy group appears to be a requirement for inhibition of 7-DHCR. The known inhibitors BM 15.766 and AY 9944 resemble **5f** in that they all bear a chlorine on one of the phenyl rings, but since **5h**, which does not bear an electron-attracting substituent on either phenyl ring, also has higher activity than BM 15.766, the importance of the substitution pattern of the phenyl ring annulated to the piperidine ring appears to be much higher for (selective) 7-DHCR inhibition than the pattern on the other aromatic moiety.

Further studies will provide more inhibitory data for an SAR analysis of the scaffold. This will address two important points, closely connected to each other, that were out of the scope of the present study: (1) determine the inhibition of isolated enzymes of the 7-DHC pathway and (2) on the basis of this with clogP and permeability data, detect the influence lipophilicity and cell membrane permeability of the compounds have on the effect seen in the present study. With some compounds showing selective inhibition of one or two enzymes of the human cholesterol biosynthesis, the phenethyltetrahydroisoquinoline scaffold holds promise for development of selective inhibitors even for other enzymes of this pathway.

## CONCLUSION

We have identified a new class of very active and selective inhibitors of 7-dehydrocholesterol reductase, the last enzyme in cholesterol biosynthesis. The compound **5f** showed 200 times stronger inhibition of cholesterol biosynthesis in a whole-cell assay than the established (commercially available) inhibitor BM 15.766 did under the same conditions. It was devoid of

## Journal of Medicinal Chemistry

## Article

(40) Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Robinson, J.; Burke, P. V.; Jiménez, D.; Oliver, E. Sterols in *erg* mutants of *Phycomyces*: metabolic pathways and physiological effects. *Steroids* **2002**, *67*, 403–409.

(41) Bae, S.-H.; Lee, J. N.; Fitzky, B. U.; Seong, J.; Paik, Y.-K. Cholesterol biosynthesis from lanosterol. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14624–14631.

(42) Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed; Document SANCO/10684/2009, SANCO guideline, 2009.

(43) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

### 1.2.7.3 Beitrag am Artikel

Die Charakterisierung der neu synthetisierten Substanzen als Inhibitoren der 7-DHCR und der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase wurde von mir durchgeführt, sowie die benötigten HPLC Reinheiten bestimmt. Nach anfänglicher Herstellung von Multienzyminhibitoren durch Aline Horling wurden auf meinen Nachdruck hin und unter gemeinsamer Diskussion der geplanten Strukturvariationen, weitere, optimierte Substanzen von Richard Barthel synthetisiert. Diese waren dann hochpotente Inhibitoren der 7-DHCR. Die Synthesepaltung und Durchführung unterlag Aline Horling, Richard Barthel und Prof. Dr. Peter Imming.

Folgende Teile in dem Artikel wurden von mir verfasst: Die „*Introduction*“ bis auf den chemischen Teil, der komplette Absatz „*Pharmacology*“, und in der „*Experimental section*“ der Teil „*Biological Assays, General*“, außerdem die Grafiken Schema 1 und Schema 5 sowie die Tabelle 1. In den „*Supporting Informations*“ (hier nicht abgebildet) stammen der Teil „*HPLC purity*“ und der Teil „*Biological assays*“ inklusive der Grafik von mir.

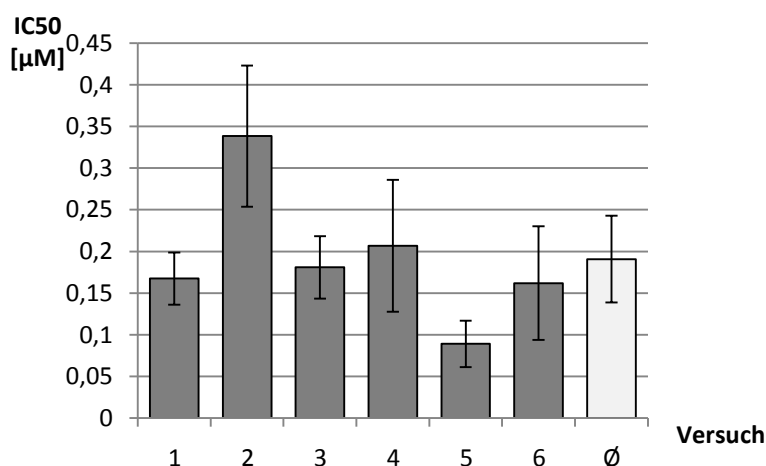
Die Verbesserung des Skripts unterlag Prof. Dr. Franz Bracher und Prof. Dr. Peter Imming.

### 1.2.8 Diskussion zur Cholesterol-Biosynthese-Testung

In den Kapiteln 1.2.1 bis 1.2.7 wurden verschiedene Substanzklassen für mögliche, pharmazeutisch relevante Einsatzgebiete vorgestellt und die Ergebnisse der biologischen Testungen präsentiert. Ein wichtiger Parameter war immer der  $IC_{50}$ -Wert bezogen auf die Gesamt-Cholesterol-Neubildung. Je niedriger der Wert, desto potenter kann eine Substanz die Cholesterol-Biosynthese hemmen. Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) gelten als Goldstandard zur Senkung des Cholesterol-Spiegels (siehe Kapitel 1.1).

Es stellte sich die Frage, wie sich die neu synthetisierten Substanzen bezüglich ihrer biologischen Kenndaten gegenüber einem bekannten Vertreter der Statine (Simvastatin) verhalten und wie valide die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte generell sind.

Die  $IC_{50}$ -Wert-Bestimmung für Simvastatin wurde an sechs verschiedenen Tagen durchgeführt, jeder Tagesmesswert resultiert aus einer standardmäßigen 3-fach Bestimmung. Aus den einzelnen Messwerten wurde dann eine „*Inter-day*“-Präzision berechnet. Der durchschnittliche  $IC_{50}$ -Wert lag bei 191 nM mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von 43 % (Abbildung 10). Die „*Inter-day*“-Präzision wurde auch im Ergosterol-Biosynthese-Assay anhand von Clotrimazol bestimmt, dort lag die RSD bei 29 % (Kapitel 1.3.1.2). Die Werte der Präzision sind für diese Art von biologischer Testung akzeptabel, beide Assays zeigten ähnliche Werte. Nicht nur der  $IC_{50}$ -Wert bezogen auf die Gesamt-Cholesterol-Neubildung spielt eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung neuer Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren sondern auch ihr  $IC_{50}$ -Wert im MTT-Test, der Aufschluss über die Zytotoxizität einer Substanz gibt. Viele neu synthetisierte Verbindungen hatten eine geringe Zytotoxizität. Ihr  $IC_{50}$ -Wert im MTT-Test lag bei  $> 25\mu\text{M}$ , für Simvastatin wurde von  $16\mu\text{M}$  bestimmt (vgl. Tabelle 4).



**Abbildung 10:** Ergebnisse der „*Inter-Day*“-Präzision für die  $IC_{50}$ -Wert-Bestimmung am Beispiel Simvastatin; Fehlerbalken zeigen die RSD ( $n = 3$ ).

## ZUSAMMENFASSUNG

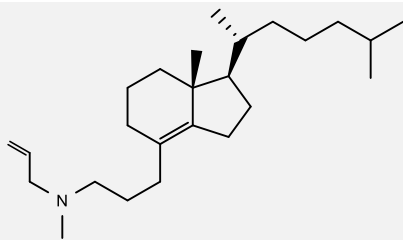
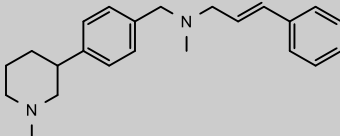
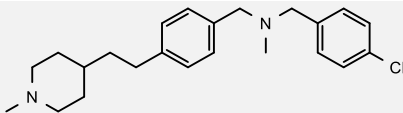
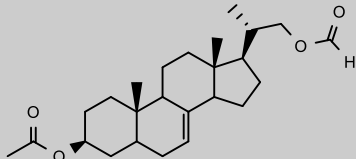
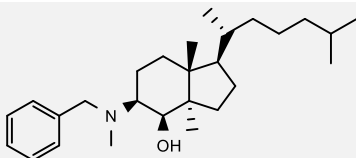
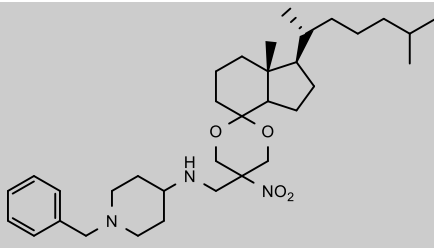
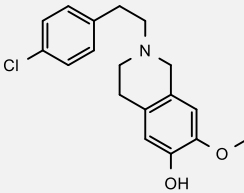
### Bedeutung der neu entwickelten Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren (Tabelle 3):

- Der Schwerpunkt der Cholesterol-Biosynthese-Testung lag in der Charakterisierung von neuen OSC-Inhibitoren. OSC-Inhibitoren scheinen immer noch geeignet zu sein als Cholesterolsenker und als Chemotherapeutika (Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3).
- Die Charakterisierung neuer  $\Delta^{24}$ -Reduktase-Inhibitoren gelang mit den Lathosterol-Seitenkettenestern von Sandra Hemmers (Kapitel 1.2.4). Sie können als molekulare Werkzeuge zur Erforschung der Desmosterolose eingesetzt werden. Ihr Einsatz als Chemotherapeutika oder als Adjuvants in der Alzheimer Therapie scheint möglich.
- Die Identifizierung neuer  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren könnte einen Beitrag zur Aufklärung der Pathomechanismen von CHILD- und CDPX2-Syndrom leisten (Kapitel 1.2.5, 1.2.6). Hierbei erwiesen sich vor allem die Verbindungen von Mathias König als sehr interessant.
- Mit der Charakterisierung von neuen 7-Dehydrocholesterolreduktase-Inhibitoren kann das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom besser erforscht werden (Kapitel 1.2.7). Dem Syndrom kommt innerhalb der Cholesterol-Biosynthese-assoziierten Erkrankungen die größte Bedeutung zu, da die Inzidenz dieser Krankheit am höchsten ist.

### Generelles Fazit der Cholesterol-Biosynthese Testung:

- Die Entwicklung von neuen Enzyminhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese gelang durch die Verwendung von bereits bekannten Strukturmerkmalen, unter Zuhilfenahme von Docking Studien und durch Ergebnisse aus Tests am isolierten Enzym.
- Insgesamt wurden 340 Substanzen charakterisiert, von 35 ausgewählten Substanzen wurde der  $IC_{50}$ -Wert der Hemmung der Gesamt-Cholesterol-Biosynthese bestimmt, darunter waren 30 neu synthetisierte Substanzen (Tabelle 4). Zwölf Verbindungen zeigten im Cholesterol-Biosynthese-Assay sogar einen  $IC_{50}$ -Wert im unteren nanomolaren Bereich ( $< 100$  nM).
- Die „Trefferquote“ für die Entdeckung neuer Enzyminhibitoren war sehr hoch, was sicherlich an der Vorgehensweise bei der Entwicklung der Zielstrukturen gelegen hat, aber auch daran, dass mit unserem Assay acht Enzyme gleichzeitig im Cholesterol-Biosynthese-Assay betrachtet werden können. Hier liegt sicherlich der größte Vorteil eines Ganzzell-Assays.
- Einige Inhibitoren hemmen zwar unterschiedliche Targetenzyme, besitzen aber gleiche Strukturmerkmale, nämlich die Grundmanns Keton-Struktur (vgl. Tabelle 3). So weisen die Verbindungen von Stefanie Lange OSC-Inhibition, die von Mathias König und Melanie Krojer eine Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Aktivität auf.

- Die Verbindungen von Aline Horling und Richard Barthel erschienen auf den ersten Blick als total uninteressant, da sie über keine strukturelle Ähnlichkeit zu den Sterolen verfügen, gerade deshalb sind sie vielleicht am interessantesten, da mit keiner Inhibition in der Cholesterol-Biosynthese gerechnet wurde. Dass daraus sogar die Entwicklung hochpotenter und selektiver Inhibitoren hervorgeht war nicht zu erwarten.
- Im Grunde kann keine Enzyminhibition im Post-Squalen-Abschnitt der Cholesterol-Biosynthese vorausgesagt werden, bevor die Substanz nicht selbst am eigenen System getestet wurde. Einige Referenzinhibitoren erwiesen sich in unserem Ganzzell-Assay als Multienzyminhibitoren, da sie im Vorfeld nur am isolierten Enzym untersucht wurden. Dabei kann es nur zwei Wirkungen geben a) aktiv oder b) inaktiv. Der hier angewendete und optimierte Ganzzell-Assay ermöglicht einem geschulten Anwender die Identifizierung von verschiedensten Enzyminhibitoren in der Cholesterol-Biosynthese.
- Im nachfolgenden Kapitel 1.3 wird die Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren besprochen. Der Grundstein für die folgenden Untersuchungen waren die Erfahrungen aus der Cholesterol-Biosynthese-Testung, da die Humanzellen über eine deutlich strengere („eingeschränktere“) Enzymabfolge in den Cholesterol-Biosynthesewegen (Bloch-Pathway und Kandutsch-Russel-Pathway) verfügen als Pilze in ihrer Ergosterol-Biosynthese (vgl. Abbildung 5 mit 1.3.1.2).

Struktur	Herkunft	Kapitel	Inhibiertes Enzym	IC <sub>50</sub> -Wert Cholesterol-Assay [nM]
	Stefanie Lange	1.2.1	OSC	Nicht bestimmt
	Marco Keller	1.2.2	OSC	1100
	Annette Wolfgardt	1.2.3	OSC	11
	Sandra Hemmers	1.2.4	$\Delta^{24}$ -Reduktase	11
	Mathias König	1.2.5	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	11
	Melanie Krojer	1.2.6	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	1700
	Richard Barthel	1.2.7	7-DHCR	2

**Tabelle 3:** Übersicht über die potentesten Verbindungen in den einzelnen Kapiteln der Cholesterol-Biosynthese-Testung



Name	Herkunft	Inhibiertes Enzym	IC <sub>50</sub> -Wert Cholesterol-Assay [nM]	IC <sub>50</sub> -Wert MTT-Test [µM]
Simvastatin	Referenz	HMG-CoA	191	16
AW-93	Annette Wolfgardt	OSC	11	> 50
AW-94	Annette Wolfgardt	OSC	30	12
AW-98	Annette Wolfgardt	OSC	97	15
AW-111	Annette Wolfgardt	OSC	142	> 50
AW-124	Annette Wolfgardt	OSC	172	33
AW-138	Annette Wolfgardt	OSC	17	33
AW-152	Annette Wolfgardt	OSC	261	> 50
AW-166	Annette Wolfgardt	OSC	125	41
BIBX 79	Referenz	OSC	300	> 50
MK2-44	Marco Keller	OSC	681	> 50
MK2-74	Marco Keller	OSC	1100	> 50
MK2-86	Marco Keller	OSC	372	> 50
MK2-87	Marco Keller	OSC	2135	> 50
MK2-89	Marco Keller	OSC	1321	> 50
MK2-90	Marco Keller	OSC	1290	> 50
MK3-03	Marco Keller	OSC	2286	28
MK3-14	Marco Keller	OSC	1070	> 50
MK3-18	Marco Keller	OSC	1839	19
MK3-19	Marco Keller	OSC	1281	47
Ro 48-8071	Referenz	OSC	92	8
Hem-MS-3	Sandra Hemmers	Δ <sup>24</sup> -Reduktase	11	> 50
SH-41	Sandra Hemmers	Δ <sup>24</sup> -Reduktase	416	4
Koe-121	Mathias König	Δ <sup>8/7</sup> -Isomerase	16	7

Name	Herkunft	Inhibiertes Enzym	IC <sub>50</sub> -Wert Cholesterol-Assay [nM]	IC <sub>50</sub> -Wert MTT-Test [μM]
Koe-123	Mathias König	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	62	16
Koe-144	Mathias König	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	11	7
Koe-152	Mathias König	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	18	7
Koe-158	Mathias König	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	82	12
Koe-76-2	Mathias König	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	577	14
AP-59	Aline Horling	7-DHCR	12	> 50
BM 15.766	Referenz	7-DHCR	500	nicht getestet
RB-32	Richard Barthel	7-DHCR	120	> 50
RB-33	Richard Barthel	7-DHCR	7300	> 50
RB-38	Richard Barthel	7-DHCR	2	> 50

**Tabelle 4:** Übersicht über die IC<sub>50</sub>-Wert Bestimmung im Cholesterol-Biosynthese-Assay aller im quantitativen Assay getesteten Verbindungen

## 1.3 Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren

„Die Ergosterol-Biosynthese ist die „Achillesferse“ von Pilzen und Hefen.“

Franz Bracher

Der französische Chemiker und Pharmazeut Tanret isolierte 1889 Ergosterol erstmals aus Mutterkorn (engl. ergot). Ein Vierteljahrhundert später konnte Smedley-MacLean Ergosterol aus einer *Saccharomyces*-Art gewinnen. Die Strukturaufklärung von Ergosterol erfolgte schließlich 1933 durch den amerikanischen Chemiker Louis Frederik Fieser [31].

Was Cholesterol für die *Mammalia*-Zellen ist, ist Ergosterol für Pilzzellen. Ergosterol ist hauptsächlich für die Stabilität, Rigidität, Fluidität, die mechanische Widerstandsfähigkeit und für die Permeabilität der Zellmembran verantwortlich [31, 32]. Außerdem ist Ergosterol für die Funktion membranständiger Enzyme von Bedeutung [33]. Pilzzellen müssen Ergosterol endogen produzieren um überlebensfähig zu bleiben.

Das letzte gemeinsame Bindeglied zwischen der Säuger- und der Pilz-Sterol-Biosynthese ist Lanosterol (Abbildung 1), sprich der erste Abschnitt der Sterol-Biosynthese ist identisch (Abbildung 4). Erst der zweite Abschnitt, welcher sich mit Modifikationen des Sterolgerüsts befasst, verläuft bei den Pilzen über andere Sterol-Zwischenstufen. Wurde in der Arbeit von Jörg Müller noch von einem „einfachen“ Sterol-Biosyntheseweg, d.h. einer festen Abfolge von nacheinander ablaufenden Enzymreaktionen, ausgegangen, muss dies nach aktuellem Stand revidiert werden [32]. Im Cholesterol-Biosyntheseweg, gab es nur zwei Möglichkeiten, den Kandutsch-Russell-Pathway und den Bloch-Pathway. Auch Martin Giera beschränkte sich in seiner Dissertationsschrift auf einzelne Markersterole, welche die Inhibition bestimmter Enzyme der Ergosterol-Biosynthese indizieren, ohne auf ein Biosyntheschema einzugehen [1]. Beide verwendeten in ihren Arbeiten nur den Modellorganismus *Yarrowia lipolytica*.

Durch die von mir vorgenommene Einführung von zwei weiteren Pilzspezies (*Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*) für die Ergosterol-Biosynthese-Testung und die Analysen von diversen pathogenen Pilzstämmen (z.B. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart (Kapitel 1.3.2) und der Sektion für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Innsbruck (Kapitel 1.3.3), muss von deutlich differenzierteren Ergosterol-Biosynthesewegen ausgegangen werden. Diese Sterol-Biosynthesewege werden in Kapitel 1.3.1.2 und Kapitel 2.3.2.1.2 vorgestellt. Zwar wurden bereits früher verschiedenste Biosynthesewege vorgestellt, jedoch nicht in der Übersichtlichkeit und dem Umfang wie hier. Eine Vielzahl an Enzymreaktionen kann in unterschiedlicher Reihenfolge ablaufen, da die Substratspezifität der Ergosterol-Biosynthese-Enzyme weniger stark ausgeprägt ist als die der Enzyme der Cholesterol-Biosynthese (vgl. Abbildung 5). So lieferte z.B. Analyse von *Candida krusei* unter Inkubation

mit einem neuen C14-Demethylase-Inhibitor (vgl. Kapitel 2.3.2.1.2) die Akkumulation von sechs nicht physiologisch vorkommenden Sterolen, alles charakteristische Markersterole für eine Inhibition der C14-Demethylase.

Ziele dieses Teils meiner Arbeit waren:

- Die Weiterentwicklung der in unserem Arbeitskreis von Jörg Müller und Martin Giera etablierten Assays zur Charakterisierung von Inhibitoren der Ergosterol-Biosynthese [1, 32]. Dabei legte Jörg Müller den Grundstein für die Ergosterol-Biosynthese-Testung. Martin Giera hat, aufbauend auf dem von ihm entwickelten Cholesterol-Biosynthese-Assay, einige Modifikationen im Ergosterol-Biosynthese-Assay vorgenommen [2]. Durch meine Arbeiten, Einführung weiterer Testorganismen, Optimierung der MHK-Bestimmung, Überarbeitung des gesamten Testablaufs (qualitativer Assay), Einführung einer IC<sub>50</sub>-Wert Bestimmung bezogen auf die Gesamt-Ergosterol-Neubildung (quantitativer Assay; mittels <sup>13</sup>C-Acetat-Einbau in das Sterolgerüst) konnte eine leistungsfähige und im Routinebetrieb funktionierende Methode entwickelt werden (vgl. Kapitel 1.3.1). Dabei wurde ich zum Teil von Verena Staudacher unterstützt [33].
- Die Charakterisierung unserer eigenen synthetisierten Cholesterol-Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren (vgl. Abbildung 3) im Hinblick auf ihre Selektivität in den Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese-Assays (vgl. Kapitel 1.2)
- Entwicklung neuer Antimykotika in Zusammenarbeit mit meinen präoperativ arbeitenden Kollegen (vgl. Kapitel 1.3.2.2, 1.3.2.3)
- Charakterisierung von noch unbekannten Sterolen (vgl. Kapitel 1.3.2.1)
- Erforschung neuer Ergosterol-Biosynthesewege (vgl. Kapitel 1.3.2.1, 1.3.3)

Die Behandlung von Pilzinfektionen mit Antimykotika spielt in der heutigen Zeit eine immer größer werdende Rolle, da es eine steigende Zahl an Risikofaktoren gibt. Dazu gehört Immunsuppression, hervorgerufen durch AIDS oder immunsuppressiv wirkende Arzneistoffe bei Krebs und Organtransplantationen. Auch die steigende Zahl an älter werdenden Menschen mit einer geschwächten Immunabwehr ist ein wichtiger Faktor [34]. Hinzu kommt eine steigende Resistenzentwicklung von Pilzen gegenüber derzeit verwendete Antimykotika [35, 36, 37].

Ein wichtiger selektiver Angriffspunkt von Antimykotika ist die Ergosterol-Biosynthese. Die Biosynthesen von Cholesterol und Ergosterol verlaufen zwar sehr ähnlich, jedoch gibt es entweder eine Substrat-Enzym-Spezifität, eine konzentrationsabhängige Wirkspezifität oder aber ein komplettes Fehlen einzelner Enzyme, so kommen z.B. die C22-Desaturase und die C24-Methyltransferase nur im Pilz vor, was einen selektiven Angriffspunkt für Antimykotika eröffnet.

Im Nachfolgenden werden kurz die therapeutisch relevanten Antimykotika vorgestellt.

## BESCHREIBUNG DER SUBSTANZKLASSEN (WIRKSTOFFE) (vgl. Abbildung 11)

- **Pyrimidin-Antimykotika (Flucytosin)**

Wirkmechanismus: Flucytosin wird durch eine Cytosin-Permease in die Zelle aufgenommen und durch enzymatische Deaminierung zu 5-Fluoruracil, welches nach Diphosphorylierung als falsches Substrat in die RNA eingebaut wird. Dadurch kommt es zur Störung der Protein-Biosynthese. Außerdem wird 5-Fluoruracil durch die Ribonucleotid-Reduktase zu 5-Fluor-Desoxyuridinmonophosphat (FdUMP), welches ein Inhibitor der Thymidylat-Synthase ist. Dies führt zur Blockade der DNA-Synthese [7, 36].

Nutzen: Wird in Kombination mit Amphotericin B (AmB) bei tiefen Organmykosen systemisch verabreicht. Das Wirkspektrum reicht von Hefearten wie *Candida* zu *Cryptokokken* und *Aspergilla* [7]. Die Aktivierung von Flucytosin mit Hilfe der Cytosin-Deaminase gilt als weitgehend selektiv für Pilzzellen, da Säugetierzellen keine oder nur eine schwache Aktivität des Enzyms besitzen. Wird das Molekül nicht verstoffwechselt gilt es als relativ untoxisch [35].

Nachteile: Der Einsatz von Flucytosin kann zur Leberschädigung und zu hämatologischen Störungen führen. Es gilt als kontraindiziert in der Schwangerschaft und kann nur unter besonderer Vorsicht bei gleichzeitiger Zytostatika- und Strahlentherapie eingesetzt werden. Zudem muss es meist in Kombination mit Amphotericin B verabreicht werden [7].

Resistenzmechanismus: Durch Verlust oder Mutation der beteiligten Enzyme kommt es rasch zur Ausbildung von Resistenzen, da Flucytosin nicht mehr aktiviert wird. Davon betroffen ist vor allem die UMP-Pyrophosphorylase. Resistenzen wurden bei *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Cryptococcus neoformans* beschrieben [35]. Eine Monotherapie mit Flucytosin ist daher nicht sinnvoll.

- **Polyen-Antimykotika** (Amphotericin B, Nystatin)

Wirkmechanismus: Amphotericin B (AmB) und Nystatin bilden durch hydrophobe Wechselwirkungen 1:1 Addukte mit Ergosterol, diese lagern sich in die Zellmembran von Pilzen ein. Dadurch kommt es zur Porenbildung in der Zellmembran, was einen verstärkten Efflux von Elektrolyten und anderen Stoffen zur Folge hat. Außerdem kommt es zur oxidativen Zellmembranschädigung [7, 35]. Gray et al. [38] entdeckten erst kürzlich (2011), dass AmB durch bloße Bindung an Ergosterol Pilzzellen schädigt, da Ergosterol so dem Stoffwechsel von Pilzzellen entzogen wird.

Nutzen: AmB wird als systemisches und Nystatin als lokal wirksames Antimykotikum eingesetzt. AmB wirkt gegen *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* und *Blastomyces*-Arten. Das Auftreten von Resistenzen wurde bisher nur selten beobachtet [7].

Nachteile: AmB besitzt eine hohe Licht- und Oxidationsempfindlichkeit. In bis zu 80% der Therapien tritt eine schwerwiegende Zellschädigung auf. Diese macht sich durch Fieber, Kopfschmerzen, Diarrhoe, Kreislaufkollaps und Blutbildveränderungen bemerkbar. Daneben ist AmB noch nephro- und neurotoxisch [7].

Resistenzmechanismus: Die Resistenzentwicklung gegenüber Polyen-Antimykotika ist gering. Nur in wenigen Fällen wurde eine veränderte Zellmembranstruktur festgestellt. Diese beruht auf einer geringeren Ergosterol-Einlagerung in die Membran bzw. auf einer Änderung des Sterol-Phospholipidverhältnisses [36].

- **Allylamin-Antimykotika** (Naftifin, Terbinafin)

Wirkmechanismus: Allylamin-Antimykotika greifen in die Ergosterol-Biosynthese ein und hemmen die Squalenepoxidase, welche Squalen zu Squalenepoxid oxidiert (Abbildung 1) [35].

Nutzen: Terbinafin kann systemisch eingesetzt werden, hingegen Naftifin nur topisch. Beide werden gegen Dermatophyten und Onchomykosen verwendet [7].

Nachteile: *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Candida tropicalis* gelten als Allylamin-resistent [7].

Resistenzmechanismus: Durch eine verringerte Affinität des Wirkstoffes zur Squalenepoxidase und durch eine verringerte Wirkstoffaufnahme kam es zu Resistenzen [35].

- **Imidazol-Antimykotika** (z.B. Clotrimazol, Ketoconazol)

Wirkmechanismus: Die Imidazol-Antimykotika hemmen ebenfalls die Ergosterol-Biosynthese. Dabei wird die Umwandlung von Lanosterol durch die C14-Demethylase gehemmt (siehe Kapitel 1.3.1.2 im Artikel Abbildung 6). Dieses Enzym gehört zur Superfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme [35].

Nutzen: Ketoconazol kann systemisch angewendet werden, Clotrimazol aufgrund eines sehr hohen „First-pass“ Effektes nur lokal. Das Wirkspektrum umfasst Sprosspilze (z.B. *Candida supp.*), Dermatophyten (z.B. *Trichophyton supp.*) und dimorphe Pilze (*Cryptococcus supp.*) [7].

Nachteile: Auch P450-abhängige Monooxygenasen des menschlichen Körpers werden gehemmt [7]. Ketoconazol ist lebertoxisch und zeigt ein deutliches Eingreifen in das menschliche P450-System, daher will die EMA Ketoconazol für orale Zubereitungen verbieten [39]. Eine Hemmung der Hormonbiosynthese wurde ebenfalls beobachtet [40].

Resistenzmechanismus: Die Resistenzmechanismen für Azol-Antimykotika sind sehr vielfältig. Es wurde eine Überexpression der C14-Demethylase, alternative Sterol-Biosynthesewege und eine erniedrigte Affinität des Wirkstoffs zum Enzym beobachtet [41].

- **Triazol-Antimykotika** (z.B. Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol)

Wirkmechanismus: Auch die Triazol-Antimykotika hemmen die Umwandlung von Lanosterol durch die C14-Demethylase (siehe Kapitel 1.3.1.2, im Artikel Abbildung 6). [35].

Nutzen: Beide Triazol-Antimykotika sind systemisch anwendbar. Itraconazol wirkt besonders gegen Dermatophyten und Schimmelpilze [40]. Voriconazol gilt als erstes Azolantimykotikum das gegen ZNS-Mykosen (vgl. invasive Aspergillose, Kapitel 1.3.3) eingesetzt werden kann [37].

Nachteile: Auch P450-abhängige Monooxygenasen des menschlichen Körpers werden gehemmt [7]. Fluconazol ist unwirksam gegen *Aspergillus*- und *Candida*-Arten und Itraconazol ist erst in hohen Konzentrationen wirksam gegen *Candida*-Arten [35, 40].

Resistenzmechanismus: Triazol-Antimykotika weisen dieselben Resistenzmechanismen wie Imidazol-Antimykotika auf.

- **Morpholin-Antimykotika** (Amorolfin)

Wirkmechanismus: Amorolfin hemmt die  $\Delta^{14}$ -Reduktase und die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase in der Ergosterol-Biosynthese (siehe Kapitel 1.3.1.2, im Artikel Abbildung 7) [35].

Nutzen: Der Einsatz ist auf Dermatophyten zur topischen Anwendung und bei Onychomykosen beschränkt [7].

Nachteile: Aufgrund einer raschen Metabolisierung und starken Eiweißbindung ist Amorolfin als systemisches Antimykotikum unbrauchbar [40]. Am Auftragungsort kann es zu lokalem Juckreiz, Rötung oder Brennen kommen [7].

Resistenzmechanismus: Unter Dauermedikation können sich einzelne Resistenzen gegenüber Amorolfin bilden, per se resistente Stämme sind nicht bekannt, sowie auch keine spezifischen Resistenzmechanismen [35].

- **Benzofuran-Antimykotika** (Griseofulvin)

Wirkmechanismus: Der Wirkmechanismus von Benzofuran-Antimykotika ist noch nicht ganz geklärt. Wahrscheinlich wirken sie durch Hemmung der Hyphenzellwandsynthese, Bindung an RNA, Wechselwirkungen mit der Nukleinsäuresynthese und durch Inhibition der Mikrotubulieausbildung [37].

Nutzen: Griseofulvin kann oral gegen Dermatophyten eingesetzt werden [7].

Nachteile: Die Therapie darf nur nach mykologischem Befund erfolgen, zudem besitzt Griseofulvin ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis. Im Tierexperiment war es zudem teratogen [7].

Resistenzmechanismus: Spezifische Resistenzmechanismen gegenüber Griseofulvin sind noch nicht bekannt.

- **Echinocandine** (Caspofungin)

Wirkmechanismus: Hemmung der  $\beta$ -1,3-D-Glucan-Synthese, welches essentiell für die Zellwand von Pilzzellen ist. Dadurch wird die Zelle stärker angreifbar für eine osmotisch bedingte Zellyse [37].

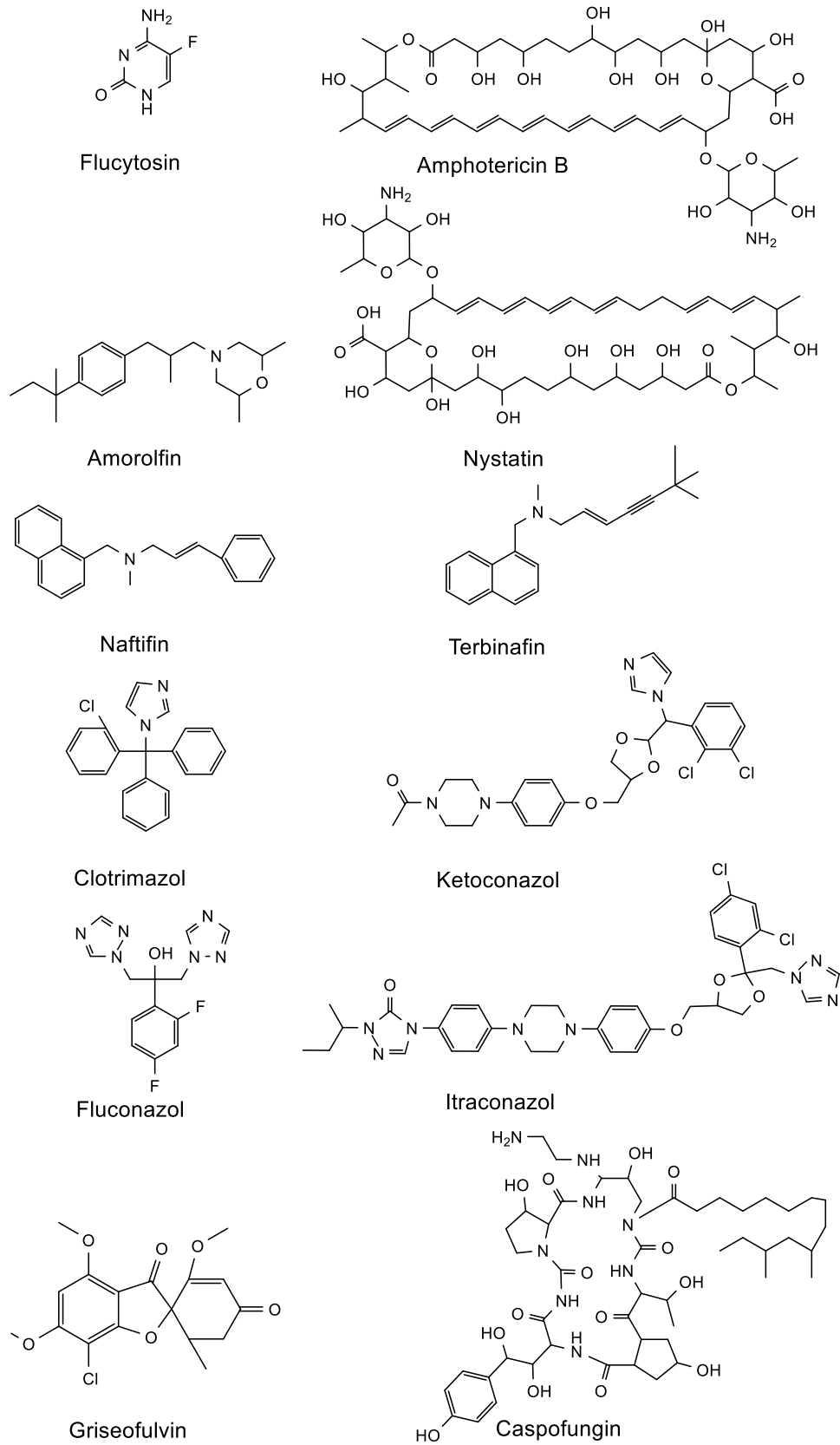
Nutzen: Die Echinocandine besitzen einen sehr spezifischen Wirkmechanismus, daher können sie oftmals gegen Azol- und/oder AmB-resistente Stämme eingesetzt werden. Sie wirken gegen verschiedene *Aspergillus*- und *Candida*-Arten [7].

Nachteile: Die Therapie sollte nur von erfahrenen Ärzten auf dem Gebiet invasiver Mykosen durchgeführt werden. Als Nebenwirkungen treten Fieber, gastrointestinale Störungen, hämatologische Veränderungen und ein Anstieg der Transaminasenaktivität auf [7].

*Candida parapsilosis*, *Cryptococcus*-, *Rhodotulura*- und *Trichosporon*-Arten gelten als resistent gegenüber Caspofungin [37].

Resistenzmechanismus: Spezifische Resistenzmechanismen gegenüber den Echinocandinen sind noch nicht bekannt.



**Abbildung 11:** Strukturen klinisch relevanter Antimykotika

## FAZIT

Die Entwicklung von neuen Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren ist von großem pharmazeutischen Interesse. Es ist eine fortschreitende Resistenzentwicklung von Pilzen gegenüber derzeit klinisch eingesetzten Antimykotika zu beobachten, zudem bergen einige Wirkstoffe ein großes Nebenwirkungspotenzial. Die Ergosterol-Biosynthese ist ein lange etabliertes Target einer antimykotischen Therapie, daher können relativ leicht neue Inhibitoren mit bekanntem Wirkmechanismus entwickelt werden. Derzeit sind nur drei Enzyme von acht möglichen, die C14-Demethylase, die  $\Delta^{14}$ -Reduktase und die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase Targets von klinisch verwendeten Antimykotika im Post-Lanosterol-Abschnitt der Ergosterol-Biosynthese. Um neue Enzym-Inhibitoren charakterisieren zu können, bedarf es eines aussagekräftigen Testverfahrens. Anhand dieses Testsystems können neue Verbindungen getestet und somit neue Inhibitoren gefunden werden, nicht nur für bereits klinisch relevante Zielenzyme, sondern auch für bisher weniger adressierte. Martin Giera konnte schon mit seinem Testsystem neue Inhibitoren der  $\Delta^{24}$ -Sterol-Methyltransferase charakterisieren [42]. Die Entwicklung weiterer Inhibitoren kann mit einem deutlich verbesserten Screening-Verfahren die Selektivität (Cholesterol/Ergosterol) gegenüber einem Organismus bestätigen und die Identifizierung neuer Sterole in verschiedensten Pilzen ermöglichen.

Die Entwicklung und Anwendung eines neuen Testsystems für die Ergosterol-Biosynthese im Post-Lanosterol-Abschnitt wird in Kapitel 1.3.1 vorgestellt. Neue Antimykotika werden in den Kapiteln 1.3.2.1, 1.3.2.2 und 1.3.2.3 beschrieben, sowie die Identifizierung neuer Sterole in Kapitel 2.3.2.1.2. Darüber hinaus beschreibt Kapitel 1.3.3 eine Anwendung der Sterolanalytik. Dabei wurden Pilzzellen unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt und das Sterolmuster sowohl qualitativ wie auch quantitativ untersucht. Ziel war es, die erhöhte oder erniedrigte Sensitivität der Antimykotika unter den vorliegenden Bedingungen (Normoxie oder Hypoxie) zu erklären.

### 1.3.1 Entwicklung eines Testsystems zur Charakterisierung von Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren

**Müller C, Staudacher V, Krauss J, Giera M, Bracher F.** A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total ergosterol biosynthesis. *Steroids* 2013;78:483-93.

#### 1.3.1.1 Zusammenfassung

Aufgrund steigender Resistenzen von pathogenen Pilzen und einer steigenden Zahl an Patienten, die an Pilzkrankungen leiden, müssen neue Antimykotika entwickelt werden. Damit neue Antimykotika gefunden werden können bedarf es aussagekräftiger Testsysteme. Die Angriffspunkte von Antimykotika können in fünf Kategorien eingeteilt werden: Beta-Glucan-Synthese-Inhibitoren (Echinocandine), Nukleinsäure-Biosynthese-Inhibitoren (z.B. 5-Fluorcytosin), Mitose-Inhibitoren (Griseofulvin), Membranfunktions-Inhibitoren (z.B. Amphotericin B) und Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren (z.B. Ketoconazol) (vgl. Kapitel 1.3). Die Ergosterol-Biosynthese kann eingeteilt werden in zwei Abschnitte, den Prä-Sterol-Abschnitt und den Post-Lanosterol-Abschnitt. Im ersten Teil wird aus aktivierten Isopreneinheiten ein offenkettiger C<sub>30</sub>-Grundkörper (Squalen) aufgebaut (siehe Abbildung 4). Durch die Enzymaktivität der Squalenepoxidase und der Oxidosqualencyclase, beides Angriffspunkte von möglichen Antimykotika, wird schließlich Lanosterol, das erste Sterol in der Ergosterol-Biosynthese gebildet. Die Substrate beider Enzyme werden zwar von dem nachfolgenden beschriebenen Testsystem prinzipiell detektiert, jedoch wurden sie nicht in den Assay integriert (siehe Begründung in Kapitel 1.3.4). Im zweiten Abschnitt der Ergosterol-Biosynthese (Post-Lanosterol-Abschnitt) sind insgesamt acht verschiedene Enzyme beteiligt, die die Modifikationen am Sterolgerüst vornehmen um schließlich zum Endprodukt Ergosterol zu gelangen. Die am häufigsten eingesetzten Antimykotika hemmen Enzyme im zweiten Abschnitt der Ergosterol-Biosynthese.

Der nachfolgende Artikel beschreibt die Entwicklung eines Screening-Verfahrens, welches es ermöglicht, neu synthetisierte Substanzen im Post-Lanosterol-Abschnitt zu charakterisieren. Zuerst wird an drei verschiedenen Pilzstämmen, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica*, in Flüssigkultur die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Die MHK ist die Konzentration, bei der gerade kein Pilzwachstum mehr stattfindet. In einem weiteren Test kann nun der Einfluss der Substanzen auf die Ergosterol-Biosynthese überprüft werden, indem die Effekte auf die Ergosterol-Biosynthese bei den Testkonzentrationen MHK/2 und MHK/5 analysiert werden. Nach 48 h Inkubation der Pilzzellen mit der Testsubstanz werden die Zellen vom Medium befreit und bei 70 °C im Trockenschrank eine Stunde mit 2M Natronlauge lysiert. Anschließend folgt eine zweifache Liquid-Liquid Mikroextraktion mittels *tert*-Butylmethylether (TBME). Der organische Extrakt wird mit einer dispersiven Festphasenextraktion (dSPE) aufgereinigt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand

wird in TBME aufgenommen und zur besseren Detektion wird noch eine Mischung von Silylierungsreagenzien MSTFA/TSIM (9:1) dazugegeben. Die Analyse erfolgt mit GC-MS (Ionenfalle, engl. *iontrap*).

Durch Vergleich von Blindproben ohne Inhibitor mit Proben mit Inhibitor kann bei einem Eingreifen in die Ergosterol-Biosynthese ein verändertes Sterolmuster detektiert werden. Um Targetenzyme neuer Inhibitoren sicher identifizieren zu können, wurden zunächst Referenzinhibitoren untersucht, um ihre typischen Veränderungen des Sterolmusters zu erkennen und charakteristische Markersterole für diese Enzyminhibition zu identifizieren. Es wurden aus der Klasse der C14-Demethylase-Inhibitoren Clotrimazol, aus der Klasse der C24-Methyltransferase-Inhibitoren DR-180 [42] (von Delphine Renard aus unserem Arbeitskreis entwickelt) und aus der Klasse der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren Tridemorph untersucht. Auf Basis der erhaltenen Sterolmuster wurden im Abgleich mit der Literatur verschiedene Biosynthese-Schemata aufgestellt und eine Sterol-GC-MS-Datenbank erstellt. Auf diese Weise lässt sich, wie im Prinzip von Jörg Müller und Martin Giera an einem Testorganismus gezeigt, das/die Zielenzym(e) von Inhibitoren identifizieren. Die neu erstellte Datenbank ist wesentlich umfangreicher als die bisherigen. Nach erfolgreicher qualitativer Analyse kann in weiteren Versuchen eine quantitative Aussage über die Hemmung der Gesamt-Ergosterol-Biosynthese getroffen werden. Hierzu muss nur während der Inkubation mit dem Enzyminhibitor  $^{13}\text{C}$ -markiertes Acetat den Pilzzellen zugefüttert werden. Ein Einbau von maximal 15 Acetat-Einheiten in das Ergosterolgerüst ist möglich, jedoch wurde ein durchschnittlicher Einbau von nur 4 Acetat-Einheiten beobachtet. Durch geeignete Wahl von sogenannten *Ergosterol-Quantifier-Ions* kann neu gebildetes  $^{13}\text{C}$ -markiertes Ergosterol selektiv neben bereits vorhandenem Ergosterol bestimmt werden (vgl. Kapitel 1.3.1.2; Abbildung 9 im nachfolgend abgebildeten Artikel). Durch Messung bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen kann eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve aufgestellt und ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt werden.

In Versuchen zeigte sich, dass alle drei eingesetzten Pilze unterschiedliche Sterolmuster bilden, jedoch kann fast immer eine eindeutige Identifizierung des Targetenzyms erreicht werden. Für den quantitativen Assay war *Candida glabrata* am besten geeignet, da der Pilz kein störendes Nebensterol (24(28)-Dehydroergosterol) wie *Yarrowia lipolytica* bildet und keine Anzeichen für eine Hochregulierung von Enzymen der Ergosterol-Biosynthese unter Inhibitor-Einfluss beobachtet wurden, wie bei *Saccharomyces cerevisiae*. Anhand von nicht physiologisch vorkommenden Sterolen konnte die Methode bezüglich Linearität, Wiederfindung, Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze validiert werden. Die Wiederholpräzision für die  $\text{IC}_{50}$ -Wert-Bestimmung an *Candida glabrata* mit Clotrimazol wurde ebenfalls an sechs Tagen durchgeführt (vgl. Kapitel 1.2.8). Der Variationskoeffizient lag dabei bei 29 % ( $n = 6$ ). Die Überprüfung des erarbeiteten Assays wurde mit der Charakterisierung des neu synthetisierten Inhibitors **JK-250** bewerkstelligt. Dieser zeigte eine Hemmung der  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase bei einer Wirkstärke, welche vergleichbar ist mit der des C14-Demethylase-Inhibitors Clotrimazol.

In dem Biosynthese-Schema und in den alternativen Sterol-Biosynthesewegen werden 23 verschiedene Sterole aufgeführt, die physiologisch oder nach Inkubation mit Enzyminhibitor auftreten, 18 davon konnten im Rahmen dieser Arbeit detektiert und näher beschrieben werden.

Insgesamt lassen sich mehr als 50 Proben pro Tag analysieren, bei geringen Kosten für Verbrauchsmaterialien. Eine vorliegende Inhibition der Ergosterol-Biosynthese im Post-Lanosterol-Abschnitt kann eindeutig erkannt werden. Eine spezifische Wirkung der Substanz auf die Ergosterol-Biosynthese kann von einer unspezifischen antimykotischen Wirkung der Substanz, erkennbar an einem niedrigem MHK-Wert bei fehlender Veränderung des Sterolmusters, unterschieden werden.

## 1.3.1.2 Artikel

Steroids 78 (2013) 483–493



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Steroids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/steroids](http://www.elsevier.com/locate/steroids)

## A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total ergosterol biosynthesis

Christoph Müller<sup>a,\*</sup>, Verena Staudacher<sup>a</sup>, Jürgen Krauss<sup>a</sup>, Martin Giera<sup>b</sup>, Franz Bracher<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department für Pharmazie, Zentrum für Pharmaforschung, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich, Germany

<sup>b</sup> Leiden University Medical Center, Biomolecular Mass Spectrometry Unit, Albinusdreef 2, 2300 RC Leiden, The Netherlands

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 October 2012

Received in revised form 25 January 2013

Accepted 11 February 2013

Available online 27 February 2013

#### Keywords:

Enzyme inhibitors

*Candida glabrata*

Antifungals

Isotope labeling

Liquid–liquid micro-extraction

GC–MS analysis

### ABSTRACT

Increasing resistance of clinically relevant fungi is causing major problems in anti-mycotic therapy. Particularly for immunosuppressed patients fungal infections are of concern and increasing resistance against clinically used antimycotic drugs is hampering successful treatment. In the search for new antifungals ergosterol biosynthesis still is the most prominent target. However, several pitfalls in the bioactivity testing of such substances remain. Two of the major drawbacks certainly are the membrane association of most enzymes participating in ergosterol biosynthesis, and the difficulty to selectively associate growth inhibitory effects with the target pathway (ergosterol biosynthesis). Here we describe a GC–MS based cellular assay for target identification and selective potency determination of test components. In the qualitative part of the assay GC–MS analysis of cell lysates allows target identification by analysis of the changes in the sterol pattern. The quantitative part of the assay makes use of <sup>13</sup>C-acetate feeding combined with GC–MS analysis allowing the selective quantification of a compound's effect on total ergosterol biosynthesis. The described cellular assay was analytically and biologically validated and used to characterize the novel ergosterol biosynthesis inhibitor JK-250.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

During the last decade novel therapies and medicines evolved allowing the successful treatment of severe diseases such as AIDS or cancer. However major pitfalls in many treatment regimens of immunosuppressed patients are co-infections by opportunistic pathogens [1,2]. Particularly local or systemic mycoses represent a major problem. Not only systemic mycoses are generally difficult to treat but furthermore treatment efficiency is additionally compromised by an increasing number of drug-resistant strains. Some of the most common opportunistic fungi, such as *Candida* and *Aspergillus* species, present an increasingly growing resistance to currently available antifungals out of different chemical classes [3–5]. The importance of this fact can be underlined by clinical studies not only showing the increasing development of drug resistance but also emphasizing its societal impact [6,7]. Hence medicinal chemists are striving to develop novel, potent antifungal drugs controlling the problem of resistance and offering novel options for treatment [8–10].

The mode of action common to the majority of antifungals is enzyme inhibition of the post-squalene part of ergosterol biosynthesis

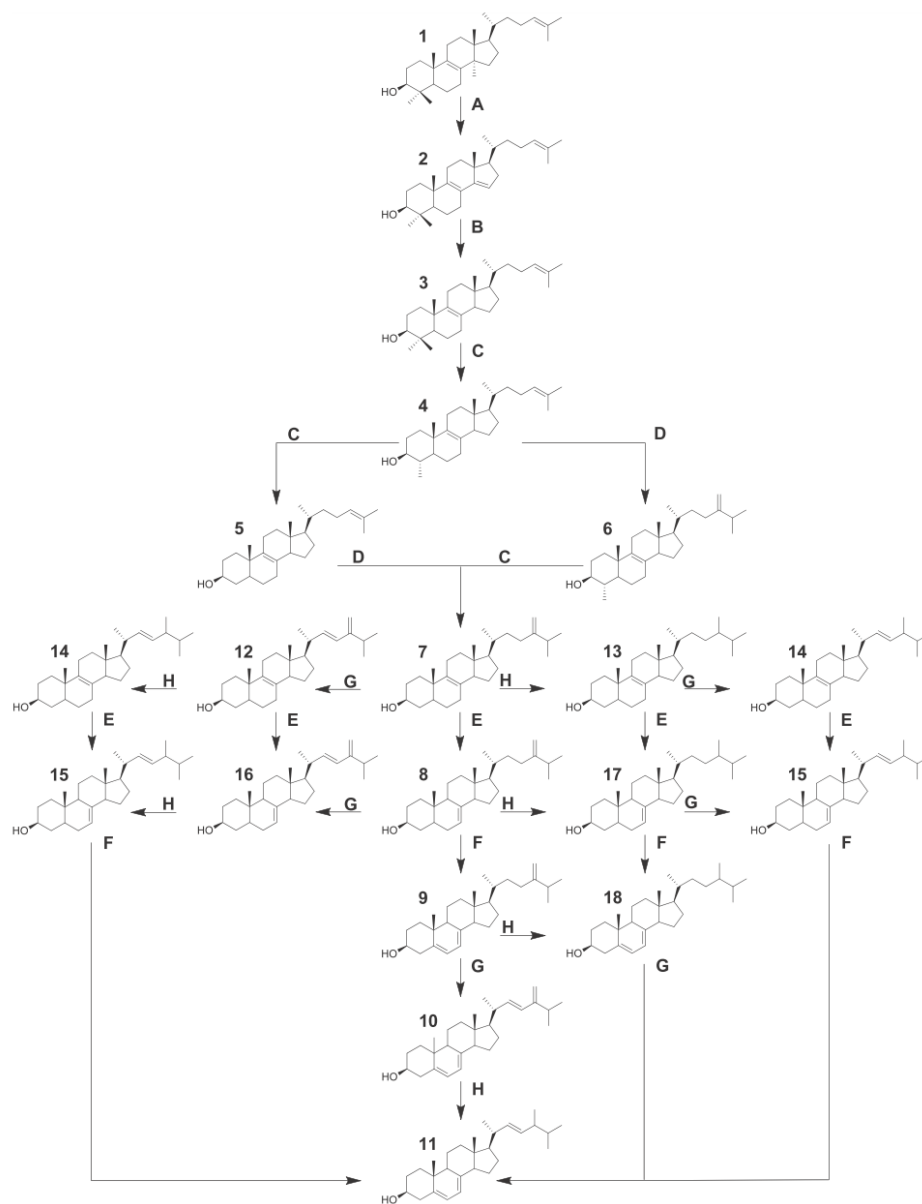
(Fig. 1) or an interaction with ergosterol in the plasma membrane (amphotericin B, nystatin) [3,4].

Clinically three different classes of ergosterol biosynthesis inhibitors are available: allylamines (naftifine, terbinafine) inhibiting squalene epoxidase [3,4], azoles (e.g. clotrimazole, fluconazole) inhibiting C14-demethylase (Fig. 1, enzyme A; see also Fig. 6 in Section 3.1) [3,4,11,12], and one morpholine (amorolfine) inhibiting both C14-reductase and  $\Delta^{8,7}$ -isomerase (Fig. 1, enzymes B and E; see also in Fig. 7 Section 3.1) [3,13,14]. Overall, ergosterol biosynthesis is accomplished by eight distinct enzymes involved in the conversion of lanosterol, the first sterol in this pathway, to ergosterol [15–18]. For most of the involved enzymes specific inhibitors are known, and different types of mechanisms are discussed for the cytotoxic effects of ergosterol biosynthesis inhibitors: on one hand the fluidity, permeability and functionality of the fungal cell membrane is decreased by the deficiency of ergosterol, on the other hand distinct accumulating ergosterol biosynthesis intermediates are toxic for the fungal cells [12,19–22].

In the course of developing novel enzyme inhibitors for distal ergosterol biosynthesis a major difficulty lies in the membrane association of the involved enzymes compromising isolation and compound testing [22,23]. As shown by others and ourselves, whole-cell screening systems combined with sterol pattern analysis can help overcoming this problem, and allow for the easy

\* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 77258.

E-mail address: [christoph.mueller@cup.uni-muenchen.de](mailto:christoph.mueller@cup.uni-muenchen.de) (C. Müller).



**Fig. 1.** Post-lanosterol part of ergosterol biosynthesis in untreated yeast cells. Enzymes: A sterol C14-demethylase, B sterol  $\Delta^{14}$ -reductase, C sterol C4-demethylase, D sterol C24-methyltransferase, E sterol  $\Delta^{8/7}$ -isomerase, F sterol C5-desaturase, G sterol C22-desaturase, H sterol  $\Delta^{24(28)}$ -reductase. Sterols: **1** lanosterol, **2** 4,4-dimethylcholesta-8,14,24-trien-3β-ol, **3** 4,4-dimethylzymosterol, **4** 4-methylzymosterol, **5** zymosterol, **6** 4-methylfecosterol, **7** fecosterol, **8** episterol, **9** 5-dehydroepisterol, **10** 24(28)-dehydroergosterol, **11** ergosterol, **12** ergosta-8,22,24(28)-trien-3β-ol, **13** ergosta-8-en-3β-ol, **14** ergosta-8,22-dien-3β-ol, **15** 5,6-dihydroergosterol, **16** ergosta-7,22,24(28)-trien-3β-ol, **17** ergosta-7-en-3β-ol, **18** ergosta-5,7-dien-3β-ol.

identification of target enzymes of inhibitors in yeasts, plants, and human cells [12,24–30].

Here we present an advanced *in vitro* screening assay for distal ergosterol biosynthesis inhibitors which was developed along the

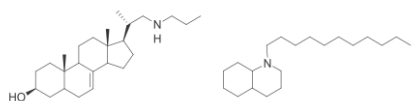


Fig. 2. Structures of the inhibitors DR-180 (=5f in ref. [27]; left) and JK-250 (right).

lines of an earlier published assay for distal cholesterol biosynthesis inhibitors [28]. This whole-cell assay is based on incubation with putative inhibitors, followed by cell lysis, liquid–liquid micro-extraction, and GC–MS analysis of the resulting sterol pattern, and has previously been applied by us in a preliminary version to the identification of sterol C24-methyltransferase inhibitors in ergosterol biosynthesis (Fig. 1, enzyme D; see also in Fig. 8 Section 3.1) [27]. With respect to the test organism the here described assay is not limited to a certain yeast strain, we present its application to the yeasts *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. The major advancement of our assay is that the aforementioned incubation and work-up conditions can additionally be applied to a quantitative analysis of the inhibitory potency of the compounds with only a minor modification. Upon addition of  $^{13}\text{C}$ -acetate to the incubation mixture isotope-labeled ergosterol is formed, whose quantification by GC–MS enables us to calculate an  $\text{IC}_{50}$  value for the inhibition of total ergosterol biosynthesis. Proof of concept was made by full characterization of the new ergosterol biosynthesis inhibitor JK-250 (Fig. 2).

## 2. Experimental

### 2.1. Analysis and materials

#### 2.1.1. GC–MS analysis

A Varian 3800 gas chromatograph was coupled with a Saturn 2200 ion trap from Varian (Darmstadt, Germany). The autosampler was a CombiPal from CTC Analytics (Zwingen, Schweiz) and the used injector was a Varian 1177 with split/splitless option (Darmstadt, Germany). Data analysis and instrument control was made with Varian Workstation 6.9 SP 1 software. The analysis was carried out on a Varian VF-5 ms capillary column of 30 m length plus 10 m EZ-Guard column, 0.25 mm i.d. and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness. The inlet temperature was maintained at 250 °C, injection volume 1  $\mu\text{L}$  (splitless time 1.0 min). The carrier gas was helium 5.0 (purity 99.9990%) at a constant flow rate of 1.3 mL/min. The GC oven started at 50 °C (1.0 min hold) ramped up to 260 °C (heating rate 50 °C/min), followed by a gradient of 4 °C/min up to 310 °C (hold time 0.5 min). The total run time was 18.2 min. Transfer line temperature was 270 °C and the ion trap temperature was 200 °C. The ion trap was operated in three segments. In the first one from 0 min to 9.0 min the MS was switched off (solvent delay), in the second one the MS scanned from 9.0 min to 12.0 min at a mass range from 50 to 450  $m/z$  (EI, 70 eV), and in the last segment from 12.0 min to 18.2 min at a mass range from 100 to 650  $m/z$  (EI, 70 eV). The sterol TMS ethers were identified by comparison with commercial references, in-house synthesized sterols, the NIST<sup>TM</sup> database or data from literature (Table 1).

#### 2.1.2. Reagents and materials

The autosampler vials and caps as well as the silylation reagents *N*-trimethylsilylimidazole (TSM) and *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) were purchased from Macherey Nagel (Düren, Germany). Reference inhibitors: clotrimazole from Synopharm (Barsbüttel, Germany), fluconazole, ketoconazole, and tridemorph from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). The sterol C24-methyltransferase inhibitor DR-180 (5f) was synthesized

according to Renard et al. [27], the synthesis of the new inhibitor JK-250 (Fig. 2) will be published elsewhere. Sodium 2- $^{13}\text{C}$ -acetate (quality 99 atom%  $^{13}\text{C}$ ) was purchased from Isotec (Miamisburg, USA). Ingredients of the yeast cultivation media were obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). All consumables were from VWR (Ismaning, Germany). The primary secondary amine (PSA), particle size 40  $\mu\text{m}$ , for dispersive solid phase extraction (dSPE) was from Varian (Harbor City, USA). Deionized water was prepared with an in-house ion-exchanger and *tert*-butyl methyl-ether (MTBE) was distilled before use. All other reagents and solvents were purchased in HPLC grade or in pro analysis quality from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany).

#### 2.1.3. Cultivated microorganisms

*C. glabrata* (DSM number 11226), *S. cerevisiae* (DSM number 1333) and *Y. lipolytica* (DSM number 1345) were obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany).

### 2.2. Cell cultures

*C. glabrata* and *S. cerevisiae* were cultivated in the DSMZ medium 393 and *Y. lipolytica* was cultivated in DSMZ medium 186. The cultures were maintained at 28 °C and split once a week to keep the yeasts in the log phase [27].

### 2.3. Determination of the MIC values

In the first step minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined. The MIC is defined as the lowest concentration that leads to a visibly detectable complete inhibition of growth according to DIN 58940-84 [31]. The test cultures were diluted 1:10 with distilled water under sterile conditions. The UV absorption of the solutions was measured against a 0.5 McFarland standard at a wavelength of 570 nm. The absorption of the standard referred to  $5 \times 10^6$  CFU/mL (colony forming units) [27,31]. The test strains were diluted with culture medium to obtain a final concentration of 25,000 CFU/mL in each well. All compounds and ketoconazole, as reference inhibitor for MIC value testing were diluted in an appropriate solvent (absolute ethanol, DMSO or distilled sterile water) to give the following concentrations: 500, 375, 250, 125, 100, 50, 25, 10, 5 and 2.5  $\mu\text{g/mL}$ . For all microorganisms each well of a 96-well plate was filled with 20  $\mu\text{L}$  of diluted cell culture solution plus 160  $\mu\text{L}$  culture medium and 20  $\mu\text{L}$  of the test solutions. The dissolution solvent (20  $\mu\text{L}$ ) was added in one row as a negative control and in another row only culture medium without any reference inhibitor, compound, or cells was added as sterility control. The plates were gently shaken and then incubated for  $48 \pm 2$  h at 28 °C. The following quality control requirements had to be fulfilled before a test plate was further analyzed: (a) the sterile control should not show any visible growth and (b) the MIC value of ketoconazole should be  $<0.5$   $\mu\text{g/mL}$ . If this was accomplished MIC values for test substances were read out by visual inspection as the lowest concentration where no cell growth was observed [27,31].

### 2.4. Qualitative analysis of ergosterol biosynthesis inhibition – determination of the target enzyme(s)

The yeast ( $5.0 \times 10^5$  CFU/mL) was incubated with 1990  $\mu\text{L}$  culture medium (Section 2.2) in 24-well plates in the presence or absence of test compounds dissolved in absolute ethanol, DMSO or distilled sterile water. The inhibitors were tested at concentrations representing MIC/2 and MIC/5, adjusted by adding 10  $\mu\text{L}$  of the appropriately concentrated inhibitor stock solution to the well (Section 2.3). A negative control was prepared by adding 10  $\mu\text{L}$  of the em-



486

C. Müller et al./Steroids 78 (2013) 483–493

**Table 1**

Identification of sterols: Trivial and IUPAC name, molecular mass of free sterol ( $M_r(\text{OH})$ ) and TMS derivative ( $M_r(\text{TMS})$ ), relative retention time (RRT), major ions and references; (–) not detected in the strains investigated here; RS reference material, MS mass spectra.

Substance	Trivial name IUPAC name	$M_r(\text{OH})$ $M_r(\text{TMS})$ [g/mol]	RRT	Major ions [m/z]	References
<b>IS</b>	Cholestane	372.7	1.00	357	RS, [26,30,37]
	Cholestane	(–)		217 <sup>+</sup> 203	
<b>1</b>	Lanosterol	426.7	1.45	498	RS, [24,27,28]
	Lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol	498.9		393 <sup>+</sup> 241	
<b>2</b>	FF-MAS	410.7	1.48	482	MS
	4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol	482.9		397 <sup>+</sup> 377	
<b>3</b>	T-MAS	412.7	1.47	484	MS, [38]
	4,4-Dimethylcholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol	484.9		394 379 <sup>+</sup>	
<b>4</b>	4-Methylzymosterol	398.7	(–)	(–)	(–)
	4-Methylcholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol	470.9			
<b>5</b>	Zymosterol	384.7	1.31	456	RS, [24,27,37]
	Cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol	456.8		441 351 <sup>+</sup>	
<b>6</b>	4-Methylfecosterol	412.7	(–)	484	[36,39,40]
	4-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	484.9		469 <sup>+</sup> 227	
<b>7</b>	Fecosterol	398.7	(–)	470	[37,38,41]
	Ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	470.9		455 343 <sup>+</sup>	
<b>8</b>	Episterol	398.6	1.42	455	MS, [37–39]
	Ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	470.9		343 <sup>+</sup> 253	
<b>9</b>	5-Dehydroepisterol	394.6	1.40	468	MS, [25,27,42]
	Ergosta-5,7,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	468.9		363 <sup>+</sup> 337	
<b>10</b>	24-Dehydroergosterol	394.6	1.36	376	MS, [27,43]
	Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol	466.8		361 <sup>+</sup> 251	
<b>11</b>	Ergosterol	396.7	1.33	378	MS, [24,27,39]
	Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol	468.9		363 <sup>+</sup> 337	
<b>12</b>	Ergosta-8,22,24-trienol	376.7	(–)	343 <sup>+</sup>	[24]
	Ergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	468.9		255 253	
<b>13</b>	Ergosta-8-enol	400.7	1.38	472 <sup>+</sup>	MS, [24,40,41]
	Ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol	472.9		457 229	
<b>14</b>	Ergosta-8,22-dienol	398.7	1.31	470	MS, [24,25]
	Ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol	470.9		255 229 <sup>+</sup>	
<b>15</b>	5,6-Dihydroergosterol	398.7	1.35	470	RS, [24,36,39]
	Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	470.9		343 <sup>+</sup> 255	
<b>16</b>	Ergosta-7,22,24-trienol	376.7	(–)	343	[16,24]
	Ergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol	468.9		255 227	
<b>17</b>	Ergosta-7-enol	400.7	1.42	472	MS, [24]
	Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol	472.9		367 <sup>+</sup> 255	
<b>18</b>	Ergosta-5,7-dienol	398.7	1.40	380	MS, [24,25,43]
	Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	470.9		365 <sup>+</sup> 339	
<b>19</b>	Lichesterol	396.6	1.30	468	MS, [24,41]
	Ergosta-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol	468.8		363 <sup>+</sup> 337	
<b>20</b>	14-Methylfecosterol	412.7	1.39	469	MS, [11]
	14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	484.9		379 <sup>+</sup> 227	
<b>21</b>	14-Methylergosta-8,24-diendiol	428.7	1.44	557	MS, [11,26]
	14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	573.1		467 377 <sup>+</sup>	
<b>22</b>	Cholesta-7,24-dienol	384.7	1.41	441	MS, [27,28,44]
	Cholesta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol	456.8		343 <sup>+</sup> 255	
<b>23</b>	Cholesta-5,7,24-trienol	382.6	1.33	454	MS, [24,27,37]
	Cholesta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol	454.8		349 <sup>+</sup> 323	

<sup>+</sup> Base peak (100%).

$$\% \text{ inhibition} = \left[ 1 - \left( \frac{A_{A1} \times A_{B2} \times \text{CFU}/\text{mL}_B}{A_{B1} \times A_{A2} \times \text{CFU}/\text{mL}_A} \right) \right] \times 100$$

**Fig. 3.** Calculation formula for the percentage inhibition;  $A_{A1}$  area ergosterol inhibitor;  $A_{A2}$  area internal standard inhibitor, CFU/mL<sub>A</sub> colony forming units/mL inhibitor;  $A_{B1}$  area ergosterol blank sample;  $A_{B2}$  area internal standard blank sample; CFU/mL<sub>B</sub> colony forming units/mL blank sample.

ployed solvent. Each experiment was performed in duplicate. The plates were incubated at 28 °C for 48 ± 2 h and then the cells were transferred into 2.0 mL plastic microcentrifuge safe-lock tubes. After a first centrifugation step at 9000g for 5 min the medium was discarded and the cell pellet was resuspended in 1.0 mL cold phosphate-buffered saline (PBS). The centrifugation step was repeated, the supernatant was decanted and the pellets were suspended in 2 M NaOH, vortexed for 30 sec and sonicated for 10 min. The suspensions were transferred into 4 mL glass vials with Teflon septa, flooded with nitrogen, and closed tightly. The vials were stored for 1 h at 70 °C in a laboratory drying cabinet. After this saponification step the suspensions were allowed to cool to room temperature and transferred back to the microcentrifuge tubes. Seven hundred microliters of distilled MTBE and 50 µL of internal standard solution (cholestane in MTBE, 10 µg/mL) were added to each tube. The mixtures were shaken well for 1 min and centrifuged at 9000g for 5 min. The organic upper layer was transferred into a new 2.0 mL plastic microcentrifuge safe-lock tube containing 40 ± 2 mg of a mixture (7:1) of anhydrous sodium sulphate and PSA. The lysate was extracted a second time in the same manner with another 750 µL of MTBE. The combined organic extracts were vigorously shaken for 1 min, followed by a centrifugation step (5 min, 9000g). Then 1 mL of the purified upper layer was transferred into a brown glass vial (1.5 mL) and concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen. Each residue was dissolved in 950 µL of MTBE and 50 µL of silylation reagent mixture MSTFA/TSIM (9:1) was added. The samples were gently shaken and stored for completion of the silylation reaction at room temperature for at least 30 min, before being subjected to GC–MS analysis (Section 2.1.1).

#### 2.5. Quantitative analysis of 2-<sup>13</sup>C-acetate incorporation

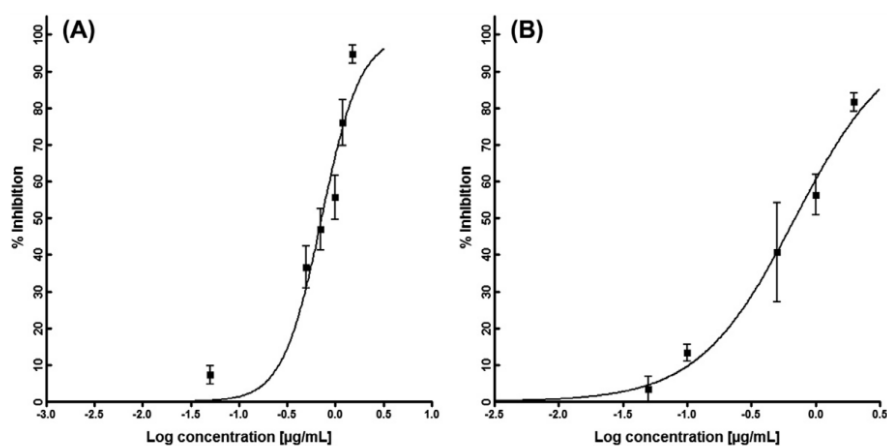
In a 24-well plate, 1980 µL of cell culture medium with yeast ( $5.0 \times 10^5$  CFU/mL), 10 µL of a serial dilution of the inhibitor

(additionally, a blank sample was prepared with 10 µL of the respective solvent), and 10 µL of sterile sodium 2-<sup>13</sup>C-acetate solution (250 µg/mL in distilled sterile water) were added. The incubations were performed in triplicate for each concentration. After incubation at 28 °C for 48 ± 2 h, 3 × 20 µL of each well were transferred into a 96-well plate for CFU/mL determination following the 0.5 McFarland method (Section 2.3) [31]. The further work-up was as described above (Section 2.4). The percentage inhibition of total ergosterol biosynthesis was carried out by quantifying <sup>13</sup>C-acetate incorporation into ergosterol using the ions with *m/z* 366–372 and 472–476 in the treated samples relative to untreated blank samples. As internal standard cholestane (quantifier ions *m/z* 357, 217 and 203) was used, and all samples were normalized to their number of mean CFU/mL (*n* = 3) and cholestane (Fig. 3).

The output of the calculation formula was plotted against the logarithmic inhibitor concentration using Graph Pad Prism 4. A bottom level constant to 0 was set as constraint using a sigmoidal dose-response model with a variable slope (Fig. 4) [28]. For each concentration the percentage inhibition was determined in triplicate.

#### 2.6. Validation

The validation procedure was performed according to DIN 32645 [32]. The linearity of the method was proven according to a regression line by the method of least squares and expressed by *R*<sup>2</sup>. Different levels (50, 250, 500, 750, 1000 and 1250 ng/mL) of lanosterol (**1**), ergosterol (**11**), 5,6-dihydroergosterol (**15**) and lanosta-8-enol (non-physiological sterol; obtained by catalytic hydrogenation of lanosterol [28]) were diluted in MTBE, every level was analyzed in triplicate (duplicate injection). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined with a relative uncertainty of 33.3%. The instrument precision was managed by a sixfold injection of the 500 ng/mL level. Method precision and recovery were determined using *C. glabrata* as cell matrix. For each sample about  $1.0 \times 10^5$  CFU of *C. glabrata* cells were saponified (Section 2.4) and spiked with dihydroergosterol (**15**) and lanosta-8-enol (50, 250, 500, 750, 1000 and 1250 ng/mL). Triplicates were used for recovery studies and method precision was made with a sixfold work-up of the 500 ng/mL level, all samples were injected in duplicate. The recovery of the method was determined with the same levels as for the determination of linearity. The spiked samples were analyzed and the recoveries



**Fig. 4.** Dose-response curves for clotrimazole (A) and JK-250 (B) on *Candida glabrata*; error bars show ± standard deviation.

were calculated by comparison of the measured concentration to the spiked samples [33]. The precision ( $n = 6$ ) of the  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate incorporation into ergosterol (**11**) with and without inhibitor were determined using *C. glabrata*, *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica*. Furthermore inter-day precision of  $\text{IC}_{50}$  values with clotrimazole employing *C. glabrata* was established. The work flow was as described above (Sections 2.4 and 2.5).

### 3. Results

#### 3.1. Qualitative results

##### 3.1.1. Identification of sterols

The biosynthesis routes (Fig. 1 for untreated cells; Figs. 6–8 for cells treated with inhibitors) show 23 different sterols, all of them described in literature. Eighteen of these sterols were characterized during our study (Table 1, see sixth row: references RS or MS).

Only five of the 23 sterols presented in Figs. 1 and 6–8 were not detected under the here described test conditions, although all of them are intermediates of ergosterol biosynthesis [3,13,15,16,34–36]. In literature, MS data were found for 4-methylfecosterol (**6**), fecosterol (**7**), ergosta-8,22,24-trienol (**12**) and ergosta-7,22,24-trienol (**16**), only for 4-methylzymosterol (**4**) no data was available. The occurrence of fecosterol (**7**) and ergosta-8,22,24-trienol (**12**) might be dependent of the yeast strain or the culture conditions, furthermore incubation with a  $\Delta^{8/7}$ -isomerase inhibitor (Fig. 1, Section 3.1.2) might lead to their accumulation. Nkinin et al. found 4-methylzymosterol (**4**), 4-methylfecosterol (**6**), and fecosterol (**7**) in marginal quantities even in a wild type *S. cerevisiae* strain (BY4742) [38]. Ergosta-7,22,24-trienol (**16**) is expected to accumulate upon incubation with an inhibitor of  $\Delta^{24(28)}$ -reductase (Fig. 1, enzyme H). Only 4-methylzymosterol (**4**) could hardly accumulate and consequently hardly be detected, because it is an intermediate in the two consecutive demethylations at C-4 catalyzed by the sterol C4-demethylase complex (Fig. 1, enzyme C) [17]. Hence, not even MS data is available for this sterol.

##### 3.1.2. Incubation with reference inhibitors

Identification of inhibited enzymes was carried out by analyzing the characteristic changes in the sterol patterns obtained after treating the cells with known inhibitors. In untreated strains, *C. glabrata* (CG), *S. cerevisiae* (SC), and *Y. lipolytica* (YL) the following sterols were detected in various relative amounts under standard conditions (Section 2.2) (control): lanosterol (**1**) in CG, SC, YL; t-MAS (**3**) in CG, SC; episterol (**8**) in CG, YL; 24-dehydroergosterol (**10**) in YL, ergosterol (**11**) in CG, SC, YL; 5-dihydroergosterol (**15**) in CG; ergosta-7-enol (**17**) in CG.

The yeast strains were incubated with different reference inhibitors: clotrimazole, an inhibitor of C14-demethylase (Fig. 1, enzyme A), tridemorph, a morpholine inhibiting  $\Delta^{8/7}$ -isomerase (Fig. 1, enzyme E) and DR-180 (Fig. 2) [27], an inhibitor of sterol C24-methyltransferase (Fig. 1, enzyme D). The resulting extracted ion chromatograms of the GC–MS analysis of the sterol fractions are shown in Fig. 5.

Clotrimazole led to a drastic decrease of the amount of ergosterol (**11**), and the expected accumulation of lanosterol (**1**) and 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**21**) in all three strains (Fig. 1; chromatograms CG1-2, SC1-2, YL1-2 in Fig. 5). However, the relative concentrations of the accumulating sterols **1** and **21** differed strongly in the three strains. Lanosterol (**1**) is the physiological substrate of the inhibited enzyme C14-demethylase. The formation of non-physiological 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**21**) can be explained by an alternative biosynthesis pathway upon blocking C14-demethylase (Fig. 6) [3,4,11,12,26].

Additional sterols, like 14-methylfecosterol (**20**), eburicol and obtusifoliosol, that have been described in literature to accumulate after inhibition of C14-demethylase were not detected in our test strains under the here described conditions.

The  $\Delta^{8/7}$ -isomerase inhibitor tridemorph led to a drastic decrease of the amount of ergosterol (**11**), and caused an accumulation of lichesterol (**19**), ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol (**13**) and ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol (**14**) (Fig. 1; chromatograms CG5-6, SC5-6, YL5-6 in Fig. 5). Once again, the relative concentrations of the accumulating sterols differed strongly in the three strains. Both ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol (**13**) and ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol (**14**) are physiological substrates of the  $\Delta^{8/7}$ -isomerase [13–15]. The non-physiological sterol lichesterol (**19**) is formed, since accumulating ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol (**14**) is also a substrate of the enzyme sterol C5-desaturase (Fig. 7, enzyme F). In general, morpholine antifungals inhibit both  $\Delta^{8/7}$ -isomerase and  $\Delta^{14}$ -reductase (Fig. 1, enzymes B and E), but only the downstream block of the  $\Delta^{8/7}$ -isomerase was detectable here, since it is known that tridemorph inhibits this enzyme much stronger than the  $\Delta^{14}$ -reductase [3,13].

Accumulation of  $\text{C}_{27}$  sterols is typical for an inhibition of sterol C24-methyltransferase (Fig. 1; chromatograms CG3-4, SC3-4, YL3-4 in Fig. 5) [27]. The preferred substrate zymosterol (**5**) and other  $\text{C}_{27}$  sterols (cholesta-7,24-dienol (**22**), cholesta-5,7,24-trienol (**23**)) were identified upon incubation with DR-180 (Fig. 8; Table 1), but the sterol patterns of the three strains showed significant differences.

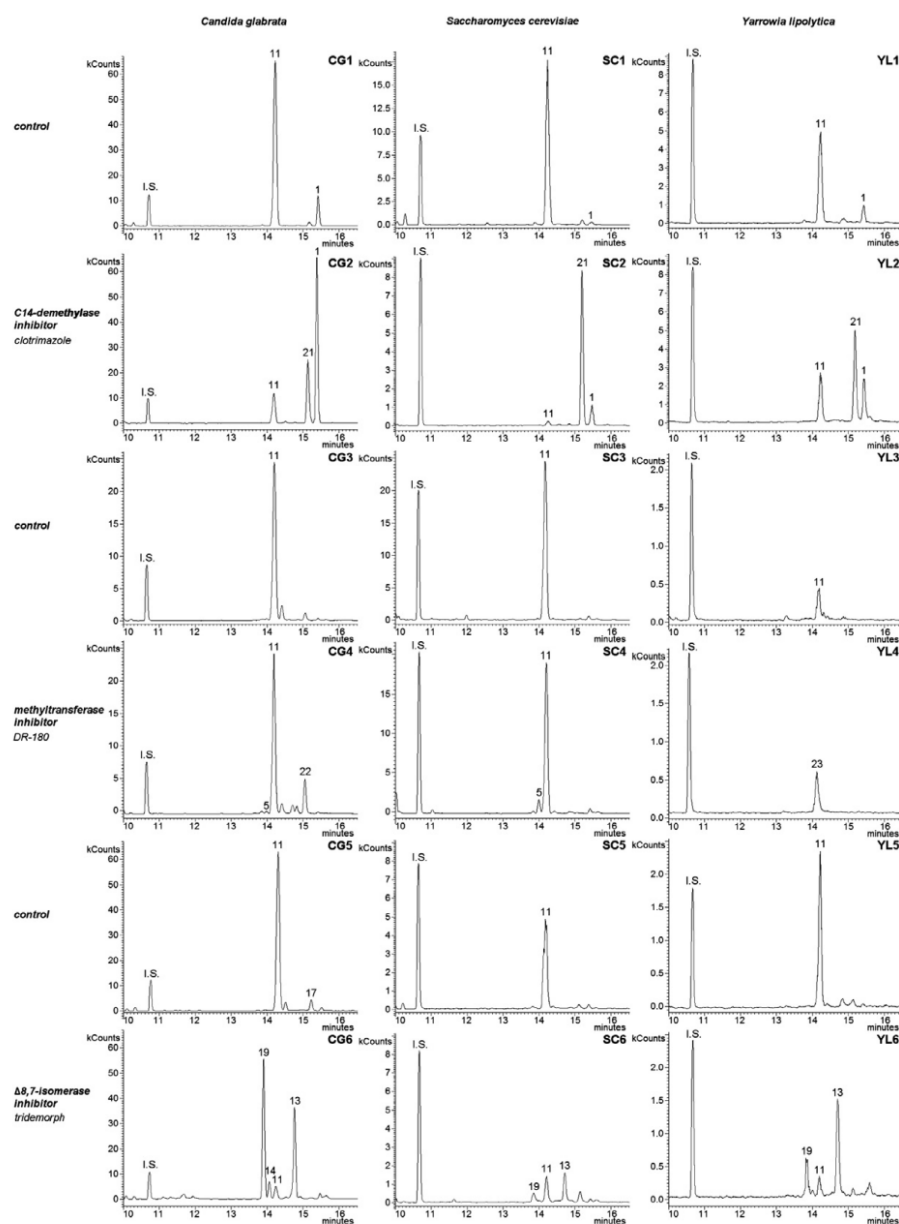
#### 3.2. Quantitative results

##### 3.2.1. $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Acetate incorporation

Determination of  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate incorporation into ergosterol (**11**) is a direct measure for an inhibitor's ability to interfere with ergosterol synthesis. Such analysis allows to selectively quantifying an inhibitor's effect on this critical biosynthetic pathway without quantifying possible secondary effects (i.e. cell death by detergent effects, mechanisms unrelated to ergosterol biosynthesis, etc.). Furthermore such an approach sums up possible multi-enzyme inhibitions into a single numerical value directly linked to ergosterol biosynthesis. A theoretical incorporation of 15  $^{13}\text{C}$  atoms from  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate molecules can occur in ergosterol biosynthesis [17,18], but the observed average incorporation was about 4 acetate units what is reflected in a mass gain of 4 amu. In order to obtain good selectivity between labeled and unlabeled ergosterol (**11**) at least a difference of 3 amu should exist between the characteristic ions overcoming isotope effects caused by naturally occurring isotopes. Unlabeled ergosterol gives a base peak at  $m/z$  363, the  $[\text{M}]^{+}$  ion can be found at  $m/z$  468, hence the ions used for quantifying labeled ergosterol were:  $m/z$  366–371 and  $m/z$  471–476 (a gain of more than 8 amu due to labeling was marginal), since added  $^{13}\text{C}$ -acetate competes with unlabeled acetate already present in the living cells. An extracted ion chromatogram obtained after incubation of *C. glabrata* exemplarily for all three yeast strains, demonstrates that labeled ergosterol (**11**) can be selectively quantified in the presence of unlabeled ergosterol (**11**) (Fig. 9).

##### 3.2.2. Determination of $\text{IC}_{50}$ values for inhibition of ergosterol biosynthesis in *C. glabrata*

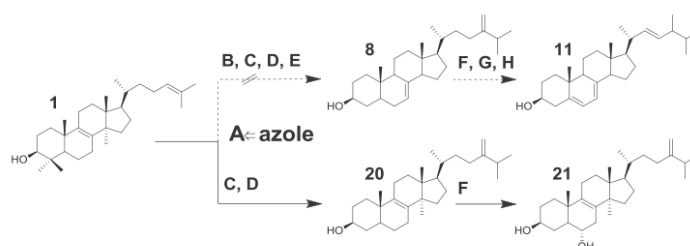
The percentage inhibitions for different concentrations of clotrimazole and the new inhibitor JK-250 were determined in triplicate as described above (Section 2.5) and plotted against the respective logarithmic inhibitor concentrations. From the received inhibition curves the  $\text{IC}_{50}$  values were obtained (Fig. 4). The goodness of fit for the sigmoidal dose response curve for clotrimazole on



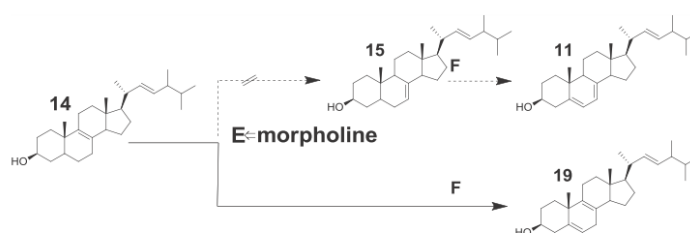
**Fig. 5.** Extracted ion chromatograms of the accumulating sterols after treatment with inhibitors; CG1–CG6 *Candida glabrata*; CG1 control, CG2 clotrimazole 0.5 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 393 + 467); CG3 control, CG4 DR-180 (Fig. 2) 0.1 µg/mL ( $m/z$  217 + 343 + 351 + 363); CG5 control, CG6 tridemorph 2.0 µg/mL ( $m/z$  217 + 255 + 363 + 472); SC1–SC6 *Saccharomyces cerevisiae*; SC1 control, SC2 clotrimazole 0.4 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 393 + 467); SC3 control, SC4 DR-180 (Fig. 2) 0.04 µg/mL ( $m/z$  217 + 351 + 363); SC5 control, SC6 tridemorph 0.05 µg/mL ( $m/z$  217 + 255 + 337 + 363 + 468 + 472); YL1–YL6 *Yarrowia lipolytica*; YL1 control, YL2 clotrimazole 0.02 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 393 + 467); YL3 control, YL4 DR-180 (Fig. 2) 0.01 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 349); YL5 control, YL6 tridemorph 1.0 µg/mL ( $m/z$  217 + 255 + 363 + 472). Sterols: I.S. (internal standard) cholestane, 1 lanosterol, 5 zymosterol, 11 ergosterol, 13 ergosta-8-enol, 14 ergosta-8,22-dienol, 17 ergosta-7-enol, 19 lichesterol, 21 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol, 22 cholesta-7,24-dienol, 23 cholesta-5,7,24-trienol.

490

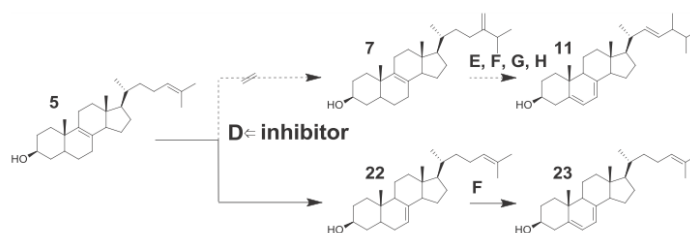
C. Müller et al. / Steroids 78 (2013) 483–493



**Fig. 6.** Alternative sterol biosynthesis pathway in the presence of C14-demethylase inhibitors (azoles). Enzymes: A sterol C14-demethylase, B sterol  $\Delta^{14}$ -reductase, C sterol C4-demethylase, D sterol C24-methyltransferase, E sterol  $\Delta^{8/7}$ -isomerase, F sterol C5-desaturase, G sterol C22-desaturase, H sterol  $\Delta^{24/28}$ -reductase. Sterols: **1** lanosterol, **8** episterol, **11** ergosterol, **20** 14 $\alpha$ -methylfecosterol, **21** 14-methylergosterol, **24**(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. Dashed arrows: physiological biosynthesis pathway, continuous arrows: alternative pathway upon inhibition of C14-demethylase (A).



**Fig. 7.** Alternative sterol biosynthesis route in the presence of sterol  $\Delta^{8/7}$ -isomerase inhibitors (morpholines). Enzymes: E sterol  $\Delta^{8/7}$ -isomerase, F sterol C5-desaturase. Sterols: **11** ergosterol, **14** ergosta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol, **15** dihydroergosterol, **19** lichesterol. Dashed arrows: physiological biosynthesis pathway, continuous arrows: alternative pathway upon inhibition of sterol  $\Delta^{8/7}$ -isomerase (E).



**Fig. 8.** Alternative sterol biosynthesis route in the presence of sterol C24-methyltransferase inhibitors. Enzymes: D sterol C24-methyltransferase, E sterol  $\Delta^{8/7}$ -isomerase, F sterol C5-desaturase, G sterol C22-desaturase, H sterol  $\Delta^{24/28}$ -reductase. Sterols: **5** zymosterol, **7** fecosterol, **11** ergosterol, **22** cholesta-7,24-dienol, **23** cholesta-5,7,24-trienol. Dashed arrows: physiological biosynthesis pathway, continuous arrows: alternative pathway upon inhibition of sterol C24-methyltransferase (D).

*C. glabrata* was for example  $R^2$  0.906 and the calculated  $IC_{50}$  value for total ergosterol biosynthesis inhibition was 0.72  $\mu\text{g/mL}$ . The new inhibitor JK-250 gave an  $IC_{50}$  value of 0.69  $\mu\text{g/mL}$  on *C. glabrata* (Table 2).

### 3.3. Validation results

The key results of the validation are given in Table 3 and Table 4. The coefficients of variation (C.V.) for the instrument precision for four representative sterols were determined to be lower than 5%. The selectivity of the  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate incorporation by the  $m/z$  choice of 366–371 and 471–476 determined for labeled versus unlabeled ergosterol was greater than 95% ( $n = 6$ ) for all three yeast strains. The precision ( $n = 6$ ) of the incorporation was assigned under control conditions and under suitable inhibition conditions (clotrimazole) for each strain (Table 5). Furthermore the inter-day precision of the determination of  $IC_{50}$  values was carried out with

clotrimazole using *C. glabrata*. The average  $IC_{50}$  value was 0.74  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 6$ ) with a C.V. of 29%.

### 3.4. Application to a new inhibitor

The proof of concept was made by characterizing JK-250, a new decahydroisoquinoline antifungal from our laboratory (Fig. 2). This compound showed the same mode of action as the morpholine tridemorph (inhibition of  $\Delta^{8/7}$ -isomerase (E), see Fig. 5, Fig. 7 and Fig. 10). But in contrast to tridemorph, which leads to an accumulation of fluctuating amounts of mainly ergosta-8-enol (**13**) and lichesterol (**19**), JK-250 leads to an almost exclusive accumulation of sterol **19** (Fig. 10). The antifungal potential of JK-250 was characterized by determination of MIC and  $IC_{50}$  values on *C. glabrata*. The new inhibitor showed activities comparable to those of clotrimazole (Table 2), whereas tridemorph had a 4.5-fold higher MIC value (11.6  $\mu\text{g/mL}$ ) compared to JK-250 and clotrimazole.



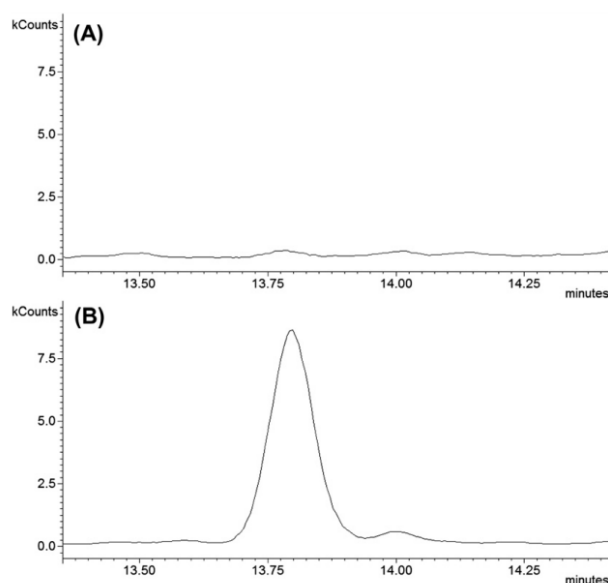


Fig. 9. Extracted ion chromatogram (366–371 + 471–476  $m/z$ ) of ergosterol in *Candida glabrata*; unlabeled control sample (A) vs. labeled control sample (B) demonstrating that labeled ergosterol can be quantified in the presence of unlabeled ergosterol (**11**).

Table 2

IC<sub>50</sub> values for inhibition of total ergosterol biosynthesis through determination of <sup>13</sup>C incorporation into newly synthesized ergosterol vs MIC value for growth inhibition of *Candida glabrata*.

Substance	Relative molecular mass	MIC value (μg/mL)	IC <sub>50</sub> value (μg/mL)	Confidence interval (μg/mL) <sup>a</sup>	R <sup>2b</sup>
Clotrimazole	344.84	2.4	0.72	0.64–0.81	0.906
JK-250	293.54	2.5	0.69	0.57–0.84	0.950

<sup>a</sup> Confidence interval for IC<sub>50</sub> value was 95%.

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> = Goodness of fit of the dose-response curves.

#### 4. Discussion

The key points of the here presented assay are as follows: the target enzyme of novel antifungals in the post-lanosterol part of ergosterol biosynthesis can be clearly identified on basis of the typical sterol patterns obtained upon incubation. However, it is quite difficult to predict which sterol will accumulate under treatment with an inhibitor of a single enzyme, and significant differences in the resulting sterol patterns can be obtained upon incubation of the three investigated yeasts with the same inhibitor. Either

Table 4

Quality of the recovery from cell lysates at different sterol concentrations.

Substance	Linearity R <sup>2</sup> (50–1250 ng/mL)	Average recovery [%]
5,6-Dihydroergosterol	0.981	81
Lanosta-8-enol	0.997	93

Table 5

Precision of the 2-<sup>13</sup>C-acetate incorporation into ergosterol; C.V., Coefficient of variation.

Yeast	Precision without inhibitor (n = 6; C.V.) [%]	Precision in the presence of inhibitor (n = 6; C.V.) [%]
<i>Candida glabrata</i>	17	8 <sup>a</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	21 <sup>b</sup>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	19	22 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Clotrimazole 0.5 μg/mL.

<sup>b</sup> Clotrimazole 0.4 μg/mL.

<sup>c</sup> Clotrimazole 0.02 μg/mL.

the physiological substrate of the enzyme accumulates (e.g. ergosta-8-en-3β-ol (**13**) and ergosta-8,22-dien-3β-ol (**14**) upon

Table 3

Linearity, LOD, LOQ, slope and method precision of lanosterol (**1**) ergosterol (**11**), 5,6-dihydroergosterol (**15**) and lanosta-8-enol (non-physiological sterol), Linearity R<sup>2</sup> (50–1250 ng/mL); LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; Slope [u/ng], units per ng; C.V., Coefficient of variation, method precision by 500 ng/mL.

Substance	Linearity R <sup>2</sup> (50–1250 ng/mL)	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]	Slope [u/ng]	Method precision (n = 6; C.V.) [%]
Lanosterol	0.996	74	196	109	12
Ergosterol	0.990	111	283	142	16
5,6-Dihydroergosterol	0.998	47	129	235	13
Lanosta-8-enol	0.999	43	120	578	12

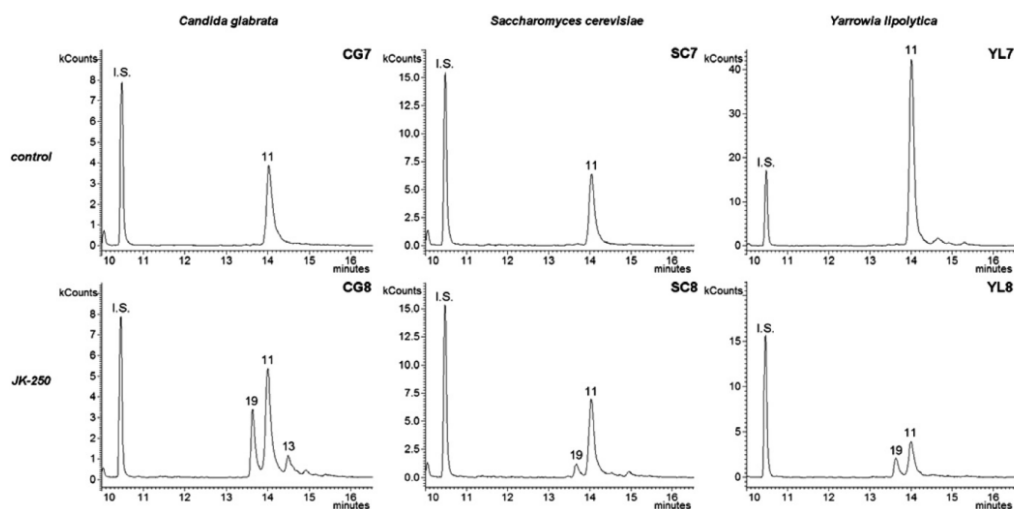


Fig. 10. Extracted ion chromatograms of the accumulating sterols after treatment with JK-250 (Fig. 2); CG7/CG8 *Candida glabrata*; CG7 control, CG8 JK-250 0.5 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 457 + 472); SC7/SC8 *Saccharomyces cerevisiae*; SC7 control, SC8 JK-250 0.05 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 457 + 472); YL7/YL8 *Yarrowia lipolytica*; YL7 control, YL8 JK-250 5.0 µg/mL ( $m/z$  217 + 363 + 457 + 472). I.S. cholestane, 11 ergosterol, 13 ergosta-8-enol, 19 lichesterol.

inhibition with a  $\Delta^{8/7}$ -isomerase inhibitor, or lanosterol (1) upon C14-demethylase inhibition), and/or these intermediates are converted to non-physiological sterols, since they can also be substrates of other ergosterol biosynthesis enzymes (e.g. accumulation of lichesterol (19) upon  $\Delta^{8/7}$ -isomerase inhibition, and 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (21) upon C14-demethylase inhibition). Nevertheless, in any one of the three target enzymes inspected more closely here, an accumulation of one or more sterols, which clearly indicate the inhibited enzyme, could be detected.

This basically known qualitative screening assay could be upgraded into a quantitative one by analyzing  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate incorporation into newly synthesized ergosterol (11) by a minor modification of the incubation protocol (addition of  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate). This method allows the determination of the potency of a substance by measuring the  $\text{IC}_{50}$  value referring to the total ergosterol biosynthesis. The obtained coefficients of variation (C.V.) for method validation and  $\text{IC}_{50}$  value determination were mostly lower than 20%, and thus represent acceptable results for such a complex whole-cell assay (Table 3–5; Section 3.3).

Among the three yeasts investigated here, *C. glabrata* was found to be advantageous for initial screening efforts. In addition to its close relationship to prominent pathogenic *Candida* species, this strain showed best cell growth rates, was easy to handle and did not show undesired up-regulation of ergosterol biosynthesis under treatment with different inhibitors. In principle, the effect of ergosterol biosynthesis inhibitors might be decreased by up-regulation of drug resistance genes that lead to an efflux of the compounds [35]. The disadvantage of *Y. lipolytica* was a fluctuant relation of the amounts of 24-dehydroergosterol (10) and ergosterol (11), the analysis of one blank well row showed for example higher levels of ergosterol (11), and the other blank well row higher levels of 24-dehydroergosterol (10) [27]. This behavior was not really a problem for qualitative analysis, however wrong interpretation of such results could be the consequence, namely an erroneous attribution to an inhibition of  $\Delta^{24(28)}$ -reductase (enzyme H; which converts 10 into 11).

In conclusion, characterization of novel antifungals can be managed with our whole-cell assay. The combination of a micro liquid-liquid extraction and a well working GC-MS system render radioactive labeling or sophisticated enzyme isolation unnecessary. More than 50 samples could be worked up and analyzed by one person per day by low costs for consumables (less than 2 €/sample). Only a small amount of different yeasts and solvents were needed, no extensive liquid cell culture incubation, no extended cell lysis procedure or clean-up steps were necessary. In summary, by using one protocol in two minor modifications, new inhibitors of ergosterol biosynthesis can be characterized conveniently with respect to target enzyme identification as well as determination of inhibitory potency, selectively related to ergosterol biosynthesis.

## References

- [1] Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996;9:499–511.
- [2] Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. Int J Antimicrob Agents 2006;27:359–66.
- [3] Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanism of drug resistance in fungi. Trends Microbiol 1994;2:393–400.
- [4] Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12:501–17.
- [5] Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequence for treatment. Am J Med 2012;125:S3–S11.
- [6] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007;20:133–63.
- [7] Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. Clin Infect Dis 1998;27:781–8.
- [8] Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, et al. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. N Engl J Med 2002;346:225–34.
- [9] Sable CA, Strohmaier KM, Chodakewitz JA. Advances in antifungal therapy. Annu Rev Med 2008;59:361–79.
- [10] Burger-Kentscher A, Finkelmeier D, Keller P, Bauer J, Eickhoff H, Kleymann G, et al. A screening assay based on host-pathogen interaction models identifies a set of novel antifungal benzimidazole derivatives. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4789–801.

- [11] Quail MA, Arnoldi A, Moore DJ, Goosey MW, Kelly SL. Ketoconazole-mediated growth inhibition in *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 1993;32:273–80.
- [12] Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:910–5.
- [13] Baloch RI, Mercer EI, Wiggins TE, Baldwin BC. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* by tridemorph, fenpropimorph and fenpropidin. *Phytochemistry* 1984;23:2219–26.
- [14] Polak A. Mode of action of morpholine derivatives. *Ann N Y Acad Sci* 1988;544:221–8.
- [15] Fryberg M, Oehlschlager AC, Unrau AM. Biosynthesis of ergosterol in yeast. Evidence for multiple pathways. *J Am Chem Soc* 1973;95:5747–57.
- [16] Barrero AF, Oltra JE, Robinson J, Burke PV, Jiménez D, Oliver E. Sterols in erg mutants of *Phycomyces*: metabolic pathways and physiological effects. *Steroids* 2002;67:403–9.
- [17] Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chem Rev* 2011;111:6423–51.
- [18] Parks LW, Casey WM. Physiological implication of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:16–95.
- [19] Abe F, Usui K, Hiraki T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 2009;48:8494–504.
- [20] Nes WR, Sekula BC, Nes WD, Adler JH. The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. *J Biol Chem* 1978;253:6218–25.
- [21] Heese-Peck A, Pichler H, Zanolari B, Waanabe R, Daum G, Riezman H. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol Biol Cell* 2002;13:2664–80.
- [22] Steel CC, Baloch RI, Mercer EI, Baldwin BC. The intracellular location and physiological effects of abnormal sterols in fungi grown in the presence of morpholine and functionally related fungicides. *Pestic Biochem Physiol* 1989;33:101–11.
- [23] Pichler H, Gaigg B, Hrstnik C, Achleitner G, Kohlwein SD, Zellnig G, et al. A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* 2001;268:2351–61.
- [24] Nakanishi S, Nishino T, Nagai J, Katsuki H. Characterization of nystatin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and preparation of sterol intermediates using the mutants. *J Biochem* 1987;101:535–44.
- [25] Loeffler RST, Hayes AL. Effects of sterol biosynthesis inhibitor fungicides on growth and sterol composition of *Ustilago maydis*, *Botrytis cinerea* and *Pyrenophora teres*. *Pestic Sci* 1992;36:7–17.
- [26] Ebert E, Gaudin J, Muecke W, Ramsteiner K, Vogel C. Inhibition of ergosterol biosynthesis by etaconazole in *Ustilago maydis*. *Z Naturforsch* 1982;38c:28–34.
- [27] Renard D, Perruchon J, Giera M, Müller J, Bracher F. Side chain azasteroids and thiasteroids as sterol methyltransferase inhibitors in ergosterol biosynthesis. *Bioorg Med Chem* 2009;17:8123–37.
- [28] Giera M, Plössl F, Bracher F. Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids* 2007;72:633–42.
- [29] Giera M, Renard D, Plössl F, Bracher F. Lathosterol side chain amides – a new class of human lathosterol oxidase inhibitors. *Steroids* 2008;73:299–308.
- [30] Horling A, Müller C, Barthel R, Bracher F, Imming P. A new class of selective and potent 7-dehydrocholesterol reductase inhibitors. *J Med Chem* 2012;55:7614–22.
- [31] Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents – part 84: microdilution – special requirements for testing of fungi against antifungal agents. In: DIN 58940–84. Beuth Verlag; 2002.
- [32] Chemical analysis, decision limit, detection limit and determination limit, estimation in case of repeatability terms, methods, evaluation. In: DIN 32645. Beuth Verlag; 1996.
- [33] Plössl F, Giera M, Bracher F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J Chromatogr A* 2006;1135:19–26.
- [34] Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Garcia-Effron G, Lopez JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 2008;73:339–47.
- [35] Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 2002;8:76–81.
- [36] Griffiths KM, Bacic A, Howlett BJ. Sterol composition of mycelia of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Phytochemistry* 2003;62:147–53.
- [37] Gerst N, Ruan B, Pang J, Wilson WK, Schroepfer Jr GJ. An updated look at the analysis of unsaturated C27 sterols by gas chromatography and mass spectrometry. *J Lipid Res* 1997;38:1685–701.
- [38] Nkinin SW, Stringer JR, Keely SP, Setchell KDR, Giner JL, Kaneshiro ES. *Pneumocystis carinii* sterol 14 $\alpha$ -demethylase activity in *Saccharomyces cerevisiae* erg11 knockout mutant: sterol biochemistry. *J Eukaryot Microbiol* 2011;58:383–92.
- [39] Zheng W, Liu T, Xiang X, Gu Q. Sterol composition in field-grown and cultured mycelia of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Sinica* 2007;42:750–6.
- [40] Osumi T, Taketani S, Katsuki H, Kuhara T, Matsumoto I. Ergosterol biosynthesis in yeast. *J Biochem* 1978;83:681–91.
- [41] Loeffler RST, Hayes AL. Sterols of the plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Pyrenophora teres*. *Phytochemistry* 1990;29:3423–5.
- [42] Barrero AF, Oltra JE, Poyatos JA, Jiménez D, Oliver E. Phycomysterols and other sterols from the fungus *Phycomyces blakesleeanae*. *J Nat Prod* 1998;61:1491–6.
- [43] Le Fur Y, Maume G, Feuillat M, Maume BF. Characterization by gas chromatography/mass spectrometry of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during autolysis. *J Agric Food Chem* 1999;47:2860–4.
- [44] Ogihara N, Morisaki M. Facile synthesis of ymosterol and related compounds. *Chem Pharm Bull* 1988;36:2724–5.



### 1.3.1.3 Beitrag am Artikel

Verena Staudacher war im Rahmen ihrer Masterarbeit, welche von Prof. Dr. Franz Bracher und mir betreut wurde, an der Durchführung der Experimente, der Etablierung des Assays und der Datenauswertung beteiligt [33]. Darüber hinaus erstellte sie die Grafiken Fig. 4, 5, 9 und 10 in dem Artikel. Jürgen Krauss synthetisierte die neue Testsubstanz **JK-250**. Das gesamte Manuskript wurde von mir verfasst. Martin Giera und Prof. Dr. Franz Bracher waren an der Verbesserung des Manuskripts beteiligt. Martin Giera hatte im Rahmen seiner Dissertation schon erste Optimierungen des qualitativen Assays an *Yarrowia lipolytica* durchgeführt [1]. Die zusätzliche Etablierung von *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*, die Einführung der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in Mikrotiterplatten mit 96 „Näpfchen“ (siehe Kapitel 1.3.1.2, *Determination of MIC value*) und die gesamte Probenaufarbeitungsoptimierung waren mein eigener praktischer Anteil am Artikel.

## 1.3.2 Charakterisierung neuer Antimykotika

### 1.3.2.1 EMC120B12 als Inhibitor der C14-Demethylase und Identifizierung neuer Sterole in *Candida krusei*

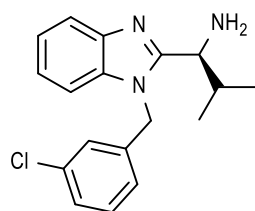
#### 2.3.2.1.1 EMC120B12 als Inhibitor der C14-Demethylase

Keller PD, Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Wiesmüller K-H, Lemuth K, Hiller E, Engelhardt I, Müller C, Schröppel K, Bracher F, Rupp S. Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal human pathogens. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. in Hamburg, Oktober 2012.

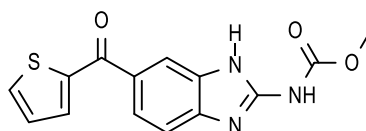
##### 2.3.2.1.1.1 Zusammenfassung

In der Einleitung zur Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren und in Kapitel 1.3.1 wurde schon auf die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antimykotika eingegangen, weswegen darauf in diesem Kapitel verzichtet wird.

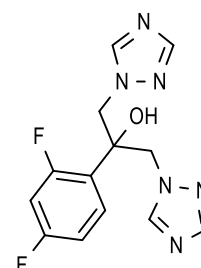
Candidosen werden hauptsächlich von den klinisch relevanten *Candida* spp. wie *Candida albicans*, *Candida glabrata* (vgl. Kapitel 1.3.1), *Candida guilliermondii*, *Candida parasilosis*, *Candida krusei* (vgl. Kapitel 2.3.2.1.2), *Candida neoformans*, *Candida lusitanae*, *Candida nivariensis*, *Candida pelliculosa* und *Candida tropicalis* hervorgerufen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Steffen Rupp etablierte einen Activity-Selectivity High-Throughput-Screening Assays (AS-HTS) [43], welcher in einer Mikrotiterplatte eine natürliche Infektion nachahmt. Dabei werden Pilzzellen neben Humanzellen mit Testsubstanz und Fluoresceindiacetat inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, dadurch konnten mehr als 100.000 Substanzen getestet werden. Die vielversprechendsten Substanzen wurden anschließend einer MHK-Wert Bestimmung an 150 Pilzen unterzogen [43]. Verbindung EMC120B12 ((S)-2-(1-Aminoisobutyl)-1-(3-chlorbenzyl)-benzimidazol) von der Firma EMC Microcollections GmbH war dabei die interessanteste Verbindung (Abbildung 12).



EMC120B12



Nocodazol



Fluconazol

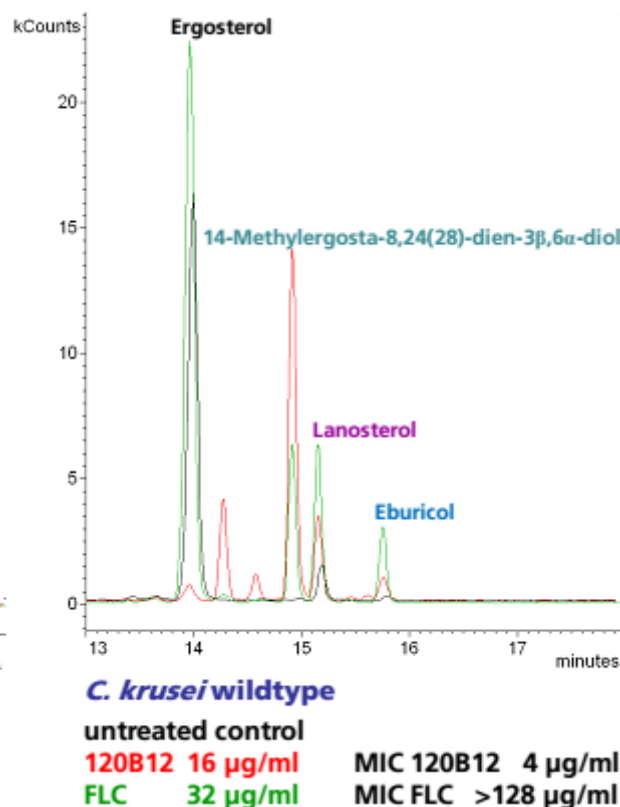
**Abbildung 12:** Strukturformeln von EMC120B12 (Benzimidazol-Derivat), Nocodazol (Benzimidazol-Derivat) und Fluconazol (Triazol-Derivat)

Durch *3D in vitro tissue models* konnte ein antimykotischer Effekt an *Candida albicans* bestätigt werden (Kapitel 2.3.2.1.1.2, siehe Bilder im Poster). Dem Pilz war es nicht möglich, bei Anwesenheit von EMC120B12 die Epithelschicht zu durchdringen.

Der Wirkmechanismus der Substanz war bisher nicht genauer untersucht worden. Um diesen aufzuklären, wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Steffen Rupp verschiedene Experimente durchgeführt. Eine Transkriptom-Analyse von *Candida albicans* in An-/Abwesenheit von EMC120B12, Fluconazol (C14-Demethylase-Inhibitor) und Nocodazol (Mikrotubuli-Inhibitor) (Abbildung 12) lieferte folgende Ergebnisse:

Fluconazol (Triazol-Derivat) und EMC120B12 führten zu einer Hochregulierung von Ergosterol-Biosynthese-Enzymen, was ein Eingreifen von EMC120B12 in die Ergosterol-Biosynthese nahelegt, zumal es zu keiner Hochregulierung Mikrotubuli-assoziierten Enzyme gekommen ist. Die Transkriptom-Analyse von Nocodazol, ebenfalls wie EMC120B12 ein Benzimidazol-Derivat und bekannt als Mikrotubuli-Inhibitor, zeigte hingegen eine Hochregulierung von Mikrotubuli-assoziierten Enzymen, jedoch keine Aktivität auf die Ergosterol-Biosynthese. In unserem Ergosterol-Biosynthese-Assay war Nocodazol, wie zu erwarten, inaktiv.

Erst meine GC-MS Analysen des Sterolmusters in An-/Abwesenheit von EMC120B12 und Fluconazol als Referenz erlaubten eine eindeutige Identifizierung des Targetenzyms. Es wurden verschiedene Isolate von *Candida albicans* (n = 8) und *Candida krusei* (n = 2), sowie *Candida tropicalis* und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. EMC120B12 zeigte in allen Testpilzen eine Hemmung der C14-Demethylase (Abbildung 13). Nur dieses Enzym wurde adressiert (vgl. Kapitel 1.3.2.2.2, Organismus-abhängige Enzyminhibition).



**Abbildung 13:** Vergrößerung des mittleren Chromatogramms aus dem Posterbeitrag (Kapitel 2.3.2.1.1.2); *Candida krusei* unbehandelt (schwarz) und behandelt mit Fluconazol (grün) bzw. mit EMC120B12 (rot)

Als Markersterole für eine C14-Demethylase-Inhibition gelten Lanosterol und Eburicol, die natürlichen Substrate der C14-Demethylase, sowie 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Abbildung 13, Abbildung 14 ). Wie schon in Kapitel 1.3.1 erwähnt variierte die Zusammensetzung der Markersterole nach Inhibitor-Zugabe und Pilzart. Eine eindeutige Identifizierung des Zielenzyms war dennoch in jedem Fall möglich.

Trotz der mittlerweile umfangreichen Steroldatenbank (vgl. Kapitel 1.3.1.2) konnten einige Signale zwar als Sterole identifiziert, jedoch nicht näher charakterisiert werden (Abbildung 13). Unbekannte Sterole traten ausschließlich bei *Candida krusei* unter EMC120B12-Behandlung auf (siehe Abbildung 13, zwei unbekannte Sterole mit Retentionszeiten zwischen 14 und 15 Minuten). Die Charakterisierung dieser unbekannten Sterole wurde in weiter führenden Versuchen bewerkstelligt (vgl. Kapitel 2.3.2.1.2).

Aus eigenem Interesse wurde EMC120B12 noch im Cholesterol-Biosynthese-Assay getestet. Die Substanz zeigte dort keine Aktivität, wohingegen andere Azole wie Clotrimazol dort ebenfalls aktiv sind [2]. Die meisten Verbindungen, welche in unserem Arbeitskreis synthetisiert wurden, greifen auch in die

Cholesterol-Biosynthese ein (vgl. Kapitel 1.2.4, 1.3.2.2). In Kapitel 1.2 wird die autosomale, rezessive Erbkrankheit Antley-Bixler-Syndrom Typ I in Zusammenhang mit der humanen C14-Demethylase kurz vorgestellt. Dieses Syndrom trat auch als Folge einer Fluconazol-Behandlung in der Schwangerschaft auf, hervorgerufen durch Inhibition der humanen C14-Demethylase.

Dieser Sachverhalt, keine Aktivität in der Cholesterol-Biosynthese und die antimykotische Aktivität gegen Fluconazol-resistent geltende Stämme (v.a. *Candida krusei*) macht die Verbindung EMC120B12 besonders wertvoll.

# Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal human pathogens

Petra D. Keller<sup>1</sup>, Anke Burger-Kentscher<sup>2</sup>, Doris Finkelmeier<sup>2</sup>, Karl-Heinz Wiesmüller<sup>3</sup>, Karin Lemuth<sup>1</sup>, Ekkehard Hiller<sup>2</sup>, Isabel Engelhardt<sup>2</sup>, Christoph Müller<sup>5</sup>, Klaus Schröppel<sup>4</sup>, Franz Bracher<sup>5</sup> and Steffen Rupp<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Interfacial Engineering, University of Stuttgart, Nobelstr. 12, D-70569 Stuttgart  
<sup>2</sup> Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology (IGB), Nobelstr. 12, D-70569 Stuttgart  
<sup>3</sup> EMC microcollections GmbH, Sindelfinger Str. 3, D-72070 Tübingen  
<sup>4</sup> Institute of Medical Microbiology and Hygiene University Hospital Tübingen  
<sup>5</sup> Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians University, Butenandtstr. 5-13, D-81377 München

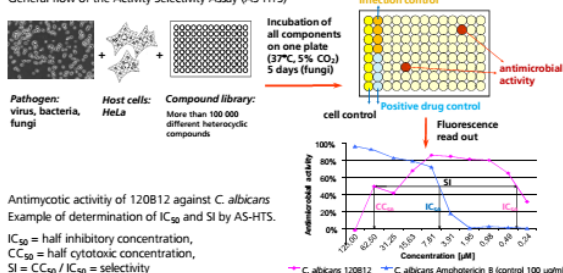


## Introduction

Fungal infections represent a serious health problem for immune suppressed patients who can be highly susceptible to life-threatening systemic infections. The increasing number of fungal infections and the development of resistance as well as the significant side effects result in the need for the identification of novel antifungal drugs. To identify novel compounds with broad selective antifungal activity we have used an assay to identify, evaluate and optimize tolerable and potent antimicrobial agents with broad selective antifungal activity for drug therapy. With this assay one promising lead compound, 120B12 a benzimidazole derivative, with a high antifungal activity against *Candida* spp. and good compatibility with human cells could be identified.

## Identification of novel antifungal compounds

General flow of the Activity Selectivity Assay (AS-HTS)



The **Activity-Selectivity High-Throughput-Screening Assay (AS-HTS)** constitutes the smallest unit of a natural infection. The host cells and the pathogen, e.g. *Candida* species, are incubated together in the presence of the antimicrobial compounds. All potential *in vitro* targets of the pathogen and the host cells can be covered simultaneously.

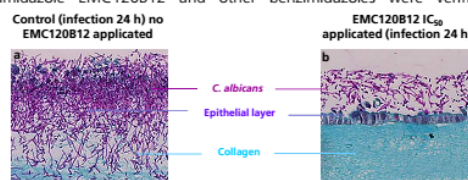
The survival of the host cell is determined to assess the efficiency and selectivity of the respective compound and is measured photometrically. Using this assay we screened more than 100,000 compounds for antimycotic activity. One hit, a benzimidazole derivative, showed high antifungal activity against *Candida* spp. and good compatibility with human cells. A lead compound series was developed and tested as well (Bauer et al., 2011).

## Characterisation and target identification of EMC120B12

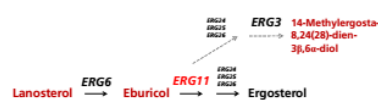
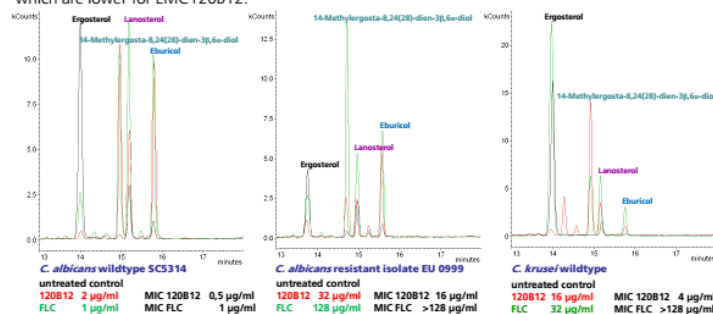
**3D *in vitro* tissue models** derived from epithelial cell lines grown on a collagen matrix were used to provide information about tissue penetration, tolerability and efficiency of EMC120B12. The antimycotic effect of EMC120B12 after infection with *C. albicans* could be shown.

**Transcriptome analyses** of *C. albicans* in presence or absence of EMC120B12 (benzimidazole, IC<sub>50</sub>=0.4 µM), of Fluconazole (azole, 1 µg/ml) and of Nocardazole (benzimidazole, 7.5 µg/ml) were performed by **microarray experiments**. These analyses revealed that EMC120B12 mostly affects genes required for the ergosterol pathway, like it is known for azoles. This is in contrast to other benzimidazole-derivatives, like nocardazole, which target microtubules. These differences concerning the target between the benzimidazole EMC120B12 and other benzimidazoles were verified via **immunofluorescence microscopy**.

Genes Substance	Ergosterol pathway	Microtubule associated
EMC120B12 - Benzimidazole	up	-
Nocardazole - Benzimidazole	-	up
Fluconazole - Azole	up	-



**Sterol analyses** of different *Candida* spp. treated with EMC120B12 were carried out by **GLC/MS** analysis. The data showed, that the lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase (*ERG11*) in the ergosterol pathway is the target for EMC120B12 as it is known for azoles. Sterol patterns of Fluconazole resistant strains revealed differences after EMC120B12 treatment compared to sterol patterns after Fluconazole treatment. These results match with the determined MICs, which are lower for EMC120B12.



## Conclusion

The benzimidazole derivative EMC120B12 is a promising new antifungal substance and acts on pathogenic yeast. It interacts with the ergosterol pathway and inhibits the lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase (*ERG11*) like azoles (Fluconazole) and does not act like other benzimidazole (Nocardazole). EMC120B12 also acts on Fluconazole resistant strains (like *C. krusei*) and the determined MICs are lower than for Fluconazole. It shows a good tissue penetration, efficiency and no cytotoxicity and has an antimycotic effect after infection with *Candida* spp. in complex 3D-epithelial tissue models. This could also be shown in multicellular organisms as demonstrated in first nematode models (not shown).

## Contact

Dr. Steffen Rupp  
 Fraunhofer IGB  
 Nobelstr. 12, D-70569 Stuttgart  
 phone: +49 711 970-4045  
 email: steffen.rupp@igb.fraunhofer.de

## References

Kleymann, G., Wierling, H. 2004. *Journal of Biomolecular Screening* 9(7): 578-587.  
 Bauer et al., 2011. *J. Med. Chem.* 13;54(19):6993-7.  
 Kilmartin J.V., Adams A.E.M. 1984. *Journal of Cell Biology* 98: 922-933.  
 Burger-Kentscher et al., 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(10):4789-801.  
 Giera et al., 2007. *Steroids* 72(8):633-42.

#### 2.3.2.1.1.3 Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen

Petra Keller, Anke Burger-Kentischer, Doris Finkelmeier, Karin Lemuth, Ekkehard Hiller, Isabel Engelhardt und Prof. Dr. Steffen Rupp waren verantwortlich für die Anzucht der Pilze, Durchführung der *Activity-Selectivity High-Throughput-Screening Assays*, 3D *in vitro tissue models*, Transkriptom-Analyse, Immunofluoreszenz-Mikroskopie und Erstellung des Posterbeitrages. Karl-Heinz Wiesmüller war für die Synthese/Bereitstellung der getesteten Substanzbibliothek und somit für Testsubstanz EMC120B12 verantwortlich. Die verwendeten, klinisch pathogen Pilze wurde von Klaus Schröppel bereitgestellt. Prof. Dr. Franz Bracher und ich waren für die Sterol-Analyse in den Pilzen verantwortlich. Mein eigener Beitrag am Poster war die Sterol-Analyse mittels GC-MS. Die Probenvorbereitung erfolgte im Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart, die Optimierung der Probenvorbereitung für die spezielle Anwendung an verschiedensten *Candida supp.* erfolgte unter meiner Anleitung.

### 2.3.2.1.2 Identifizierung neuer Sterole in *Candida krusei* nach Inkubation mit EMC120B12

**Müller C**, Keller PD, Engelhard I, Hiller E, Rupp S, Eickhoff H, Wiesmüller K-H, Bracher F.

*Accumulation of novel sterols caused by a new antifungal sterol C14-demethylase inhibitor.*

*Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Freiburg, Oktober 2013.*

#### 2.3.2.1.2.1 Zusammenfassung

In der Einleitung zur Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren und in Kapitel 1.3.1 wurde schon auf die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antimykotika eingegangen, weswegen darauf in diesem Kapitel verzichtet wird.

Im vorherigen Kapitel 2.3.2.1.1 wurde bereits auf die Identifizierung der fungalen C14-Demethylase als Targetenzym von EMC120B12 eingegangen. Dieses Kapitel befasst sich ausschließlich mit der Charakterisierung der unbekannten Sterole in *Candida krusei* nach Behandlung mit EMC120B12 und Fluconazol.

Einzelne Grafiken des Posters aus dem folgenden Kapitel 2.3.2.1.2.2 werden aus Gründen der Übersichtlichkeit hier einzeln präsentiert und ausführlich diskutiert

Der Schwerpunkt bei den bisherigen Untersuchungen von Azol-/Triazol-Antimykotika lag entweder bei dem klinisch pathogenen Pilz *Candida albicans*, der ungefähr 60 % aller nosocomialen Pilzinfektionen verursacht [34] oder bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die als sehr gut erforscht gilt. Bei diesen beiden Pilzen sowie in allen anderen Pilzen wurden bisher unter Inkubation mit C14-Demethylase-Inhibitoren außer dem Sterol **3** (Abbildung 14) keine anderen Sterole mit 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diendiol-Struktur beschrieben.

Warum nun ausgerechnet *Candida krusei* im Schwerpunkt der Untersuchungen stand, hatte folgende Gründe: a) steigende Zahl an tödlich verlaufenden Candidosen hervorgerufen von *Candida krusei* [44] und b) steigende Zahl an gegen Fluconazol resistenten Keimen (v.a *Candida krusei*) [43, 47].

Ebert et al. [45] konnten 1982 erstmals 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**3**) im Pilz *Ustilago maydis* (Maisbeulenbrand) unter Etaconazol-Behandlung (Triazol-Fungizid) nachweisen. Die Charakterisierung erfolgte mittels Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR). Die Arbeitsgruppe erstellte ein mögliches Biosynthese-Schema, wie Sterol **3** mit einer 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -Diol-Struktur als Endprodukt gebildet werden kann. Durch Inhibition der C14-Demethylase (**A**) kommt es entweder zuerst zur Demethylierung in Position C4 oder zur Methylierung in Position C24 durch die C24-Methyltransferase [42]. Aus Übersichtsgründen wurde dies in Abbildung 14 nur mit Schritt **B** dargestellt, da nicht sicher geklärt ist, in welcher Reihenfolge die beiden Schritte ablaufen (vgl. Abbildung 1 im folgendem Kapitel 1.3.1.2). Jedoch ist die Bildung von Obtusifoliol (14,4-Dimethylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol) als Vorläufer-Sterol für **3** in der Literatur mehrfach beschrieben [35, 45, 46]. Aus Obtusifoliol entsteht durch Abspaltung der verbliebenen Methylgruppe in





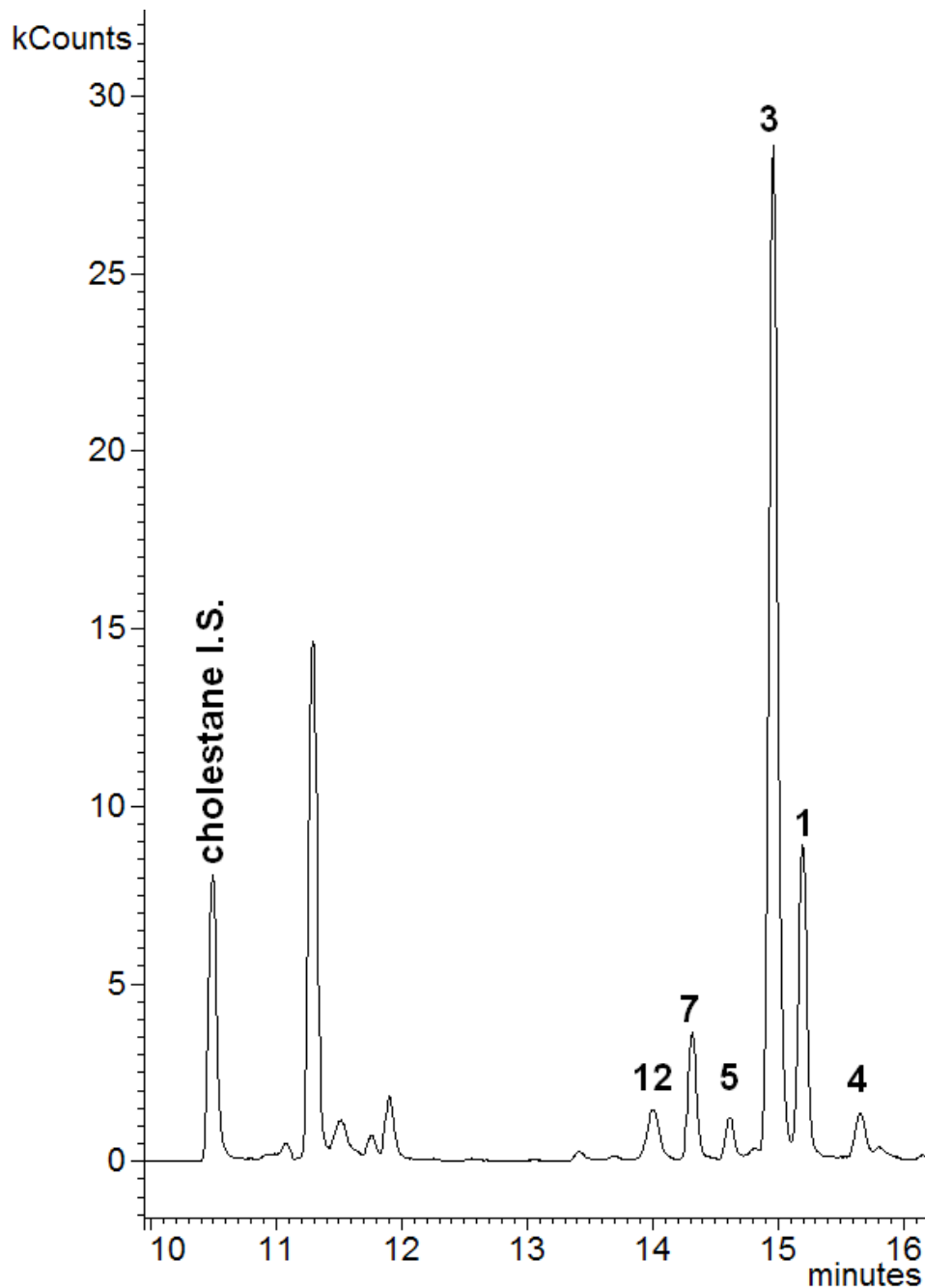
Abkürzung	Enzym
A	C14-Demethylase
B	C4-Demethylase-Komplex/ C24-Methyltransferase
C	C5-Desaturase
D	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase
E	C22-Desaturase
F	$\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

**Tabelle 5:** Beteiligte Enzyme im alternativen Biosyntheseweg in *Candida krusei* unter EMC120B12-Behandlung aus Abbildung 14

Abkürzung	Sterol (Trivialname) IUPAC Bezeichnung	M <sub>R</sub> (OH) M <sub>R</sub> (TMS) [g/mol]	RRT	Hauptfragmente [m/z]
1	Lanosterol Lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol	426,7 498,9	1,45	498 393* 241
2	14 $\alpha$ -Methylfecosterol 14 $\alpha$ -Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol	412,7 484,9	1,39	469 379* 227
3	14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	428,7 572,4	1,43	557 467 377*
4	14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	428,7 572,4	1,49	557 467* 377
5	14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dienol	426,7 570,4	1,39	570 465 123*
6	14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	426,7 570,4	(1,44)	(-)
7	14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	428,7 572,4	1,36	557 467 253*
8	14-Methylergosta-8-en-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	430,7 574,5	(1,40)	(-)
9	14-Methylergosta-7-en-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	430,7 574,5	(1,44)	(-)
10	14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	428,7 572,4	(1,40)	(-)
11	FF-MAS 4,4-Dimethylergosta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol	410,7 482,9	1,48	482 397* 377
12	Ergosterol Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol	396,7 468,9,1	1,33	378 363* 337

**Tabelle 6:** Sterole im alternativen Biosyntheseweg in *Candida krusei* unter EMC120B12-Behandlung aus Abbildung 14; die Angaben in der Tabelle sind in Analogie zu Kapitel 1.3.1.2, im Artikel Tabelle 1; auf die Angabe von Literaturstellen wurde verzichtet, da die meisten identifizierten Sterole bis jetzt als unbekannt gelten; (-) nicht detektiert; (RRT) entspricht der theoretischen relativen Retentionszeit, die auf Berechnungen basiert (siehe Text)

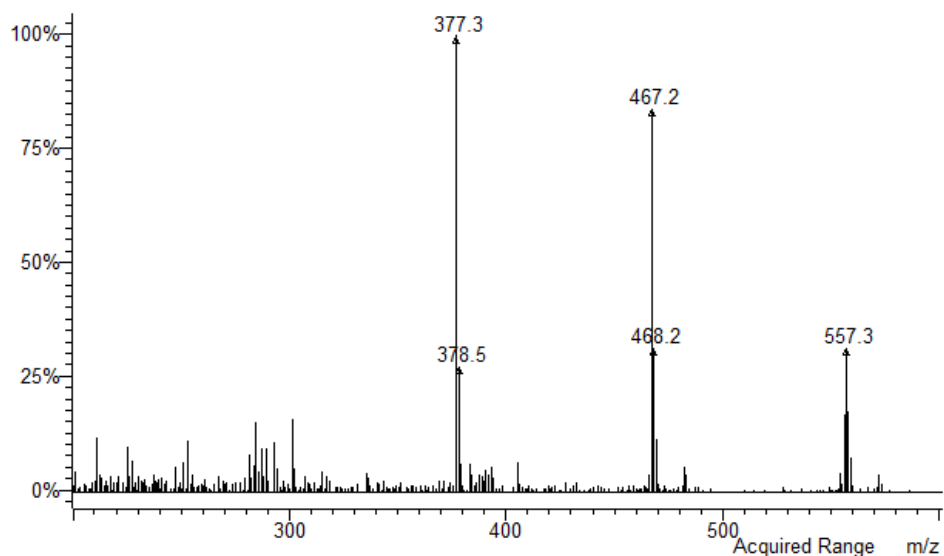
*Candida krusei* wurde mit EMC120B12 (2 µg/mL) inkubiert, aufgearbeitet und mittels GC-MS (*iontrap*) analysiert. Dabei wurde folgendes Chromatogramm erhalten (Abbildung 15):



**Abbildung 15:** Chromatogramm der Sterolfraction von *Candida krusei* nach Inkubation mit EMC120B12 (2 µg/mL) (vgl. Kapitel 2.3.2.1.2.2; hier vergrößert); Bei den unmarkierten Peaks handelt es sich nicht um Sterole

Die Sterole **1**, **3** und **12** traten wie zu erwarten unter C12-Demethylase-Inhibition auf und konnten folglich wie in Kapitel 1.3.1. (Entwicklung eines Testsystems zur Charakterisierung von Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren) beschrieben eindeutig als Lanosterol (**1**), 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**3**) und Ergosterol (**12**) identifiziert werden.

Die Sterole **4**, **5** und **7** waren jedoch in unserer Sterol-Datenbank nicht erfasst. Da diese Sterole nur unter C14-Demethylase-Inhibition auftraten, sprich nicht zum physiologischen Sterolmuster des Pilzes gehören, mussten diese in Zusammenhang mit der Enzyminhibition stehen. Die Massenspektren der TMS-Derivate der unbekannten Sterole zeigten, dass es sich um verwandte Verbindungen von Sterol **3** (14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol) handeln muss, wie aus nachfolgender Diskussion hervorgeht.



**Abbildung 16:** Massenspektrum des TMS-Ethers von 14-Methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (bekanntes Sterol); Sterol **3** in Abbildung 14

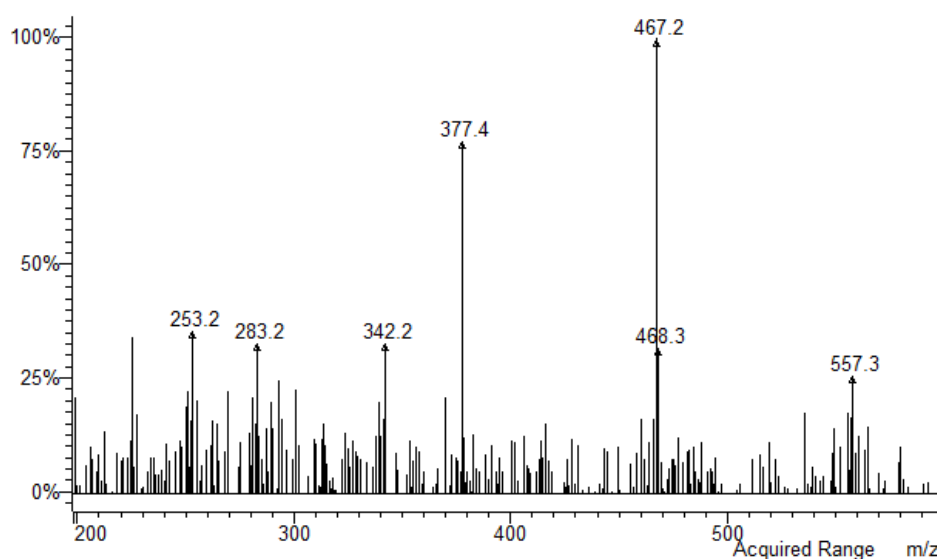
### Diskussion des Massenspektrums von Sterol 3:

Das Spektrum (Abbildung 16) von Sterol **3** (Retentionszeit 14,953 min, RRT 1,43) weist folgende Merkmale auf:

- Das Fragment  $m/z$  557  $[M-15]^+$  steht für die Abspaltung einer Methylgruppe (Me)
- Das Fragment  $m/z$  467  $[M-105]^+$  entspricht  $[M-Me-TMSOH]^+$
- Die Abspaltung der zweiten Trimethylsiloxan-Gruppe führt zum Massenfragment  $m/z$  377  $[M-195]^+$
- Dieses Sterol und dessen Spektrum gelten als Referenz für die Identifizierung der anderen drei Sterole (**4**, **5**, **7**)

### Diskussion des Massenspektrums von Sterol 4:

Sterol **4** konnte als 14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol identifiziert werden (Retentionszeit 15,653 min; RRT 1,49). Das Spektrum (Abbildung 17) weist keine Unterschiede zu dem TMS-Derivats von Sterol **3** auf, abgesehen vom größeren Grundrauschen und einer leicht verschobenen Intensität der Fragmente



**Abbildung 17:** Massenspektrum des TMS-Ethers von 14-Methylergosta-7,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (unbekanntes Sterol); Sterol **4** in Abbildung 14

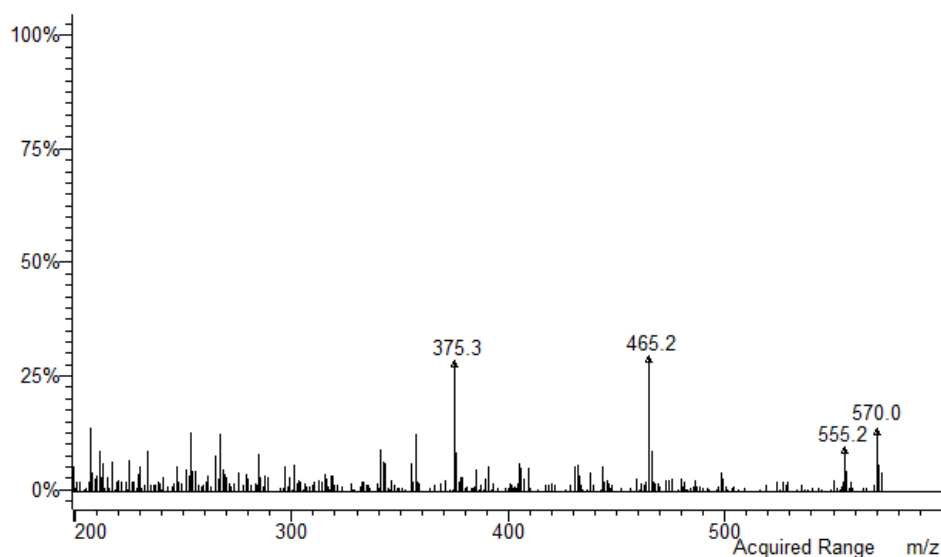
Dies ist typisch für Sterole die sich nur in der Lage der Doppelbindung (zwischen Position C7/8 bzw. C8/9) unterscheiden [1]. Theoretisch könnte die Doppelbindung nicht wie postuliert in Position C7/8 liegen sondern in Position C5/6 oder C22/23. Das Sterol kann die Doppelbindung in Position C5/6 nicht besitzen, da die C5-Desaturase dort bereits die 6 $\alpha$ -Hydroxy-Gruppe eingeführt hat. Die Doppelbindung

kann sich auch nicht in Position C22/23 befinden, da man in diesem Fall ein intensiveres Fragment der Seitenkette (Sc,  $m/z$  125) beobachten müsste (vgl. Sterol **5**, jeweils eine Doppelbindung in C22/23 und C24/28 Position). Außerdem wäre dann das Zerfallsmuster des Sterolgerüsts (Ringe A-D) charakteristischer, da sich dort keine Doppelbindung mehr befindet (vgl. Cholestan, intensives Fragment bei  $m/z$  217  $[M-155]^+$ ). Die einzige Möglichkeit die es noch gibt wäre, dass es sich um 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**10**) handeln könnte. Dies ist jedoch anhand der RRT nicht möglich, wie im Anschluss erläutert wird.

Da eine Umsetzung durch die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase sterisch gehindert ist durch die zusätzliche Methylgruppe in Position C14 und die zusätzliche Hydroxylgruppe in Position C6, laufen enzymatische Reaktionen bevorzugt in der Seitenkette ab. In Abbildung 15 ist daher die Peakfläche von **4** und **5** deutlich erniedrigt, dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass diese Sterole entweder nur Zwischenstufen sind (**5**) oder nicht bevorzugt gebildet werden wie Sterol **4**.

#### Diskussion des Massenspektrums von Sterol **5**:

Das Spektrum (Abbildung 18) von Sterol **5** (Retentionszeit 14,612 min, RRT 1,39) zeigt im Unterschied zu den Spektren von **3**, **4** und **7** (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 19) eine deutlich niedrigere Intensität der Fragmente.



**Abbildung 18:** Massenspektrum des TMS-Ethers von 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (unbekanntes Sterol); Sterol **5** in Abbildung 14

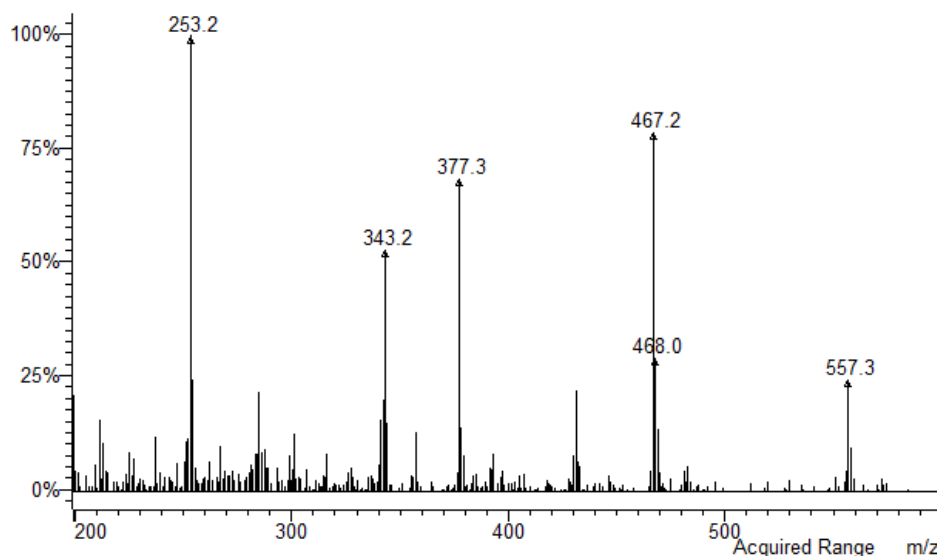
Das Hauptfragment (in der Abbildung nicht gezeigt) ist  $m/z$  123. Das Fragmentierungsmuster von **5** ist im Grunde identisch mit dem von **3**, **4** und **7**, allerdings sind die Fragmente um  $m/z$  2 leichter, was sich

mit dem Einbau einer dritten Doppelbindung erklären lässt. Der Einbau der Doppelbindung kann nur in Position C22/23 erfolgt sein, da der Angriff der C5-Desurase „nur“ eine 6 $\alpha$ -Hydroxygruppe bewirkt hat (vgl. Bildung von **3**) und somit im Ring B keine weitere Dehydrierung plausibel ist. Ein Einbau einer Doppelbindung in einer anderen Position in das Sterolgerüst ist mit der vorhandenen Enzymausstattung nicht möglich. Somit ergeben sich für Sterol **5** zwei mögliche Strukturen a) 14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**5**) und b) 14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**6**). Die Begründung warum es sich bei Sterol **5** um ein  $\Delta^8$ -Sterol handeln muss und nicht um ein  $\Delta^7$ -Sterol liegt in der Retentionszeit, da  $\Delta^7$ -Sterole später von der Säule eluieren als  $\Delta^8$ -Sterole (siehe weiter unten im Text). Außerdem ist der Ablauf von zwei enzymatischen Reaktionen, nämlich Einbau der Doppelbindung und  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Aktivität relativ unwahrscheinlich. Das Fragment  $m/z$  570 entspricht  $[M]^+$  des TMS-Derivates und das Fragment  $m/z$  123 entspricht der zweifach ungesättigten Seitenkette unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms (vgl. Sterol **4**). In der Literatur lassen sich dazu keine MS-Daten bezüglich eines Signals der Seitenkette mit einer Doppelbindung in Position C22/23 und C24/28 finden. Die MS-Angaben in der Literatur erfolgen meist nur bis  $m/z$  150 [45, 46], da solche Fragmente kleiner als  $m/z$  150 theoretisch aus dem Rauschen stammen könnten. Dieses Fragment  $m/z$  123 trat jedoch immer bei der Detektion von Sterol **5** auf, daher stammt es sicher aus dem Molekül. Ein intensives Signal der Seitenkette war zu erwarten da die konjugierten Doppelbindungen in Position C22/23 und C24/28 die Seitenkette besonders stabilisieren.

#### **Diskussion des Massenspektrums von Sterol 7:**

Sterol **7** (Retentionszeit 14,318 min; RRT 1,36) zeigte ebenfalls kaum Unterschiede im Spektrum (Abbildung 19) zu dem bekannten Sterol **3** und den unbekannten Sterolen **4**, **5** ( $m/z$  2).





**Abbildung 19:** Massenspektrum des TMS-Ethers von 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (unbekanntes Sterol); Sterol **7** in Abbildung 14

Beide Spektren von Sterol **3** und **7** (Abbildung 16, Abbildung 19) zeigen die Fragmente  $m/z$  557 [M-Me]<sup>+</sup>,  $m/z$  467 [M-Me-TMSOH]<sup>+</sup> und  $m/z$  377 [M-Me-2TMSOH]<sup>+</sup>. Sterol **7** zeigt zudem noch eine starke Intensität bei  $m/z$  253 [M-319]<sup>+</sup>, was für die zusätzliche Abspaltung der Seitenkette steht [M-Sc-Me-2TMSOH]<sup>+</sup>. Die Signalstärke dieses Fragmentes ist typisch für  $\Delta^{22}$ -Sterole, jedoch nicht für  $\Delta^{24}$ -Sterole [48]. Sterol **4** besitzt ebenfalls dieses Fragment. Aufgrund der Tatsache, dass Sterol **3** als eindeutig identifiziert gilt, muss Sterol **7** ähnlich sein, nur mit dem Unterschied, dass die  $\Delta^{24}$ -Reduktase die Doppelbindung enzymatisch reduzierte und die C22-Desaturase eine Doppelbindung in Position C22/23 einführte. Das Fragment  $m/z$  343 [M-229]<sup>+</sup> entspricht der Abspaltung eines TMSOH, der Seitenkette und einer Methylgruppe. Dieses Fragment ist nicht charakteristisch für die Bestimmung einer Lage der Doppelbindungen im Sterolgrundgerüst [48]. Theoretisch könnte die zweite Doppelbindung in Position C7/8 sein, das Sterol wäre dann nicht Sterol **7**, sondern 14-Methylergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (**10**) (vgl. Sterol **4**). Die Struktur von **7** lässt sich ebenfalls durch dessen Retentionszeit bestätigen, was im Anschluss besprochen wird.

Somit sollte Sterol **7** 14-Methylergosta-8,22-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol sein. Diese Abfolge an enzymatischen Reaktionen stellt auch das Ende der möglichen enzymatischen Reaktionen des Pilzes in der Seitenkette dar (vgl. Ergosterol). Das zeigt sich ebenfalls in der hohen Peakfläche von Sterol **7** (Abbildung 15) gegenüber den anderen neu identifizierten Sterolen (**4**, **5**). Sterol **3** ist das bevorzugt gebildete Sterol in *Candida krusei* unter EMC120B12-Behandlung, da dieses Sterol die mit Abstand größte Peakfläche besitzt (vgl. Abbildung 15).

Wie schon angesprochen kann man neu entdeckte Sterole auch anhand ihrer Retentionszeit zuordnen, indem man sogenannte Inkredimentenregeln aufstellt/anwendet.

Die bekannteste Regel ist der sogenannte Kováts Index. Dieser ist benannt nach dem Schweizer Chemiker Ervin Kováts. Durch die Verwendung von internen Standards (in diesem Fall Cholestan; siehe Abbildung 15) kann eine relative Retentionszeit berechnet werden (RRT). Da jedoch die Säulenofentemperatur und die stationäre Phase je nach GC-Methode variieren, ändert sich auch dementsprechend die RRT. Daher führte Kováts zusätzlich eine logarithmische Skala ein, die sich auf die Retentionszeiten der n-Alkane bezog [49]. Damit ist es möglich, eine Substanz zu charakterisieren, die zwischen zwei homologen n-Alkanen liegt. Diese Methode ist Bestandteil des IUPAC Gold Book. Stein et al. [50] erweiterten diese Methode nach Analyse von 35.000 organischen Molekülen und führten Inkredimentenregeln für funktionelle Gruppen ein. Damit kann man Retentionszeiten von Molekülen berechnen, die sich nur in einzelnen funktionellen Gruppen unterscheiden. Voraussetzung ist immer eine bekannte Verbindung.

Diese Vorgehensweise ist für die sichere Identifizierung der Sterole **4**, **5** und **7** nicht geeignet, da sich diese Sterole nur in der Lage der Doppelbindung bzw. Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden. Martin Giera beschreibt bereits in seiner Dissertation [1] das unterschiedliche Retentionsverhalten von Sterolen in der Cholesterol-Biosynthese. Für seine Arbeit war es nicht notwendig die Sterole anhand der Retentionszeit zu identifizieren/charakterisieren. Auch die Sterole in der Ergosterol-Biosynthese lassen sich gut mittels Gaschromatographie auftrennen (vgl. Tabelle 1 in folgendem Kapitel 1.3.1.2).

Durch die Erfahrung in der Identifizierung von Sterolen (vgl. Kapitel 1.2, 1.3.1) und der deutlich gewachsenen GC-MS-Datenbank von Sterolen mit Cholesterol- bzw. Ergosterol-Struktur konnten bestimmte relative Retentionszeiten-Regeln aufgestellt werden, die aus sicher charakterisierten Sterolen resultieren (Tabelle 7). Da in allen Versuchen Cholestan (Retentionszeit 10,510 min, RRT 1,00) als interner Standard verwendet wurde und sich weder das Säulenofentemperaturprogramm noch die GC-Säule änderte, konnten für die in Tabelle 7 aufgeführten Sterole die RRT experimentell ermittelt werden. Die RRTs wurden dann zueinander in Relation gesetzt. Die relative Retentionszeit (RRT) berechnet sich durch die gefundene Retentionszeit des Sterols geteilt durch die Retentionszeit von Cholestan.

Sterol 1	Sterol 2	$\Delta RRT$
Ergosta-7-enol	Ergosta-8-enol	+ 0,04
Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-8,22-dienol	+ 0,04
Ergosta-7,24-dienol	Ergosta-8,24-dienol	+ 0,04
Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-7,24-dienol	- 0,07
Ergosta-8,22-dienol	Ergosta-8,24-dienol	- 0,07
Ergosta-5,7,22-trienol	Ergosta-5,7,24-trienol	- 0,06
Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-7,22,24-trienol	- 0,04
Ergosta-8,22-dienol	Ergosta-8,22,24-trienol	- 0,04
Ergosta-7,24-dienol	Ergosta-7,22,24-trienol	+ 0,03
Ergosta-8,24-dienol	Ergosta-8,22,24-trienol	+ 0,03

**Tabelle 7:** Relative Unterschiede von verwandten Sterol-TMS-Ethern;  $\Delta RRT = RRT_{\text{Sterol 1}} - RRT_{\text{Sterol 2}}$ ;

RRT berechnet mit Retentionszeit Sterol-TMS-Ether / Retentionszeit Interner Standard (Cholestan)

Die Retentionszeiten-Regeln, die sich aus Tabelle 7 ergeben sind folgende (vgl. Kapitel 2.3.2.1.2.2):

- Die RRT von  $\Delta^7$ -Sterolen ist im Vergleich zu  $\Delta^8$ -Sterolen um +0,04 erhöht
- Die RRT von  $\Delta^{22}$ -Sterolen ist im Vergleich zu  $\Delta^{24}$ -Sterolen um -0,07 erniedrigt
- Die Einführung einer Doppelbindung in Position C24(28) bei bestehender Doppelbindung in Position C22(23) erhöht die RRT um 0,04
- Die Einführung einer Doppelbindung in Position C22(23) bei bestehender Doppelbindung in Position C24(28) erniedrigt die RRT um 0,03

### Identifizierung der Sterole 4 und 7 anhand der RRT:

Durch die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Aktivität kommt es zu einer Verschiebung der Doppelbindung von Position C8/9 zu C7/8, was mit einem veränderten chromatographischen Verhalten des Sterols einhergeht. Die Verschiebung der RRT beträgt +0,04 in allen drei Beispielen. Das bedeutet, dass  $\Delta^7$ -Sterole später von der Säule eluieren als  $\Delta^8$ -Sterole, genauer gesagt mit einem RRT-Unterschied von +0,04. Sterol **3** gilt als sicher identifiziert, dies bedeutet für Sterol **4**, welches als 14-Methylergosta-7,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol vermutet wurde, eine RRT von 1,47. Tatsächlich weist Sterol **4** eine RRT von 1,49 auf. Die massenspektroskopische Auswertung ließ noch die Struktur von Sterol **10** (14-Methylergosta-7,22-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol) als Möglichkeit offen. Die berechnete RRT für Sterol **10** ist jedoch 1,40, da die Doppelbindung von Position C8/9 in C7/8 wechselt (RRT+0.04) und die Änderung der Lage der Doppelbindung von C24/28 auf C22/23 die RRT um 0,07 verkürzt. Daher kann es sich bei der Verbindung mit RRT 1,49 nur um Sterol **4** handeln.

Lässt man das Fragmentierungsmuster völlig außer Acht und betrachtet nur die Tatsache, dass zwei Doppelbindungen und zwei Hydroxygruppen im Sterol enthalten sind, könnte es sich auch um Sterol **7** (14-Methylergosta-8,22-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol) handeln. Glücklicherweise befinden sich beide Sterole **4** und **7** in der *Candida krusei*-Probe nach Inkubation mit EMC120B12. Für Sterol **7** ergibt sich eine berechnete RRT nach  $\Delta^{24}$ -Reduktase- und C22-Desaturase Aktivität von 1,36 (Tabelle 7). Tatsächlich wurde ein Sterol mit genau dieser RRT gefunden. Anhand des Massenspektrums und der RRT sollte Sterol **7** somit eindeutig identifiziert sein, damit sind auch die letzten Zweifel an der Identifizierung von Sterol **4** ausgeräumt.

### Identifizierung von Sterol 5 anhand der RRT:

Die Auswertung des Massenspektrums von **5** (14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol) identifizierte dieses Sterol eindeutig als Sterol mit 3 Doppelbindungen. Da sich zwei Doppelbindungen in der Seitenkette befinden müssen, kann nur die Lage der Doppelbindung im Ring B variieren. In Frage kommen nur die Strukturen von Sterol **5** und Sterol **6** (14-Methylergosta-7,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol). Durch die C22-Desaturase-Aktivität kommt es zum Einbau einer dritten Doppelbindung in Position C22/23, was mit einer verlängerten Retentionszeit der gebildeten Sterole einhergeht (Unterschied der RRT +0,03) (Tabelle 7). In der Probe konnte ein Sterol mit drei Doppelbindungen und zwei Hydroxylgruppe gefunden werden mit einer RRT von 1,39. Die für Sterol **5** berechnete RRT beträgt 1,40. Somit muss das gefundene Sterol **5** (14-Methylergosta-8,22,24(28)-trien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol) sein und nicht Sterol **6** nach  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase Aktivität, da dies die Retentionszeit wie bei Sterol **4** erhöhen müsste. Sterol **6** sollte daher eine RRT von 1,44 haben.

Die Retentionszeiten-Regeln wurden mit der Arbeit von Gerst et al. [51] überprüft. Diese Arbeitsgruppe bestimmte mit einer vergleichbaren Säule ebenfalls mit Cholestan als internem Standard die RRT von 31 verschiedenen ungesättigten C<sub>27</sub>-Sterolen. Die Sterole zeigten dort die gleichen Veränderungen der Retentions-Eigenschaften wie in meiner Untersuchung.

Anhand dieser Regeln und der Massenspektren konnten die Sterole **4**, **5** und **7** eindeutig identifiziert werden. Für die im Biosynthese-Schema (Abbildung 14) postulierten, bislang aber nicht detektierten Sterole **6**, **8**, **9** und **10** konnten dadurch dennoch berechnete RRT zugewiesen werden (vgl. Tabelle 6, Tabelle 8). Zur Überprüfung der Vorgehensweise wurde jeweils die gefundene RRT eines 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -Dihydroxysterols als Fixpunkt gesetzt und alle anderen Sterole nach Tabelle 7 berechnet, auch Sterol **3**. Dadurch konnten von einem Sterol mehrere theoretische RRT bestimmt werden, von denen die jeweilige Standardabweichung, berechnet wurde. Kommt es zu einer deutlichen Schwankung der Standardabweichung der berechneten RRT, sollte die Identifizierung der neuen Sterole in Frage gestellt werden. Dies war jedoch nicht der Fall, wie Tabelle 8 belegt. Einziger Kritikpunkt der bleibt ist die gefundene RRT zur berechneten RRT von Sterol **4**, da hier die Abweichung zwischen beiden Werten relativ groß ist, jedoch die Standardabweichung der berechneten klein.

Sterol	Berechnete RRT	Gefundene RRT
3	1,44 $\pm$ 0,015	1,43
4	1,47 $\pm$ 0,006	1,49
5	1,41 $\pm$ 0,014	1,39
6*	1,44 $\pm$ 0,014	(-)
7	1,36 $\pm$ 0,017	1,36
8*	1,40 $\pm$ 0,012	(-)
9*	1,44 $\pm$ 0,012	(-)
10*	1,40 $\pm$ 0,014	(-)

**Tabelle 8:** Übersicht über die neu identifizierten bzw. postulierten (\*) Sterole anhand ihrer RRT;  $\pm$  Standardabweichung; (-) nicht detektiert

### Weiterführende Untersuchungen von EMC120B12 und Fluconazol

In nachfolgenden Experimenten wurde überprüft, ob nicht auch der Referenzinhibitor Fluconazol ebenfalls zur Bildung der Sterole **4**, **5**, **7** in *Candida krusei* führen kann. In der Tat zeigt auch Fluconazol dieses Sterolmuster, jedoch erst in einer Konzentration von 256 µg/mL (vgl. EMC120B12 bei 2 µg/mL).

Nach Charakterisierung der neuen Sterole konnte auch die Akkumulation von Sterol **7** (14-Methylergosta-8,22-dien-3β,6α-diol) in *Candida albicans* nach Inkubation mit EMC120B12 beobachtet werden, jedoch in deutlich geringer Menge.

14-Methylergosta-7,24(28)-dien-3β,6α-diol (**5**) konnte nicht in allen EMC120B12-behandelten *Candida krusei* Proben nachgewiesen werden, hingegen die Bildung der beiden anderen, bislang unbekannten Sterole **4** und **5** immer. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der bisherigen Erkenntnis, dass man zwar immer eine Enzym-Inhibition in der Ergosterol-Biosynthese erkennen kann, jedoch nicht immer die akkumulierenden Sterole vorhersagen kann.

### Ausblick

Welche physiologische Bedeutung der Bildung von Sterolen mit 3β,6α-Dihydroxy-Struktur zukommt und ob darin die starke antimykotische Aktivität von EMC120B12 gegenüber Fluconazol-resistenten Pilzen begründet liegt, muss in weiter führenden Studien untersucht werden.

Eine Publikation zu dem gesamten Kapitel 1.3.2.1 ist mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart in Vorbereitung.

## 2.3.2.1.2.2 Poster

## Accumulation of novel sterols caused by a new antifungal sterol C14-demethylase inhibitor

Müller C<sup>1</sup>; Keller PD<sup>2</sup>; Engelhardt P; Hiller E<sup>2</sup>; Rupp S<sup>2</sup>; Eickhoff H<sup>3</sup>; Wiesmüller K-H<sup>3</sup>; Bracher F<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Pharmacy – Center for Drug Research, LMU Munich, Butenandtstr. 5-13, 81337 Munich, Germany<sup>2</sup> Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology (IGB), Hebelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany<sup>3</sup> EMC microcollections GmbH, Sindelfinger Str. 3, 72070 Tübingen, Germany

## Introduction

Serious health problems for immunocompromised patients are often caused by (nosocomial) fungal infections. But the spreading resistance against conventional antifungals and a bad risk-benefit ratio necessitates the development and characterization of novel antifungal agents [1,2]. In a newly developed *in vitro* Activity-Selectivity High-Throughput-Screening Assay (AS-HTS-Assay) more than 100,000 different heterocyclic compounds were tested. A benzimidazole derivative (EMC120B12) was the most promising compound [3,4].

Despite of the benzimidazole structure the compound was clearly identified as a selective inhibitor of the fungal sterol C14-demethylase in a whole cell ergosterol biosynthesis inhibitor screening assay with GC-MS analysis [5]. But not only the marker sterol 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (3) accumulated in *C. krusei*, but also hitherto unknown related sterols. The novel sterols have a 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structural element and were identified through relative retention times and MS spectra.

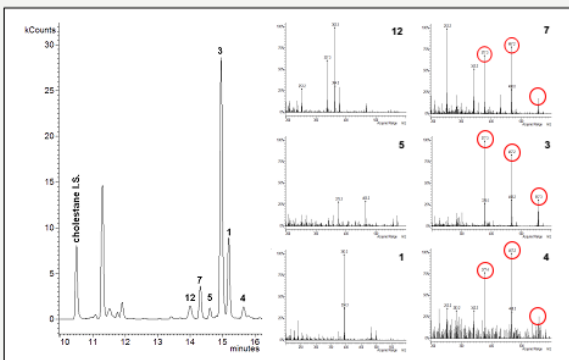
## Identification of novel sterols by GC-MS

## Problem

In fact mixtures of sterol-TMS ethers can be separated on a VF-5ms GC capillary column. But some sterols, only different in their double bond position, could not be clearly distinguished by MS spectra. Earlier analysis identified EMC120B12 as an inhibitor of fungal sterol C14-demethylase. Besides ergosterol (12) only lanosterol (1) and diol 3 should accumulate according to literature [5,6]. But in addition, new sterols 4, 5 and 7 were detected after incubation with EMC120B12 in *Candida krusei*. Their molecular masses suggested a 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structure according to 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (3). However their double bond positions were ambiguous.

## Solution

Comparison of relative retention times (RRT) of identified sterol-TMS ether pairs with related double bond positions from our own sterol database was performed. Cholestane was used as internal standard (RRT = 1.00). The differences of the RRTs were allocated with the RRT of the known 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (3) [5,6]. Similar sterol pairs had nearly the same  $\Delta$ RRT (Table 1). This behavior was used in combination with the MS data to identify the unknown sterols 4, 5 and 7. The detected RRTs of all 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structured sterols were rechecked by calculating their RRT by using the detected RRT of one 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structured sterol (4, 5, 7) as a fixed-point (Table 2).



Sterol 1	Sterol 2	$\Delta$ RRT	Sterol	Calculated RRT	Detected RRT
Ergosta-7-enol	Ergosta-8-enol	+ 0.04	3	1.436 $\pm$ 0.015	1.425
Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-8,22-dienol	+ 0.04	4	1.467 $\pm$ 0.006	1.493
Ergosta-7,24-dienol	Ergosta-8,24-dienol	+ 0.04	5	1.407 $\pm$ 0.014	1.394
Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-7,24-dienol	- 0.07	6	1.444 $\pm$ 0.014	-
Ergosta-8,22-dienol	Ergosta-8,24-dienol	- 0.07	7	1.364 $\pm$ 0.017	1.364
Ergosta-5,7,22-trienol	Ergosta-5,7,24-trienol	- 0.06	8	1.399 $\pm$ 0.012	-
Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-7,22,24-trienol	- 0.04	9	1.436 $\pm$ 0.012	-
Ergosta-8,22-dienol	Ergosta-8,22,24-trienol	- 0.04	10	1.404 $\pm$ 0.014	-
Ergosta-7,24-dienol	Ergosta-7,22,24-trienol	+ 0.03			
Ergosta-8,24-dienol	Ergosta-8,22,24-trienol	+ 0.03			

Table 1:  $\Delta$ RRT = RRT sterol 1 - RRT sterol 2

Table 2: Calculated RRTs standard deviation vs. detected RRT

Similar sterol-TMS ethers can be distinguished on the basis of their RRT on a VF-5ms GC capillary column using derived RRT rules of our study:

- RRT of  $\Delta^{7(8)}$ -sterols > RRT of  $\Delta^{8(9)}$ -sterols
- RRT of  $\Delta^{22(23)}$ -sterols < RRT of  $\Delta^{24(28)}$ -sterols
- Additional double bond at C24 resulted in **higher** RRT
- Additional double bond at C22 resulted in **lower** RRT

Proposed alternative biosynthesis route in *Candida krusei* under C14-demethylase inhibition

The detected novel sterols (green) from the GC-MS analysis were used to set up an alternative biosynthesis route considering the natural ergosterol biosynthesis pathway under C14-demethylase inhibition in *C. krusei*.

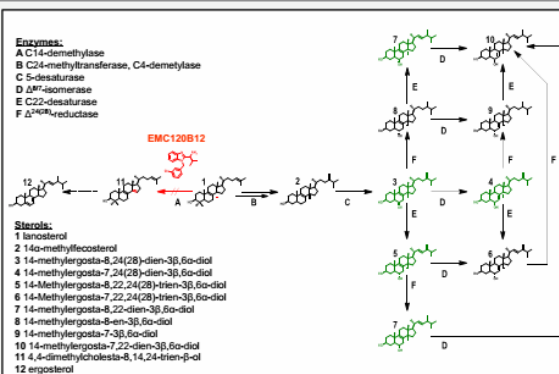
The scheme was extended to the hitherto undetected and in literature unknown 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structured sterols (black).

The formation of 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structured sterols is caused by an inhibition or lack of C14-demethylase. The 6 $\alpha$ -hydroxylation of a 14 $\alpha$ -methylated sterol is mediated by the enzyme 5-desaturase (C) [6].

Under treatment with the established C14-demethylase (A) inhibitor fluconazole similar sterol patterns were observed in *Candida krusei*, but only at drastically higher concentration (32  $\mu$ g/mL) than under EMC120B12 (1  $\mu$ g/mL).

The new sterols were exclusively detected in *C. krusei*. The expected sterols lanosterol (1), 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (3), and ergosterol (12) accumulated under EMC120B12 and fluconazole treatment in all other tested *Candida* species like *C. albicans* and *C. glabrata*.

The occurrence of such sterols demonstrates that 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol 3 is also a substrate for the enzymes  $\Delta^{8(7)}$ -isomerase (D), C22-desaturase (E), and  $\Delta^{24(28)}$ -reductase (F).



## Conclusion

The benzimidazole derivate EMC120B12 is a selective inhibitor of the fungal sterol C14-demethylase. Novel sterols were detected in *C. krusei* under treatment with EMC120B12 at significantly lower concentration (1  $\mu$ g/mL) than under fluconazole (32  $\mu$ g/mL).

These sterols have a 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol structure and were identified by MS spectra and RRT of known sterol pairs. Continuation analysis of EMC120B12 showed that this benzimidazole is a promising antifungal substance. The mode of action is similar to fluconazole but at a significantly lower concentration.

## References

- [1] Fridkin, SK, Jarvis, WR. Clin. Microbiol. Rev. 1996, 9(4): 499-511.
- [2] Vanden Bossche, H, Marichal, P, Odds, FC. Trends Microbiol. 1994, 2(10): 393-399.
- [3] Bauer, J, et al. J. Med. Chem. 2011, 54(19): 6993-6997.

- [4] Burger-Kentlicher, A, et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2011, 55(10): 4789-4801.
- [5] Müller, C, et al. Steroids 2012, 78(5): 483-493.
- [6] Kelly, SL, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 207(3): 910-915.

#### 2.3.2.1.2.3 Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen

Der gesamte Posterbeitrag wurde von mir allein erstellt. Der praktische Anteil an der Arbeit war die Sterol-Analyse mittels GC-MS. Die Probenvorbereitung erfolgte im Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart, die Probenvorbereitungsoptimierung für die spezielle Anwendung an verschiedensten *Candida supp.* erfolgte nach meiner Anleitung. Prof. Dr. Franz Bracher, Karl-Heinz Wiesmüller und Prof. Dr. Steffen Rupp waren verantwortlich für die redaktionelle Verbesserung des Posterbeitrages. Holger Eickhoff und Karl-Heinz Wiesmüller stellten die Testsubstanz EMC120B12 zur Verfügung. Petra Keller, Isabel Engelhardt, Ekkehard Hiller und Prof. Dr. Steffen Rupp führten die Inkubation der Pilze mit dem C14-Demethylase-Inhibitor durch und arbeiteten die Proben für die nachfolgende GC-MS Analyse auf. Petra Keller, Ekkehard Hiller und insbesondere Prof. Dr. Franz Bracher unterstützten mich bei Interpretation der Ergebnisse.



### 1.3.2.2 1Inhibitoren der $\Delta^{14}$ -Reduktase und der $\Delta^{8/7}$ -Isomerase

Krauss J, Müller C, Kießling J, Richter S, Staudacher V, Bracher F. *Synthesis and biological evaluation of novel N-alkyl tetra- and decahydroisoquinolines: Novel antifungals that target ergosterol biosynthesis. Archiv der Pharmazie* 2013;347:1-8.

#### 1.3.2.2.1 Zusammenfassung

In der Einleitung zur Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren und in Kapitel 1.3.1 wurde schon auf die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antimykotika eingegangen, weswegen darauf in diesem Kapitel verzichtet wird.

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit Strukturanaloga des antimykotisch aktiven  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitors **JK-250**, welcher in Kapitel 1.3.1 (vgl. Kapitel 1.3.1.2; Abbildung 2 im Artikel) vorgestellt wurde. Dieser Inhibitor konnte in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert (Jürgen Krauss) und charakterisiert werden. Bei der Verbindung handelt es sich um ein N-Alkyl-Decahydrochinolin. Im Mittelpunkt dieses Kapitels steht die Untersuchung von N-Alkyl-Tetra- und Decahydroisochinolin als neue Inhibitoren der Ergosterol-Biosynthese.

Verschiedene Forschergruppen untersuchten bereits ähnliche Strukturen auf Basis von partiell hydrierten Isochinolin und Aminonaphtholen (vgl. Kapitel 1.3.2.2.2; im Artikel im Abschnitt „Introduction“). Wichtige Strukturmerkmale für derartige Inhibitoren der Ergosterol-Biosynthese sind a) Länge der Alkylseitenkette, am besten zwischen 10 und 13 Kohlenstoffatome, b) Substitutionsmuster der Seitenkette und c) funktionelle Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen, um so High Energy Intermediates (HEI) zu simulieren (vgl. Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.5).

Darauf aufbauend sollten einfach und kostengünstig herstellbare Antimykotika synthetisiert werden. Durch N-Alkylierung der deprotonierten sekundären Amine mit entsprechenden Halogenalkanen konnten 12 neue Verbindungen hergestellt werden. Davon waren sechs Verbindungen mit Decahydroisochinolin- und jeweils drei mit Tetrahydroisochinolin- bzw. mit 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolin-Grundkörper.

Die so gewonnenen Verbindungen wurden wie in Abbildung 3 der arbeitskreisinternen biologischen Testung unterworfen. Im Agar-Diffusionstest zeigten die unverzweigten Undecylderivate (Verbindungen **1e**, **2c**, mit Abstrichen auch **3d**) sowie die verzweigt-kettige Verbindung **2d** eine antimykotische Aktivität vergleichbar mit der von Clotrimazol (Kapitel 1.3.2.2.2; Tabelle 1 im Artikel). Eine längere oder kürzere Alkylkette führte zum erwarteten Aktivitätsverlust. Keine Verbindung erwies sich im MTT-Test als zytotoxisch. Anhand der Ergebnisse in der biologischen Grundtestung wurden die vielversprechendsten Substanzen **1e**, **2c**, **2d** und zum Vergleich auch die schwächer wirksame dritte N-Undecyl-Verbindung **3d** im Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese-Assay getestet. In Tabelle 9 sind die „fehlenden“ Daten aus der Cholesterol-Biosynthese-Testung ergänzt. Diese wurden in der Publikation nicht verwendet,

das das primäre Ziel des Projektes war, Antimykotika zu entwickeln und nicht Cholesterolsenker. Die Verbindungen **1e** und **2c** zeigten eine Hemmung der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase, die anderen beiden Verbindungen **2d** und **3d** zeigten eine Hemmung der humanen  $\Delta^{14}$ -Reduktase (Tabelle 9). Ob diese Verbindungen auch mögliche  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren sind, konnte nicht nachgeprüft werden, da Cholesta-8,14-dienol kein Substrat der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase ist [52]. Die Inhibition des „Up-stream“ Enzyms  $\Delta^{14}$ -Reduktase ist so stark, dass kein natürliches Substrat des „Down-stream“ Enzyms  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase mehr vorliegt, welches weiter verstoffwechselt werden könnte (vgl. Abbildung 5). Durch Erniedrigung der Inhibitoren-Konzentration könnte ähnlich wie in Kapitel 1.2.7 (7-DHCR-Inhibitoren) eine  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase-Inhibitoren sichtbar gemacht werden. Eine Enzym-Selektivität der Verbindungen ist nicht gegeben, da sie in je nach zellulärem System entweder die  $\Delta^{14}$ -Reduktase oder  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase inhibieren.

Für die Entwicklung von neuen Antimykotika spielt die Enzym-Selektivität eine untergeordnete Rolle, wie z.B. die etablierte Substanzklasse der Morpholine beweist (vgl. Kapitel 1.3) [35]. Diese hemmen die  $\Delta^{14}$ -Reduktase und die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Das Decahydrochinolin-Derivat **JK-250** aus Kapitel 1.3.1 zeigte in allen Testsystemen (*Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) nur eine Aktivität auf die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase im Gegensatz zu den neuen Verbindungen.

Die bedeutendste Kenngröße ist jedoch der MHK-Wert. Mit Verbindung **1e** konnte eine hochaktive Substanz synthetisiert werden, die eine ähnliche biologische Aktivität zeigt wie der C14-Demethylase-Inhibitor Clotrimazol, jedoch mit mangelnder Enzym-Selektivität, da in *Candida glabrata* die  $\Delta^{14}$ -Reduktase gehemmt wird und in den anderen Pilzen (inklusive der humanen HL60-Zellen) die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase.

Die Testergebnisse zeigten, dass die geforderten Strukturmerkmale wichtig sind für die Entwicklung neuer Antimykotika. Die in diesem Kapitel vorgestellten Verbindungen bieten einen neuen Ansatzpunkt für die Herstellung von kostengünstigen und hochwirksamen Antimykotika, zumal sie keine Zytotoxizität an Humanzellen zeigten.

Substanz	Akkumulierendes Sterol	Inhibiertes Enzym
1e	Zymostenol	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase
2c	Zymostenol	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase
2d	Cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol	$\Delta^{14}$ -Reduktase
3d	Cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol	$\Delta^{14}$ -Reduktase

**Tabelle 9:** In der Publikation nicht aufgeführte biologische Testergebnisse aus dem Cholesterol-Biosynthese-Assay (siehe Kapitel 1.3.2.2.2)

## 1.3.2.2.2 Artikel

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2014, 347, 1–8

1

## Full Paper

**Synthesis and Biological Evaluation of Novel *N*-Alkyl Tetra- and Decahydroisoquinolines: Novel Antifungals that Target Ergosterol Biosynthesis****Jürgen Krauss, Christoph Müller, Julia Kießling, Sabine Richter, Verena Staudacher, and Franz Bracher**

Department of Pharmacy, Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

A series of *N*-alkyl *trans*-decahydroisoquinoline, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, and 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives were synthesized starting from the respective secondary amines by *N*-alkylation with alkyl bromides. The compounds with  $C_{11}$ -alkyl chains showed antifungal potency comparable to clotrimazole, and inhibit enzymes of the ergosterol biosynthesis ( $\Delta 14$ -reductase and  $\Delta 8,7$ -isomerase), depending on the heterocyclic scaffold and the investigated species.

**Keywords:** Antifungal activity / Enzyme inhibitor / Ergosterol biosynthesis /  $\Delta 8,7$ -Isomerase /  $\Delta 14$ -Reductase

Received: September 6, 2013; Revised: October 15, 2013; Accepted: October 18, 2013

DOI 10.1002/ardp.201300338

**Introduction**

The discovery and development of new antifungal drugs is an important aim in modern medicinal chemistry. The increasing number of systemic mycoses caused by fungi resistant to the commonly used drugs is a severe problem, especially in immunocompromised patients like AIDS, cancer, or organ-engrafted patients [1, 2].

Ergosterol biosynthesis is one of the most interesting targets in development of new antifungal drugs [3, 4]. Three therapeutically used antifungal drug classes (Fig. 1), the azoles (e.g., clotrimazole and fluconazole), the allylamines (naftifine and terbinafine), and the morpholine amorolfine target concise enzymes in this biosynthetic pathway [1, 5]. The azoles inhibit the CYP enzyme C14-demethylase, the allylamines inhibit squalene epoxidase, and amorolfine (as well as a number of analogs used in crop protection [6]) inhibits both  $\Delta 8,7$ -isomerase and  $\Delta 14$ -reductase. But until now, not for all druggable enzymes of the post-squalene part of ergosterol biosynthesis inhibitors are developed or commercially available.

It is well known that partially hydrogenated isoquinoline derivatives exhibit antifungal activity by inhibition of enzymes in ergosterol biosynthesis. In 2008, Rahier et al. [7] showed that a complex *N*-geranyl decahydroisoquinolinol derivative inhibits the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase in ergosterol biosynthesis. Zhu et al. [8] found that *N*-alkyl 6,7-dihydroxy-tetrahydroisoquinolines exhibit antifungal activity due to an inhibition of the enzyme C14-demethylase, and that their potency strongly depends on the length of the alkyl substituent, and similar results were reported by Yao et al. [9] for 2-alkylamino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenes. Furthermore, de Savignac et al. [10] found that the antifungal activity of 1-alkylimidazoles depends on the length of the alkyl chain as well, but they did not elucidate the target enzyme. In all of these cases, the highest activities were found for compounds with decyl to tridecyl side chains. Patrick and Kinsman [11] reported on antifungal tetrahydro- and octahydroisoquinolines, but did not investigate the target enzyme.

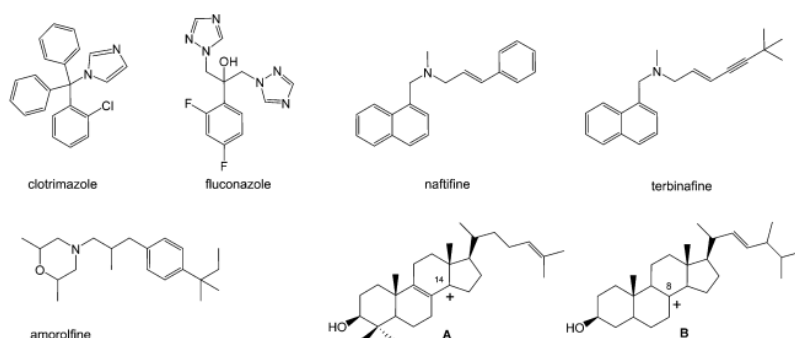
In continuation of our work on the development of ergosterol biosynthesis inhibitors as novel antifungals [12–15], we investigated *N*-alkyl deca- and tetrahydroisoquinoline derivatives. We expected that in analogy to Rahier's complex congener [7], these compounds should (in their protonated forms occurring under physiological conditions) be able to mimic the rings A + B of the sterol backbone as well as the carbocationic high energy intermediate (HEI) of the

**Correspondence:** Prof. Dr. Franz Bracher, Department of Pharmacy, Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich, Germany.  
**E-mail:** franz.bracher@cup.uni-muenchen.de  
**Fax:** +49 89 218077802

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH &amp; Co. KGaA, Weinheim

2 J. Krauss *et al.*

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2014, 347, 1–8



**Figure 1.** Structures of selected marketed antifungal drugs. Amorolfine mimics the carbocationic high energy intermediates (HEI) of the enzymatic reactions catalyzed by  $\Delta 14$ -reductase (**A**) and  $\Delta 8,7$ -isomerase (**B**).

conversion catalyzed by the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase in ergosterol biosynthesis (Fig. 1, A). Thus, the new derivatives represent easy-to-prepare and cheap human or crop antifungals.

## Results and discussion

### Chemistry

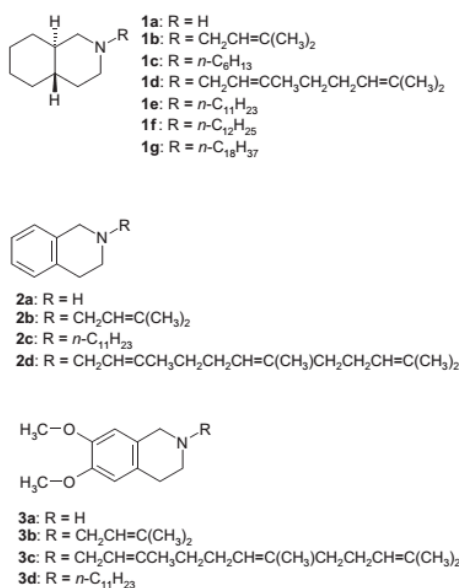
Secondary amines are conveniently converted to tertiary amines by reductive *N*-alkylation, and this method can also be used to prepare *N*-alkyl isoquinoline derivatives [16, 17]. But the required aldehydes are often not commercially available or not stable for longer time. Therefore they must be synthesized from the corresponding alcohols by appropriate methods. To avoid this problem we chose an approach by direct alkylation of the amines with alkyl halides.

Commercially available racemic *trans*-decahydroisoquinoline (**1a**) [18], 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**2a**), and 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**3a**) were to be alkylated with different alkyl bromides. Since direct alkylation was found to proceed quite sluggishly, the secondary amines were first deprotonated with sodium hydride. The resulting anions were alkylated with the appropriate alkyl bromides to give the tertiary amines **1b–g/2b–d/3b–d** in good yields (75–90%). We investigated linear and terpenoid-like, branched alkyl residues of various length, which should be able to mimic rings C and D of the sterol backbone, as well as the lipophilic side-chain of ergosterol (intermediates) to different extents (Scheme 1).

### Biological activity

The antifungal and antibacterial activity of the resulting compounds was determined in an agar diffusion assay on four strains of bacteria (gram-negative and gram-positive) and four

strains of fungi (the yeasts *Candida glabrata* and *Yarrowia lipolytica*, the mold *Aspergillus niger*, and the dermatophyte *Hyphopichia burtonii*). The compounds showed no or only weak activity against bacteria. But especially the compounds with unbranched undecyl ( $C_{11}$ ) substituents (**1e**, **2c**, to a lesser extent **3d**) showed high activity against all tested fungi, with zones of inhibition comparable to those caused by



**Scheme 1.** Starting materials (**1a**, **2a**, and **3a**) and *N*-alkyl products.

clotrimazole. Noteworthy antifungal effects were also found for the *N*-dodecyl homolog **1f** and for compounds bearing branched geranyl ( $C_{10}$  in **1d** and **3c**) and farnesyl ( $C_{15}$  in **2d**) residues, whereas shorter (**1b**, **1c**, **2b**, and **3b**) and significantly longer chains (**1g**) led mostly to a loss of antimicrobial activity (Table 1).

For the most active compounds identified in the agar diffusion assay (**1e**, **2c**, and **2d**), we determined minimum inhibitory concentration (MIC) values by a microdilution method [19]. Since both **1e** and **2c** contain *n*-undecyl chains, we also included *n*-undecyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**3d**) into further investigations. As model strain, we selected *C. glabrata*, since this yeast is a relevant opportunistic pathogen with pronounced resistance against the standard medication fluconazole in immunocompromised patients [20]; for comparison we also tested on *Saccharomyces cerevisiae* and *Y. lipolytica* [13]. The *n*-undecyl compounds showed high activity, with the decahydroisoquinoline derivative **1e** being the most active one, equipotent with clotrimazole. The results are shown in Table 2 and Fig. 2.

The compounds listed in Table 2 were subjected to our whole-cell assay for identification of the target enzyme in ergosterol biosynthesis [13]. In this assay, the strains *C. glabrata*, *S. cerevisiae*, and *Y. lipolytica* were incubated with the test compounds, and after cell lysis changes in the sterol pattern were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). The chromatograms obtained after incubation with the *n*-undecyl compounds are shown in Fig. 2. Compound **2d** acted like **2c**, hence only the chromatogram of **2c** is shown in Fig. 2. The accumulation of the  $\Delta 8(9)$ -sterols lichesterol (ergosta-5,8(9),22-trien-3 $\beta$ -ol) and ergosta-5,8,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol (for *Y. lipolytica*) clearly indicates an inhibition of the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase, the  $\Delta 8,14$ -sterol 4,4-dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol is the substrate of the enzyme  $\Delta 14$ -reductase [13]. The accumulation of 24-dehydroergosterol (Fig. 2, chromatograms YL2–YL4; not listed in Table 2) is no indicator for enzyme inhibition in *Y. lipolytica*, since natural fluctuating amounts of ergosterol and its direct biosynthetic precursor 24-dehydroergosterol were already observed as a normal behavior of this strain [13]. The

**Table 1.** Results of the agar diffusion assay: diameters of zones of inhibition in mm.

	<b>1b</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>	<b>1e</b>	<b>1f</b>	<b>1g</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>	<b>2d</b>	<b>3b</b>	<b>3c</b>	<b>3d</b>	<b>te</b>	<b>cl</b>
<i>Escherichia coli</i>	0	0	10	0	7	0	0	0	0	0	0	8	33	0
<i>Pseudomonas marginalis</i>	0	0	10	0	6	0	0	0	0	0	0	8	31	0
<i>Staphylococcus equorum</i>	0	0	12	n.t.	6	0	0	15	18	0	0	7	33	11
<i>Streptococcus entericus</i>	0	0	13	9	6	0	0	17	11	0	10	7	32	11
<i>Candida glabrata</i>	10	0	13	19	6	0	0	15	14	0	8	7	n.t.	18
<i>Aspergillus niger</i>	6	0	12	14	6	0	0	10	14	6	9	7	n.t.	26
<i>Yarrowia lipolytica</i>	18	0	10	11	6	0	0	7	10	0	8	10	n.t.	17
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0	0	11	28	6	0	0	11	16	0	5	8	n.t.	26

Compounds were tested in triplicate at 50  $\mu$ g/disc. Reference drugs: te, tetracycline, cl, clotrimazole. n.t., not tested.

**Table 2.** MIC values and target enzymes in ergosterol biosynthesis on *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Yarrowia lipolytica*.

	<i>Candida glabrata</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Yarrowia lipolytica</i>		
	MIC ( $\mu$ g/mL)	Accumulating sterols	Inhibited enzyme	MIC ( $\mu$ g/mL)	Accumulating sterols	Inhibited enzyme	MIC ( $\mu$ g/mL)	Accumulating sterols	Inhibited enzyme
<b>1e</b>	2.5	4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol	$\Delta 14$ -Reductase	0.25	Lichesterol	$\Delta 8,7$ -Isomerase	10	Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol	$\Delta 8,7$ -Isomerase
<b>2c</b>	5	Lichesterol	$\Delta 8,7$ -Isomerase	1	Lichesterol	$\Delta 8,7$ -Isomerase	25	–	No inhibition
<b>2d</b>	25	Lichesterol	$\Delta 8,7$ -Isomerase	25	Lichesterol	$\Delta 8,7$ -Isomerase	2.5	Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol	$\Delta 8,7$ -Isomerase
<b>3d</b>	10	–	No inhibition	2.5	–	No inhibition	10	–	No inhibition
<b>cl</b>	2.4	Lanosterol, 14-methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	C14-Demethylase	0.7	Lanosterol, 14-methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	C14-Demethylase	2.2	Lanosterol, 14-methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol	C14-Demethylase

cl, clotrimazole.

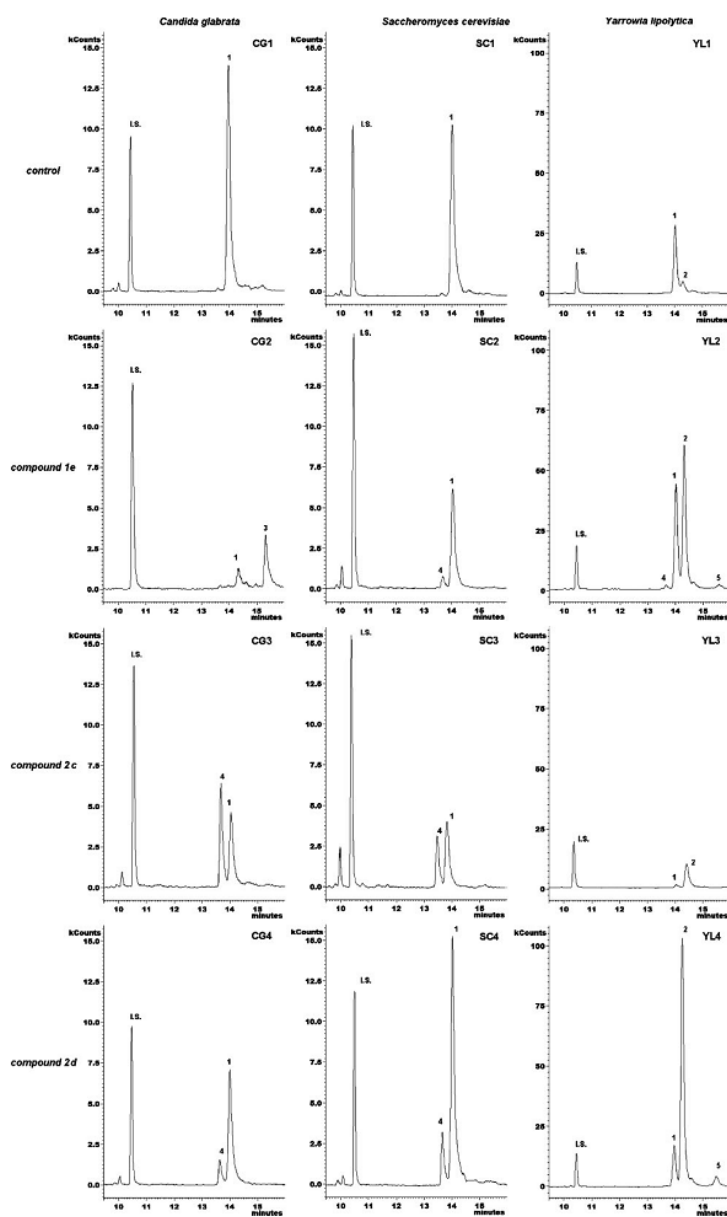


Figure 2. Continued.

tetrahydroisoquinoline derivatives **2c** and **2d** were found to be inhibitors of  $\Delta 8,7$ -isomerase in *C. glabrata* and *S. cerevisiae*, whereas the decahydroisoquinoline **1e** inhibits  $\Delta 14$ -reductase in *C. glabrata*, but  $\Delta 8,7$ -isomerase in *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica*. Otherwise, **2c** showed no effect on *Y. lipolytica* in our whole-cell assay for identification of the target enzyme in ergosterol biosynthesis, and a minor activity in the agar diffusion assay. The dimethoxytetrahydroisoquinoline **3d** is, despite its pronounced antifungal activity, not an inhibitor of the post-oxidosqualene part of ergosterol biosynthesis in all species (Table 2).

In order to detect undesired general cytotoxicity on human cells, the active compounds were tested in an MTT assay [21] on HL 60 cells. None of the compounds showed noteworthy cytotoxicity in this assay.

## Conclusion

From the results of the agar diffusion assay first structure-activity relationships can be deduced. The antifungal activity of the tested compounds strongly depends on the length of the alkyl chain, with an optimum of about 10–12 carbon atoms, whereas longer or shorter alkyl chains lead to a decrease or complete loss of activity. This parallels observations with related *N*-alkyl heterocycles [7, 8] and 2-alkylamino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenes [9]. Among the heterocyclic scaffolds, the *trans*-decahydroisoquinoline was found to lead to highest activities, comparable to the reference antifungal drug clotrimazole.

Analysis of the target enzymes in ergosterol biosynthesis revealed interesting differences between the almost equipotent compounds **1e**, **2c**, and **3d**, all of them bearing the *N*-undecyl residue. In contrast to the antifungal drug amorolfine (Fig. 1) and related *N*-alkylmorpholines and -piperidines used in crop protection, which inhibit both  $\Delta 14$ -reductase and  $\Delta 8,7$ -isomerase, although at different extents [4, 6], our compounds were found to be inhibitors of either one or the other of these two enzymes.

The decahydroisoquinoline **1e** was found to inhibit the enzyme  $\Delta 14$ -reductase in *C. glabrata*, although an additional inhibition of the downstream enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase cannot be fully excluded. In *S. cerevisiae*, however, the same compound

is an inhibitor of  $\Delta 8,7$ -isomerase. In previous investigations [13], we had seen changes in the relative concentrations of accumulating sterols in different fungal strains, but the complete shift to a different target enzyme seen here is very surprising. In contrast, tetrahydroisoquinoline **2c** is a selective inhibitor of the enzyme  $\Delta 8,7$ -isomerase, with no detectable effect on  $\Delta 14$ -reductase, in both strains. This parallels our recent findings on the 1-undecyl-*trans*-decahydroisoquinoline JK-250 as an inhibitor of the  $\Delta 8,7$ -isomerase [13]. In strong contrast, the 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivative **3d** did not inhibit any of the enzymes in the later part of ergosterol biosynthesis (Table 2). Dihydroxy congeners of **3d** had been described as interesting non-azole type inhibitors of the enzyme C14-demethylase previously [8].

The findings presented here indicate that a proper length of the *N*-alkyl substituent is of decisive importance for the activity of antifungal tertiary amines, whereas the molecular mode of action (target enzyme) is mainly determined by the heterocyclic core, and may even be different for the same inhibitor in different fungal species.

The described compounds, especially the potent decahydroisoquinoline **1e**, are interesting lead structures for the development of new antifungals because of their high and selective activity, their inexistant cytotoxicity on human cells, and their short and simple synthesis.

## Experimental

### Materials and methods

IR-spectra: Perkin-Elmer FT-IR Paragon 1000; MS: Hewlett Packard MS-Engine, electron ionization (EI) 70 eV, chemical ionization (CI) with  $\text{CH}_4$  (300 eV); HR-MS: Jeol JMS GCmate II. NMR: JNM-Eclipse + 500 (500 and 125 MHz), JNM-Eclipse + 400 (400 and 100 MHz); flash column chromatography (FCC): silica gel 60 (230–400 mesh, E. Merck, Darmstadt), melting points: Büchi, not corrected.

### General procedure for the synthesis of tertiary amines

Twelve millimole (unless stated otherwise below) of the secondary amine (**1a/2a/3a**) was dissolved in 30 mL of anhydrous tetrahydrofuran (THF) and 720 mg (30 mmol) sodium hydride was added. The suspension was refluxed for 1 h and then 10 mmol of the alkyl bromide was added. The mixture was refluxed for another 5 h and

**Figure 2.** Extracted ion chromatograms of the accumulating sterols after treatment with inhibitors; CG1–CG4: test strain *Candida glabrata*; CG1: control ( $m/z$  217 + 363 + 397); CG2: compound **1e** 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 397); CG3: compound **2c** 2.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 397); CG4: compound **2d** 5.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 397); SC1–SC4: test strain *Saccharomyces cerevisiae*; SC1: control ( $m/z$  217 + 363 + 397); SC2: compound **1e** 0.1  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 397); SC3: compound **2c** 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 397); SC4: compound **2d** 5.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 397); YL1–YL4: test strain *Yarrowia lipolytica*; YL1: control ( $m/z$  217 + 363 + 361 + 397); YL2: compound **1e** 2.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 361 + 397); YL3: compound **2c** 5.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 361 + 397); YL4: compound **2d** 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ( $m/z$  217 + 363 + 361 + 397). Sterols: I.S. = cholestane (internal standard; prominent ion  $m/z$  217), **1** = ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol; prominent ion  $m/z$  363), **2** = 24-dehydroergosterol (ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol; prominent ion  $m/z$  361), **3** = FF-MAS (4,4-dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol; prominent ion  $m/z$  397), **4** = lichesterol (ergosta-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol; prominent ion  $m/z$  363), **5** = ergosta-5,8,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol (prominent ion  $m/z$  361).



then quenched carefully with 50 mL of water. The organic layer was separated and the aqueous layer extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by FCC (ethyl acetate/triethylamine 9:1) to give the analytical pure amines.

**(±)-2-(3-Methyl-but-2-enyl)-trans-decahydroisoquinoline (1b)**

Prepared from 1.67 g (12 mmol) (±)-trans-decahydroisoquinoline (**1a**) and 1.49 g (10 mmol) 1-bromo-3-methylbut-2-ene to give 1.8 g (87%) of **1b**. HR-MS: calcd. for  $C_{14}H_{25}N$ : 207.1987. Found: 207.1989. MS (CI):  $m/z$  (%) = 208 ( $M^+ + 1$ , 60), 152 (100). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2919, 2852, 1446, 1375, 1287, 1167, 1086, 847.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.78–1.72 (m, 13H, 2CH, 7CH<sub>2</sub>), 1.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.90 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 1'-H), 2.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 5.26 (m, 1H, -CH=, 2'-H).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 17.95 (CH<sub>3</sub>), 25.87 (CH<sub>3</sub>), 26.05 (CH<sub>2</sub>), 26.46 (CH<sub>2</sub>), 29.57 (CH<sub>2</sub>), 32.91 (CH<sub>2</sub>), 33.01 (CH<sub>2</sub>), 41.87 (CH), 41.88 (CH), 54.38 (CH<sub>2</sub>), 56.45 (CH<sub>2</sub>), 60.48 (CH<sub>2</sub>), 121.53 (-CH=), 134.47 (quat. C).

**(±)-2-Hexyl-trans-decahydroisoquinoline (1c)**

Prepared from 1.67 g (12 mmol) (±)-trans-decahydroisoquinoline (**1a**) and 1.65 g (10 mmol) 1-bromohexane to give 1.41 g (63%) of **1c** as a pale brown oil. HR-MS: calcd. for  $C_{15}H_{29}N$ : 223.2300. Found: 223.2288. MS (EI):  $m/z$  (%) = 223 ( $M^+$ , 6), 152 (100). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2920, 2800, 1466, 1446, 1169, 1107, 974.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) = 0.88 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.97 (m, 1H, CH), 1.22 (m, 1H, CH), 1.28 (m, 10H, 5CH<sub>2</sub>), 1.51 (m, 7H, 4CH<sub>2</sub>), 1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.89 (dt,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 11.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.79 (ddd,  $J$  = 1.7 Hz,  $J$  = 3.5 Hz,  $J$  = 11.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.95 (dt,  $J$  = 2.3 Hz,  $J$  = 3.7 Hz,  $J$  = 11.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) = 14.12 (CH<sub>3</sub>), 22.70 (CH<sub>2</sub>), 26.17 (CH<sub>2</sub>), 26.57 (CH<sub>2</sub>), 27.00 (CH<sub>2</sub>), 27.54 (CH<sub>2</sub>), 30.85 (CH<sub>2</sub>), 31.91 (CH<sub>2</sub>), 33.02 (CH<sub>2</sub>), 41.83 (CH), 42.02 (CH), 54.61 (CH<sub>2</sub>), 59.36 (CH<sub>2</sub>), 60.69 (CH<sub>2</sub>).

**(±)-2-((E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)-trans-decahydroisoquinoline (1d)**

Prepared from 1.67 g (12 mmol) (±)-trans-decahydroisoquinoline (**1a**) and 2.17 g (10 mmol) (E)-1-bromo-3,7-dimethylocta-2,6-diene to give 2.15 g (78%) of **1d** as a pale brown oil. HR-MS: calcd. for  $C_{19}H_{33}N$ : 275.2613. Found: 275.2618. MS (CI):  $m/z$  (%) = 276 ( $M^+ + 1$ , 76), 152 (100). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2920, 2852, 2758, 1670, 1458, 1446, 1376, 1286, 1223, 1136, 1110, 1095, 1079, 977, 847, 832.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.78–1.93 (m, 14H, 2CH, 7CH<sub>2</sub>), 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.05 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.94 (m, 3H, 2CH<sub>2</sub>), 5.06 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, =CH-), 5.27 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, =CH-).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 16.37 (CH<sub>3</sub>), 17.67 (CH<sub>3</sub>), 25.70 (CH<sub>2</sub>), 26.06 (CH<sub>2</sub>), 26.35 (CH<sub>2</sub>), 26.48 (CH<sub>2</sub>), 30.74 (CH<sub>2</sub>), 32.91 (CH<sub>2</sub>), 32.99 (CH<sub>2</sub>), 39.75 (CH<sub>2</sub>), 41.88 (2CH), 54.31 (CH<sub>2</sub>), 56.40 (CH<sub>2</sub>), 60.46 (CH<sub>2</sub>), 121.24 (-CH=), 124.16 (-CH=), 131.47 (2 quat. C).

**(±)-2-Undecyl-trans-decahydroisoquinoline (1e)**

Prepared from 1.67 g (12 mmol) (±)-trans-decahydroisoquinoline (**1a**) and 2.35 g (10 mmol) 1-bromoundecane to give 2.1 g (74%) of **1e** as a pale brown oil. HR-MS: calcd. for  $C_{20}H_{39}N$ : 293.3082. Found: 293.2040. MS (CI):  $m/z$  (%) = 294 ( $M^+ + 1$ , 34), 152 (100). MS

(EI):  $m/z$  (%) = 293 ( $M^+$ , 2), 292 (4), 152 (100). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2922, 2853, 1466, 1447, 1377, 1255, 1111, 1096, 974, 837, 721.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.87 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89 (m, 1H, CH), 1.08–1.84 (m, 31H, CH, 16CH<sub>2</sub>), 2.26 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.92 (m, 1H, CH<sub>2</sub>).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 14.18 (CH<sub>3</sub>), 22.68 (CH<sub>2</sub>), 26.13 (CH<sub>2</sub>), 26.54 (CH<sub>2</sub>), 27.10 (CH<sub>2</sub>), 27.80 (CH<sub>2</sub>), 29.36 (CH<sub>2</sub>), 29.66 (4CH<sub>2</sub>), 30.75 (CH<sub>2</sub>), 31.90 (CH<sub>2</sub>), 32.97 (CH<sub>2</sub>), 33.04 (CH<sub>2</sub>), 41.83 (CH), 41.95 (CH), 54.58 (CH<sub>2</sub>), 59.34 (CH<sub>2</sub>), 60.68 (CH<sub>2</sub>).

**(±)-2-Dodecyl-trans-decahydroisoquinoline (1f)**

Prepared from 1.67 g (12 mmol) (±)-trans-decahydroisoquinoline (**1a**) and 2.49 g (10 mmol) 1-bromododecane to give 227 g (74%) of **1f** as a pale brown oil. HR-MS: calcd. for  $C_{21}H_{41}N$ : 307.3239. Found: 307.3242. MS (CI):  $m/z$  (%) = 308 ( $M^+ + 1$ , 100), 152 (46). IR:  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2923, 2852, 1466, 1447, 1377, 1363, 1169, 1143, 1111, 1096, 975, 847.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.84 (m, 1H, CH), 0.88 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.95–1.40 (m, 24H), 1.50 (m, 5H, 4CH<sub>2</sub>), 1.61 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.27 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.77 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) = 14.09 (CH<sub>3</sub>), 22.66 (CH<sub>2</sub>), 26.07 (CH<sub>2</sub>), 26.47 (CH<sub>2</sub>), 27.03 (CH<sub>2</sub>), 27.76 (CH<sub>2</sub>), 29.33 (CH<sub>2</sub>), 29.57 (CH<sub>2</sub>), 29.60 (2CH<sub>2</sub>), 29.64 (CH<sub>2</sub>), 30.73 (CH<sub>2</sub>), 31.89 (CH<sub>2</sub>), 32.92 (CH<sub>2</sub>), 32.99 (CH<sub>2</sub>), 41.80 (CH), 41.94 (CH), 59.31 (CH<sub>2</sub>), 59.43 (CH<sub>2</sub>), 60.66 (CH<sub>2</sub>).

**(±)-2-Octadecyl-trans-decahydroisoquinoline (1g)**

Prepared from 1.67 g (12 mmol) (±)-trans-decahydroisoquinoline (**1a**) and 3.33 g (10 mmol) 1-bromooctadecane to give 3.32 g (85%) of **1g** as a pale brown oil. HR-MS: calcd. for  $C_{27}H_{53}N$ : 391.4178. Found: 391.4186. MS (CI):  $m/z$  (%) = 392 ( $M^+ + 1$ , 100), 152 (42). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2919, 2851, 1465, 1378, 1305, 1146, 1110, 975.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) = 0.88 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.88–1.56 (m, 41H, 23CH<sub>2</sub>, 2CH), 1.61 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.71 (m, 3H, 3CH<sub>2</sub>), 1.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) = 14.11 (CH<sub>3</sub>), 22.67 (CH<sub>2</sub>), 26.07 (CH<sub>2</sub>), 26.48 (CH<sub>2</sub>), 27.04 (CH<sub>2</sub>), 27.76 (CH<sub>2</sub>), 29.69 (CH<sub>2</sub>), 29.72 (CH<sub>2</sub>), 29.76 (CH<sub>2</sub>), 29.96 (9CH<sub>2</sub>), 30.74 (CH<sub>2</sub>), 31.91 (CH<sub>2</sub>), 32.93 (CH<sub>2</sub>), 33.00 (CH<sub>2</sub>), 41.82 (CH), 41.96 (CH), 54.57 (CH<sub>2</sub>), 59.34 (CH<sub>2</sub>), 60.68 (CH<sub>2</sub>).

**2-(3-Methyl-but-2-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (2b)**

Prepared from 1.596 g (12 mmol) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**2a**) and 1.49 g (10 mmol) 1-bromo-3-methylbut-2-ene to give 1.7 g (85%) of **2b**. HR-MS: calcd. for  $C_{14}H_{19}N$ : 201.1517. Found: 201.1516. MS (CI):  $m/z$  (%) = 202 ( $M^+ + 1$ , 70), 200 (100). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2923, 2855, 1453, 1376, 1085, 740.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.73 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.91 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.13 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.43 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, -CH=), 7.25 (m, 4H, 4 aromat. CH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 18.14 (CH<sub>3</sub>), 25.99 (CH<sub>3</sub>), 28.85 (CH<sub>2</sub>), 50.38 (CH<sub>2</sub>), 55.57 (CH<sub>2</sub>), 55.68 (CH<sub>2</sub>), 120.65 (-CH=), 125.59 (aromat. CH), 126.15 (aromat. CH), 126.61 (aromat. CH), 128.63 (aromat. CH), 134.11 (quat. C), 134.47 (quat. C), 135.87 (quat. C). The compound is also described in [16].

**2-Undecyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (2c)**

Prepared from 1.59 g (12 mmol) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**2a**) and 2.35 g (10 mmol) 1-bromoundecane to give 2.35 g (82%) of **2c**. HR-MS: calcd. for  $C_{20}H_{33}N$ : 287.2613. Found: 287.2632. MS (CI):  $m/z$  (%) = 288 ( $M^+ + 1$ , 100), 146 (96). MS (EI):  $m/z$  (%) = 287 ( $M^+$ , 4), 146 (100). IR (KBr):  $\nu$  [ $cm^{-1}$ ] = 2924, 2853, 1466, 1377, 1099, 937,

739. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 16H, 8CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, 3'-H), 2.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 1'-H), 2.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, 1-H), 7.02 (m, 1H, aromat. CH), 7.10 (m, 3H, 3 aromat. CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.14 (CH<sub>3</sub>), 22.70 (CH<sub>2</sub>), 27.26 (CH<sub>2</sub>), 27.64 (CH<sub>2</sub>), 29.12 (CH<sub>2</sub>), 29.36 (CH<sub>2</sub>), 29.59 (CH<sub>2</sub>), 29.62 (2CH<sub>2</sub>), 29.64 (CH<sub>2</sub>), 31.92 (CH<sub>2</sub>), 51.00 (CH<sub>2</sub>), 56.26 (CH<sub>2</sub>), 58.65 (CH<sub>2</sub>), 125.51 (aromat. CH), 126.02 (aromat. CH), 126.59 (aromat. CH), 128.62 (aromat. CH), 134.38 (quat. C), 134.93 (quat. C).

**2-((2E,6E)-3,7,11-Trimethyldodeca-2,6,10-trienyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (2d)**

Prepared from 560 mg (4.2 mmol) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (2a) and 1.0 g (3.5 mmol) (2E,6E)-1-bromo-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-triene to give 1.17 g (99%) of 2d. HR-MS: calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N: 337.2769. Found: 337.2765. MS (CI): *m/z* (%) = 338 (M<sup>+</sup>+1, 100), 146 (62). IR (KBr): ν [cm<sup>-1</sup>] = 2923, 2854, 1667, 1585, 1453, 1376, 1277, 1129, 1087, 1006, 935, 777, 740. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.07 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.73 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.91 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.09 (m, 1H, -CH=), 5.13 (m, 1H, -CH=), 5.36 (dt, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, -CH=), 7.01 (m, 1H, aromat. CH), 7.10 (m, 3H, 3 aromat. CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 16.0 (CH<sub>3</sub>), 16.52 (CH<sub>3</sub>), 17.69 (CH<sub>3</sub>), 25.71 (CH<sub>3</sub>), 26.33 (CH<sub>2</sub>), 26.71 (CH<sub>2</sub>), 29.15 (CH<sub>2</sub>), 39.71 (CH<sub>2</sub>), 39.76 (CH<sub>2</sub>), 50.59 (CH<sub>2</sub>), 55.80 (CH<sub>2</sub>), 55.05 (CH<sub>2</sub>), 120.99 (CH), 123.90 (CH), 124.30 (CH), 125.48 (CH), 126.02 (CH), 126.58 (CH), 128.62 (CH), 131.32 (quat. C), 134.29 (quat. C), 134.88 (quat. C), 135.20 (quat. C), 138.87 (quat. C).

**6,7-Dimethoxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3b)**

Prepared from 2.32 g (12 mmol) 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3a) and 1.49 g (10 mmol) 1-bromo-3-methylbut-2-ene to give 2.22 g (85%) of 3b as a pale brown oil. HR-MS: calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>: 261.1729. Found: 261.1720. MS (CI): *m/z* (%) = 262 (M<sup>+</sup>+1, 100), 206 (22). IR (KBr): ν [cm<sup>-1</sup>] = 2957, 2924, 2854, 1517, 1448, 1260, 1236, 1086, 1019, 798, 755. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.71 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.83 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.54 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, -CH=), 6.51 (s, 1H, aromat. CH), 6.58 (s, 1H, aromat. CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 18.13 (CH<sub>3</sub>), 25.99 (CH<sub>3</sub>), 28.77 (CH<sub>2</sub>), 50.76 (CH<sub>2</sub>), 55.63 (CH<sub>2</sub>), 55.83 (CH<sub>2</sub>), 55.85 (OCH<sub>3</sub>), 55.87 (OCH<sub>3</sub>), 109.40 (aromat. CH), 111.26 (aromat. CH), 121.24 (-CH=), 126.20 (quat. C), 126.75 (quat. C), 135.34 (quat. C), 147.08 (C-6), 147.41 (C-7).

**2-((E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3c)**

Prepared from 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3a) and 2.17 g (10 mmol) (E)-1-bromo-3,7-dimethylocta-2,6-diene to give 2.66 g (81%) of 3c. HR-MS: calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>2</sub>: 329.2355. Found: 329.2365. MS (CI): *m/z* (%) = 330 (M<sup>+</sup>+1, 100), 206 (44). IR (KBr): ν [cm<sup>-1</sup>] = 2923, 2854, 1612, 1518, 1463, 1453, 1257, 1229, 1127, 1018, 851. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.08 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.71 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.83 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.11 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, -CH=), 5.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, -CH=), 6.51 (s, 1H, aromat. CH), 6.59 (s, 1H, aromat. CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 16.48 (CH<sub>3</sub>), 17.73

(CH<sub>3</sub>), 25.76 (CH<sub>3</sub>), 26.36 (CH<sub>2</sub>), 28.73 (CH<sub>2</sub>), 39.78 (CH<sub>2</sub>), 50.67 (CH<sub>2</sub>), 55.67 (CH<sub>2</sub>), 55.71 (CH<sub>2</sub>), 55.84 (OCH<sub>3</sub>), 55.85 (OCH<sub>3</sub>), 109.34 (aromat. CH), 111.21 (aromat. CH), 120.99 (-CH=), 124.12 (-CH=), 126.12 (2 quat. C), 131.55 (2 quat. C), 147.05 (quat. C), 147.38 (quat. C).

**6,7-Dimethoxy-2-undecyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3d)**

Prepared from 2.3 g (12 mmol) 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3a) and 2.35 g (10 mmol) 1-bromoundecane to give 2.67 g (77%) of 3d. HR-MS: calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>2</sub>: 347.2824. Found: 347.2830. MS (CI): *m/z* (%) = 348 (M<sup>+</sup>+1, 100), 206 (34). IR (KBr): ν [cm<sup>-1</sup>] = 2924, 2853, 1612, 1518, 1465, 1256, 1228, 1136, 940. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 10H, 5CH<sub>2</sub>), 1.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.82 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.52 (s, 1H, aromat. CH), 6.58 (s, 1H, aromat. CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.12 (CH<sub>3</sub>), 22.68 (CH<sub>2</sub>), 27.62 (CH<sub>2</sub>), 29.33 (CH<sub>2</sub>), 29.56 (CH<sub>2</sub>), 29.59 (CH<sub>2</sub>), 29.63 (CH<sub>2</sub>), 31.88 (CH<sub>2</sub>), 31.90 (CH<sub>2</sub>), 32.83 (CH<sub>2</sub>), 34.11 (CH<sub>2</sub>), 51.05 (CH<sub>2</sub>), 55.80 (2OCH<sub>3</sub>), 55.86 (CH<sub>2</sub>), 58.53 (CH<sub>2</sub>), 111.22 (aromat. CH), 109.37 (aromat. CH), 126.20 (2 quat. C), 147.10 (quat. C), 147.40 (quat. C).

**Agar diffusion assay [21]**

The bacteria and fungi were cultivated on an AC agar (Sigma). The substances were placed on 6 mm paper discs on the agar each impregnated with 50 µg of the tested compound or 50 µg of the reference drug. The bacteria media were incubated for 24 h at 32 °C, the fungi media for 48 h at 28 °C and the diameter of the zone of inhibition [mm] was registered. Tests were performed in triplicate.

**Determination of MIC in a microdilution assay**

The determination was performed in triplicate following the DIN Norm DIN 58940-84:2002-10 [19]. The assay was performed on *C. glabrata*, *Y. lipolytica*, and *S. cerevisiae*, all purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany).

**Ergosterol biosynthesis assay**

This assay for the identification of the target enzyme in the post-oxidosqualene part of ergosterol biosynthesis is based on the GC-MS analysis of changes in the sterol pattern after incubation with a test substance (qualitative assay) at two different concentrations (MIC/2 and MIC/5).

A Varian 3800 gas chromatograph was coupled with a Varian Saturn 2200 ion trap. The autosampler was a CombiPal from CTC Analytics (Zwingen, Switzerland). Instrument control and data analysis were conducted with a Varian Workstation 6.9 SP 1. The injector (Varian 1177, Darmstadt, Germany) was held at 250 °C and operated in splitless mode (hold time 1 min). For separation an Agilent VF-5ms capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, 10 m EZ-Guard column; Böblingen, Germany) were used with helium (purity 99.999%) as carrier gas at a constant flow rate of 1.4 mL/min. The transfer line was held at 270 °C. The oven program started at 50 °C held for 1 min, and ramped to 260 °C with 50 °C/min, followed by a gradient of 4 °C/min to 310 °C held for 0.5 min. The MS was operated in full scan mode from 9 to 12 min at a mass range from 50 to 450 *m/z*

and from 12 to 18 min at a mass range from 100 to 650 *m/z*. The sterols were identified by comparison with authentic standard substances or by alignment with data from NIST<sup>TM</sup> 2005 mass spectral database.

The assay was performed on the fungal cell lines *C. glabrata*, *Y. lipolytica*, and *S. cerevisiae*. For details see [13].

The authors have declared no conflict of interest.

## References

- [1] G. Van Minnebruggen, I. E. J. A. Francois, B. P. A. Cammue, K. Thevissen, V. Vroome, M. Borgers, B. Shroot, *Open Mycol. J.* **2010**, 4, 22–32.
- [2] S. W. Chapman, D. C. Sullivan, J. D. Cleardy, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **2008**, 119, 197–216.
- [3] J. Bastert, M. Schaller, H. C. Korting, E. G. V. Evans, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, 17, 81–91.
- [4] R. S. Burden, D. T. Cooke, G. A. Carter, *Phytochemistry* **1989**, 28, 1791–1804.
- [5] H. Vanden Bossche, M. Engelen, F. Rochette, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2003**, 26, 5–29.
- [6] R. I. Baloch, E. I. Mercer, *Phytochemistry* **1987**, 26, 663–668.
- [7] A. Rahier, S. Pierre, G. Riveill, F. Karst, *Biochem. J.* **2008**, 414, 247–259.
- [8] J. Zhu, J. Lu, Y. Zhou, Y. Li, J. Cheng, C. Zheng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5285–5289.
- [9] B. Yao, H. Ji, Y. Cao, Y. Zhou, J. Zhu, J. Lü, Y. Li, J. Chen, C. Zheng, Y. Jiang, R. Liang, H. Tang, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 5293–5300.
- [10] A. de Savignac, C. Roques, M. Hinedi, G. Michel, A. Lattes, *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, 25, 449–454.
- [11] G. L. Patrick, O. S. Kinsman, *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, 31, 615–624.
- [12] D. Renard, J. Perruchon, M. Giera, J. Müller, F. Bracher, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 8123–8137.
- [13] C. Müller, V. Staudacher, J. Krauss, M. Giera, F. Bracher, *Steroids* **2013**, 78, 483–493.
- [14] S. Lange, M. Keller, C. Müller, S. Oliaro-Bosso, G. Balliano, F. Bracher, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 758–764.
- [15] J. Krauss, C. Gratzl, V. Sturm, C. Müller, V. Staudacher, C. Q. Schmidt, F. Bracher, *Sci. Pharm.* **2013**, 81, 641–650.
- [16] W. J. Irwin, D. L. Wheeler, N. J. Harper, *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 690–692.
- [17] H. J. Kumpaty, S. Bhattacharya, *Synthesis* **2005**, 2205–2209.
- [18] The commercial product was labelled as a *cis-trans* mixture, but the *trans* stereochemistry of **1a** was determined by comparison of the <sup>13</sup>C NMR shift data with those described by H. Booth, J. M. Bailey, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1979**, 510–513.
- [19] DIN 58940-84:2002-10, *Medical microbiology – Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents – Part 84: Microdilution; special requirements for testing of fungi against antifungal agents*, Beuth-Verlag, Berlin, **2009**.
- [20] I. Lee, N. O. Fishman, T. E. Zaoutis, K. H. Morales, M. G. Weiner, M. Synnestvedt, I. Nachamkin, E. Lautenbach, *Arch. Intern. Med.* **2009**, 169, 383–397.
- [21] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.

**1.3.2.2.3 Beitrag am Artikel**

Die Syntheseplanung und Durchführung unterlag Jürgen Krauss, Julia Kießling und Sabine Richter. Verena Staudacher und ich waren für die Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese-Testung der Substanzen verantwortlich. In dem Artikel sind nur die Ergebnisse aus dem Ergosterol-Biosynthese-Assay aufgeführt. Die gewonnenen Daten aus den biologischen Testsystemen wurden von Jürgen Krauss, Prof. Dr. Franz Bracher und mir interpretiert. Die Erstellung und Verbesserung des Manuskripts unterlag Prof. Dr. Franz Bracher und Jürgen Krauss. Die Grafik 2 und die Tabelle 2 in dem Manuskript stammen von mir.

### 1.3.2.3 Antimykotisch aktive Imidazolderivate

*Krauss J, Gratzl C, Sturm V, Müller C, Staudacher V, Schmidt CQ, Bracher F. Synthesis and biological evaluation of novel alkyl imidazolyl carbionols and their esters: potent antimycotics. Scientia Pharmaceutica 2013;81:641-50.*

#### 1.3.2.3.1 Zusammenfassung

In der Einleitung zur Entwicklung neuer Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren und in Kapitel 1.3.1 wurde schon auf die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antimykotika eingegangen, weswegen darauf in diesem Kapitel verzichtet wird.

Bisher war das Ziel bei der Entwicklung von neuen Sterol-Biosynthese-Inhibitoren fast immer die Imitierung von kationischen HEIs (vgl. Kapitel 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.5, 1.3.2.2), da diese eine höhere Affinität zum Enzym besitzen als das Substratsterol. Am besten eignen sich dazu aliphatische Aminogruppen oder heteroaromatische Ringsysteme, welche unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen. Zu dieser Gruppe von HEI-imitierenden Antimykotika gehören die Morpholine, welche die  $\Delta^{14}$ -Reduktase und die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase hemmen (vgl. Kapitel 1.3). Die C24-Methyltransferase kann ebenfalls durch Imitation des HEI gehemmt werden [42], jedoch befinden sich keine Antimykotika dieser Klasse im klinischen Einsatz.

Die C14-Demethylase und die C22-Desaturase sind CYP-abhängige Enzyme, daher können beide Enzyme durch Komplexierung ihres Hämeisens durch nicht protonierte Stickstoffe gehemmt werden. Bekannte Inhibitoren dieser Klasse sind die Azol-/Triazolantimykotika (vgl. Kapitel 1.3).

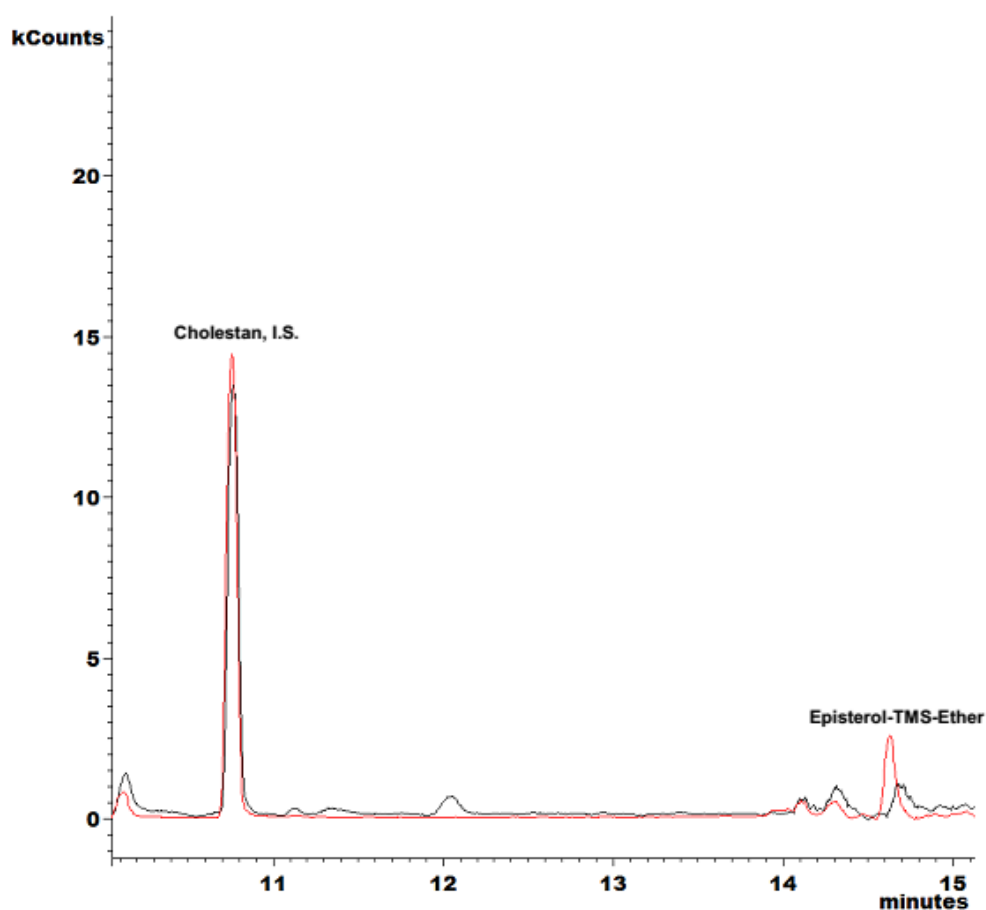
Die Substanzen in diesem Kapitel besitzen alle eine Imidazol-Struktur. Imidazole haben einen ungefähren  $pK_s$ -Wert von 7, daher sind sie bei einem physiologischen pH-Wert ca. zur Hälfte protoniert. In ihrer unprotonierten Form können sie CYP-Enzyme in der Ergosterol-Biosynthese (C14-Demethylase, C22-Desaturase) hemmen. In ihrer protonierten Form können sie aber auch kationische HEI imitieren und so andere Enzyme (z.B.  $\Delta^{14}$ -Reduktase,  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase, C24-Methyltransferase) in der Ergosterol-Biosynthese inhibieren. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen werden Hybride aus Azol-Antimykotika und N-Alkylheterocyclen hergestellt, in der Absicht Antimykotika mit dualen Wirkmechanismus zu erhalten.

Ausgangspunkt der Synthese war der käufliche 1-Methyl-1H-imidazol-5-carbaldehyd. Sieben Verbindungen konnten daraus in einer metallorganischen Reaktion unter Einsatz von verschiedenen Alkyl- und Arylalkylmagnesiumbromiden hergestellt werden. Die Synthese von zwei weiteren Verbindungen konnte durch anschließende Veresterung der erhaltenen Carbinole mit 4-Chlorbenzoylchlorid bewerkstelligt werden (vgl. Kapitel 1.3.2.3.2; Schema 1 im Artikel).

Die biologische Testung der Verbindungen im Ergosterol-Biosynthese-Assay lieferte ein überraschendes Ergebnis, da keines der gedachten Zielenzyme (C14-Demethylase, C22-Desaturase,

$\Delta^{14}$ -Reduktase,  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase, C24-Methyltransferase) gehemmt wurde. Im Agar-Diffusionstest zeigten die Verbindungen **2c**, **2d** und **2e** ähnliche Aktivität wie Clotrimazol. Die drei Verbindungen besitzen eine Alkylkettenlänge von C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub> und C<sub>12</sub>. Dass die Alkylkettenlänge einen wesentlichen Einfluss auf die antifungale Aktivität hat wurde bereits in Kapitel 1.3.2.2 beobachtet/erörtert. Die MHK-Werte lagen bei *C. glabrata* bei 25 µg/mL (**2c**), 10 µg/mL (**2d**) und bei 5 µg/mL (**2e**). Im Ergosterol-Biosynthese-Assay konnte nur eine schwache Inhibition der C5-Desaturase durch Verbindung **2c** festgestellt werden. Das akkumulierende Sterol war dabei Episterol (Ergosta-8,24(28)-dienol) (Abbildung 20).

Die C5-Desaturase ist mutmaßlich keine Hämeisen-abhängige Oxidase (vgl. Lathosteroloxidase = humane C5-Desaturase Kapitel 1.2) [53].



**Abbildung 20:** Chromatogramm (*selected ion*) von **2c** (rot) und Ethanol (Blindwert, schwarz) nach Inkubation mit *Candida glabrata*; Interner Standard Cholestan *m/z* 217 und Episterol-TMS-Ether *m/z* 343 (vgl. Kapitel 1.3.1.2 im Artikel Tabelle 1)

Bei den anderen beiden Verbindungen konnte keine Aktivität im Ergosterol-Biosynthese-Assay nachgewiesen werden, da kein verändertes Sterolmuster erkennbar war. Der Wirkmechanismus dieser Substanzen bleibt somit unklar.

Wieder erwies sich die Alkylkettenlänge als entscheidend für die antifungale Aktivität (vgl. Kapitel 1.3.2.2). Aufgrund der einfachen und kostengünstigen Synthese kann eine größere Substanzbibliothek leicht erstellt werden, um eventuell noch potentere Antimykotika herzustellen. Des Weiteren ist eine Steigerung der Hemmung der C5-Desaturase oder anderer CYP-Enzyme vorstellbar. Die Verbindung **2c** zeigte gegenüber allen anderen Enzym-Hemmungen in Kapitel 1 die schwächste Aktivität bzw. die geringste Akkumulation eines Sterols. Der Peak des akkumulierenden Episterols (rot) ist kaum größer als der des natürlich vorkommenden Episterols (schwarz) in *Candida glabrata* (Abbildung 20). Daher wurde auch davon abgesehen, das Kapitel „Inhibitor(en) der C5-Desaturase“ zu nennen.

Goldstein [53] konnte bereits Inhibitoren der fungalen C5-Desaturase herstellen. Dabei bediente er sich des Konzepts der Nachahmung des Substrates (vgl. Kapitel 1.2.4, humane  $\Delta^{24}$ -Reduktase-Inhibitoren). Er verwendete Inhibitoren mit Ergosta-8,22-dienol-Struktur und fügte „nur noch“ funktionelle Gruppen in Position C5 und C6 ein.

Research article

Open Access

## Synthesis and Biological Evaluation of Novel Alkyl-Imidazolyl Carbinols and their Esters: Potent Antimycotics

Jürgen KRAUSS, Carina GRATZL, Verena STURM, Christoph MÜLLER,  
Verena STAUDACHER, Christoph Q. SCHMIDT, Franz BRACHER \*

Department of Pharmacy – Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians University, Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich, Germany.

\* Corresponding author. E-mail: Franz.Bracher@cup.uni-muenchen.de (F. Bracher)

Sci Pharm. 2013; 81: 641–650

doi:10.3797/scipharm.1304-17

Published: September 2<sup>nd</sup> 2013

Received: April 17<sup>th</sup> 2013

Accepted: August 21<sup>st</sup> 2013

This article is available from: <http://dx.doi.org/10.3797/scipharm.1304-17>

© Krauss *et al.*; licensee Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft m. b. H., Vienna, Austria.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

A novel series of imidazol-5-yl carbinols and their 4-chlorobenzoyl esters has been synthesized by the Grignard reaction and subsequent esterification. These compounds were screened for their antimicrobial activities in an agar diffusion assay. The compounds with C<sub>10</sub> to C<sub>12</sub>-alkyl side chains displayed significant antimycotic activity.

### Keywords

Grignard reaction • Ergosterol biosynthesis • Sterol biosynthesis inhibitors • Antimycotics

### Introduction

Ergosterol biosynthesis is an important target for the development of novel antimycotic drugs [1–8]. Three classes of antimycotics, the azoles (*e.g.* fluconazole, clotrimazole, and miconazole), the allylamines (*e.g.* naftifine, terbinafine), and the morpholines (amorolfine) are used in the treatment of human mycoses caused by various species of fungi (Fig. 1). Diverse derivatives of these drug classes are also used in agrochemistry for crop protection or in technical chemistry (*e.g.* as additives in colourings).

These drugs target enzymes in fungal ergosterol biosynthesis. While azoles target C-14 demethylase [7], allylamines inhibit the enzyme squalene epoxidase, and the morpholines inhibit both  $\Delta 8,7$ -isomerase and  $\Delta 14$ -reductase.



Increasing fungal resistance against these antimycotics [2] and their often observed unfavourable pharmacokinetics call for the development of new antimycotics with new targets and better biopharmaceutical properties.

It is well-established that a number of enzymatic transformations in the post-squalene part of ergosterol biosynthesis go through carbocationic intermediates (high-energy intermediates, HEI), e.g. those catalyzed by the enzymes sterol  $\Delta 8,7$ -isomerase, C24-methyltransferase,  $\Delta 24,28$ -reductase, and  $\Delta 14$ -reductase [5]. Inhibition of these enzymes can be achieved effectively by imitation of the respective HEI, since mimics of HEI have a higher affinity for the active site than the substrate sterols have [4]. Synthetic drugs which imitate HEI have to be cationic in the cellular environment, which is most conveniently achieved by the presence of an aliphatic amino group or heteroaromatic ring (which are protonated to a significant extent at physiological pH). The allylamines and the morpholine antifungal amorolfine are the most prominent representatives of this type (Fig. 1). In the class of morpholines and related *N*-alkyl piperidines, the length of the aliphatic or arylaliphatic *N*-substituent significantly determines the potency and selectivity ( $\Delta 8,7$ -isomerase versus  $\Delta 14$ -reductase inhibition) of the compounds [9]. On the other hand, the azole-type antifungals (imidazoles like clotrimazole and miconazole, triazoles like fluconazole, as well as numerous related azoles used in agrochemistry [10]) are inhibitors of the enzyme sterol C14 demethylase. This enzyme, a member of the CYP family, catalyzes the oxidative demethylation of lanosterol, and inhibition is based on the complexation of its heme iron by one of the nitrogen atoms of the unprotonated azole ring. Most of the commercial azole antifungals contain a 1-(2-hydroxyethyl)azole subunit (see fluconazole, Fig. 1), but etherification (miconazole) and esterification [11] of the hydroxyl group is tolerated well. The azoles further inhibit another CYP-enzyme in ergosterol biosynthesis, namely  $\Delta 22$ -desaturase [12]. This enzyme, catalyzing the introduction of an olefinic double bond in the sterol side chain, has been poorly characterized until now, and its selective inhibitors are not yet known. Previously synthesized sterol derivatives containing imidazole groups in the side chain have not inhibited this enzyme, but the sterol C24-methyltransferase has, due to an imitation of a cationic HEI by the protonated imidazole [13].

In the investigations described here, we intended to prepare hybrids of the abovementioned types of established antifungals, aimed at the development of new inhibitors of ergosterol biosynthesis, probably with dual action.

As the central functionality, we selected the imidazole ring ( $pK_a$  value about 7), which should exist in protonated and unprotonated forms in about equal amounts in cells. In its neutral form it can inhibit the relevant CYP enzymes, whereas the protonated form might imitate carbocationic HEI in sterol biosynthesis [13]. In contrast to established azole antifungals [10], in which the hydroxyalkyl residue is attached to N-1, our target compounds contain side chains (derived from the alkyl chains of morpholine antifungals [9]) at C-5 of the imidazole ring.

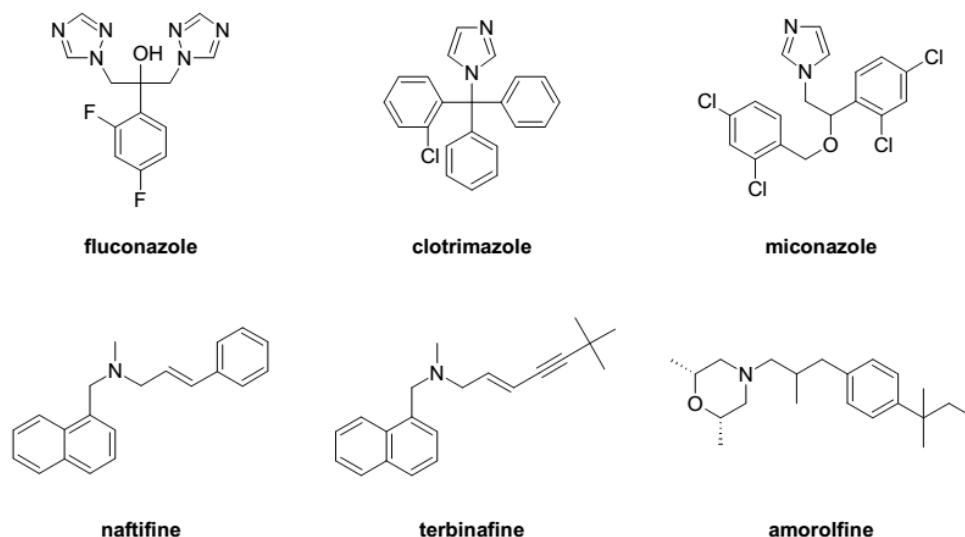


Fig. 1. Antimycotic drugs

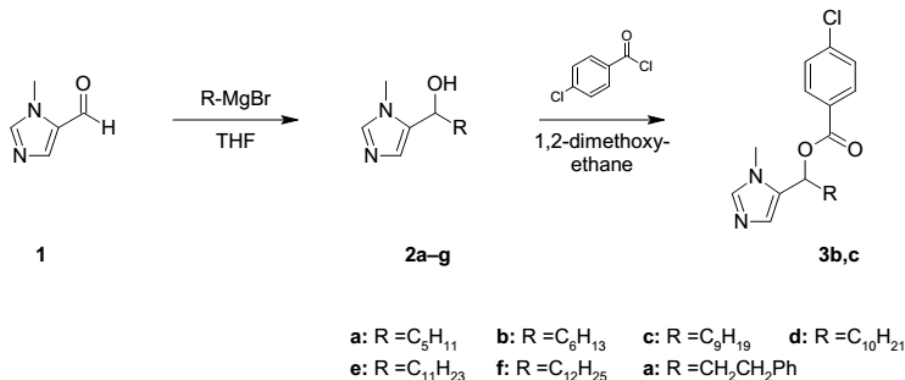
## Results and Discussion

### Chemistry

In order to achieve a hydroxyalkylimidazole structural element, we selected a Grignard reaction as the crucial step. Commercially available 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde (**1**) was reacted with a series of alkyl and arylalkyl magnesium bromides to give the racemic carbinols **2a–g** in moderate-to-good yields. In order to investigate the hitherto only poorly investigated influence of esterification of antifungal hydroxyalkyl-imidazoles [11] and to introduce a chlorophenyl ring (cf. clotrimazole, Fig. 1) into the molecule, selected carbinols (**2b** and **2c**) were esterified with 4-chlorobenzoyl chloride [14] to give the esters **3b** and **3c**. We also intended to achieve etherification of **2a–g** with 2,4-dichlorobenzyl chloride (cf. miconazole, Fig. 1) by the use of a standard protocol with the bases sodium hydride or sodium ethoxide, but unfortunately did not observe any conversion.

### Biological Activity

The antifungal and antibacterial activities of the resulting compounds were determined in an agar diffusion assay against four strains of bacteria (Gram-negative and Gram-positive) and four strains of fungi (two yeasts, mould, dermatophyte) [15]. Except for **2c**, the compounds showed no or only weak activities against the bacteria, when compared to tetracycline, but especially compounds **2c**, **2d**, and **2e**, which contain C<sub>10</sub> to C<sub>12</sub>-alkyl chains, show remarkable activity against fungi when compared to clotrimazole. The corresponding esters **3b/3c** did not show significant antimicrobial activities. The MIC (minimum inhibitory concentration) against the opportunistic pathogen *Candida glabrata*, which is often associated with resistance to fluconazole therapy [16, 17], was determined to be 25 µg/mL (**2c**), 10 µg/mL (**2d**), and 5 µg/mL (**2e**) (clotrimazole: 2.5 µg/mL) [11].



**Sch. 1.** Synthetic preparation of the title compounds

To determinate the mechanism of action, the carbinols **2c**, **2d**, and **2e** were evaluated in an ergosterol biosynthesis assay [18]. Only **2c** showed a moderate accumulation of episterol (ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol) in this assay. This indicates that **2c** is a moderate inhibitor of C5 desaturase, a hitherto poorly characterized, putatively non-heme iron-containing oxidase [19]. But since the even more potent analogues **2d** and **2e** do not show signs of accumulation of episterol, the high antimycotic activity of the imidazolyl carbinols must be due to another mechanism of action.

**Tab. 1.** Agar diffusion assay (Te: tetracycline, Cl: clotrimazole, 50  $\mu$ g/disc, inhibition diameter in [mm], 0: no inhibition)

	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>	<b>2d</b>	<b>2e</b>	<b>2f</b>	<b>2g</b>	<b>3b</b>	<b>3c</b>	<b>Te</b>	<b>Cl</b>
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>30</b>	<b>0</b>
<i>Pseudomonas marginalis</i>	9	0	<b>15</b>	0	0	0	0	0	7	<b>28</b>	<b>15</b>
<i>Staphylococcus equorum</i>	15	0	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	10	0	7	0	<b>37</b>	<b>20</b>
<i>Streptococcus entericus</i>	0	0	7	<b>10</b>	8	7	0	7	0	<b>20</b>	<b>8</b>
<i>Candida glabrata</i>	0	0	<b>10</b>	<b>15</b>	9	7	0	<b>10</b>	6	0	<b>19</b>
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	7	<b>11</b>	0	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>15</b>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	0	<b>13</b>	<b>11</b>	0	0	0	0	0	0	<b>22</b>
<i>Hyphopichia burtonii</i>	0	0	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	6	0	<b>12</b>	7	0	<b>23</b>

**Conclusion**

The novel alkyl imidazolyl carbinols **2c**, **2d**, and **2e** produced in this study show interesting antifungal activities. The investigation of a series of homologs indicated that the length of the alkyl chain is of critical importance, with an optimum length of C<sub>10</sub> to C<sub>12</sub>. This parallels findings on *N*-alkylimidazoles, where the same chain length was found to lead to the highest antibacterial and antifungal activity [20], and also on antifungal *N*-alkylmorpholines and -piperidines [9].

Although the main mechanism of action does not seem to be an inhibition of the ergosterol biosynthesis pathway (as initially intended), the pronounced antifungal activity of the compounds **2c**, **2d**, and **2e** warrants them to be the starting point for the development of new antimycotics. The rather simple chemical structures of the novel compounds presented here is particularly interesting as they enable a quick, economical, and effortless synthesis approach to further analogues.

## Experimental

### General

Elemental analyses: Heraeus CHN–Rapid; IR-spectra: Perkin-Elmer FT-IR Paragon 1000; MS: Hewlett Packard MS-Engine; electron ionisation (EI) 70 eV, chemical ionisation (CI) with CH<sub>4</sub> (300 eV); NMR: Jeol GSX 400 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz); melting points: Büchi Melting Point B-540 (not corrected); flash column chromatography (FCC): silica gel 60 (230–400 mesh, E. Merck, Darmstadt); GLC-MS: Shimadzu GC-17 A (carrier: He, oven temperature program: 100–280 °C, 10 °C / min, capillary column: Varian VF-5ms 30 m × 0.25, split injector T = 250 °C, detector T = 260 °C).

### General Procedure 1 (Grignard Reaction)

550 mg (5.0 mmol) of 1-methyl-1*H*-imidazole-5-carbaldehyde (**1**) were dissolved in 20 mL dry THF and 7.5 mmol of the Grignard reagent (solution in 50 mL anhydrous THF, freshly prepared from 7.5 mmol of the corresponding alkyl or arylalkyl bromide, two crystals of iodine and 230 mg (10 mmol) magnesium) were added dropwise. The mixture was stirred for 12 h at room temperature, then quenched with 30 mL of aqueous ammonia buffer pH 9.25, and extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (*n*-hexane/ethyl acetate/dimethyl ethylamine 1:1:0.005).

### General Procedure 2 (Esterification)

About 1.0 mmol of carbinol **2b/2c** was dissolved in 25 mL 1,2-dimethoxyethane and 4-chlorobenzoyl chloride (see amounts below) and 3 mL triethylamine (or pyridine) were added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then the solvent was evaporated, the residue dissolved in 25 mL 10% aqueous NaOH solution, and extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (*n*-hexane/ethyl acetate 1:1).

### 1-(1-Methyl-1*H*-imidazol-5-yl)hexan-1-ol (**2a**)

The compound was prepared according “General Procedure 1” from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1*H*-imidazole-5-carbaldehyde (**1**) and the Grignard reagent prepared from 1.13 g (7.5 mmol) 1-bromopentane to give 850 mg (93%) of **2a** as a white solid. M.p. 65 °C. <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-acetone): δ 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (m, 6 H, 3 CH<sub>2</sub>), 1.83 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 4.62 (t, *J* = 6.7 Hz, 1 H, CH), 6.75 (s, 1 H, aromat. CH), 7.36 (s, 1 H, aromat. CH). <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-acetone): δ 14.3 (CH<sub>3</sub>), 23.3 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>3</sub>), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 65.1 (CH), 126.6 (aromat. CH), 135.6 (quart. C), 139.2 (aromat. CH). MS (CI) (*m/z*, %): 183 (M<sup>+</sup>+1, 90), 165 (100). MS (EI) (*m/z*, %): 182 (M<sup>+</sup>, 10), 111

(100). HR-MS Calcd. for  $C_{10}H_{18}N_2O$ : 182.1419. Found: 182.1428. IR (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3262, 2951, 2854, 1508, 1416, 1237, 1072, 914.

**1-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)heptan-1-ol (2b)**

The compound was prepared according "General Procedure 1" from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde (**1**) and the Grignard reagent prepared from 1.24 g (7.5 mmol) 1-bromohexane to give 820 mg (84%) of **2a** as a pale brown solid. M.p. 92 °C.  $^1\text{H-NMR}$  ( $d_4$ -methanol):  $\delta$  0.90 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.32 (m, 8 H, 4  $\text{CH}_2$ ), 1.86 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.72 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.64 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1 H, CH), 6.86 (s, 1 H, aromat. CH), 7.55 (s, 1 H, aromat. CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $d_4$ -methanol):  $\delta$  14.4 ( $\text{CH}_3$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 27.1 ( $\text{CH}_2$ ), 30.2 ( $\text{CH}_2$ ), 32.2 ( $\text{CH}_3$ ), 33.0 ( $\text{CH}_2$ ), 36.8 ( $\text{CH}_2$ ), 65.5 (CH), 126.3 (aromat. CH), 136.1 (quart. C), 139.8 (aromat. CH). MS (CI) ( $m/z$ , %): 197 ( $M^+ + 1$ , 100), 111 (21). HR-MS Calcd.: 196.1576. Found: 196.1580. IR (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3107, 2952, 1508, 1467, 1413, 1233, 1113, 1072, 1006, 930, 853, 825, 799, 701, 663.

**1-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)decan-1-ol (2c)**

The compound was prepared according "General Procedure 1" from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde and the Grignard reagent prepared from 1.55 g (7.5 mmol) 1-bromononane to give 0.840 g (71%) of **2c** as a white solid.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.27 (m, 14 H, 7  $\text{CH}_2$ ), 1.86 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.69 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.61 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1 H, CH), 6.80 (s, 1 H, aromat. CH), 7.30 (s, 1 H, aromat. CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{CH}_3$ ), 32.1 ( $\text{CH}_2$ ), 35.9 ( $\text{CH}_2$ ), 65.1 (CH), 126.3 (aromat. CH), 134.5 (quart. C), 138.7 (aromat. CH). MS (CI) ( $m/z$ , %): 239 ( $M^+ + 1$ , 100), 111 (21). HR-MS Calcd. for  $C_{14}H_{26}N_2O$ : 238.2045. Found: 238.2045. IR (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3265, 2921, 2852, 1512, 1473, 1083, 920, 668.

**1-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)undecan-1-ol (2d)**

The compound was prepared according "General Procedure 1" from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde and the Grignard reagent prepared from 1.66 g (7.5 mmol) 1-bromodecane to give 658 mg (52%) of **2d** as a white solid. M.p. 97 °C.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.27 (m, 16 H, 8  $\text{CH}_2$ ), 1.89 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.70 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.63 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1 H, CH), 6.90 (s, 1 H, aromat. CH), 7.37 (s, 1 H, aromat. CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $d_4$ -methanol):  $\delta$  14.1 ( $\text{CH}_3$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$ ), 26.1 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 (2  $\text{CH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_3$ ), 35.7 ( $\text{CH}_2$ ), 65.4 (CH), 126.5 (aromat. CH), 134.1 (quart. C), 138.9 (aromat. CH). MS (EI) ( $m/z$ , %): 252 ( $M^+$ , 17), 111 (100). HR-MS Calcd. for  $C_{15}H_{28}N_2O$ : 252.2202. Found: 252.2199. IR (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3103, 2917, 2851, 1509, 1467, 1112, 1083, 823, 661.

**1-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)dodecan-1-ol (2e)**

The compound was prepared according "General Procedure 1" from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde and the Grignard reagent prepared from 1.76 g (7.5 mmol) 1-bromoundecane to give 927 mg (70%) of **2e** as a white solid. M.p. 98 °C.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.35 (m, 18 H, 9  $\text{CH}_2$ ), 1.89 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.70 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.63 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1 H, CH), 6.87 (s, 1 H, aromat. CH), 7.36 (s, 1 H, aromat. CH).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.1 ( $\text{CH}_3$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$ ), 26.1 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 (3  $\text{CH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_3$ ), 35.7 ( $\text{CH}_2$ ), 65.2 (CH), 126.4

(aromat. CH), 134.1 (quart. C), 138.8 (aromat. CH). MS (EI) ( $m/z$ , %): 248 ( $M^+$  -18, 20), 219 (10), 135 (15), 121 (100), 108 (30). HR-MS Calcd. for  $C_{16}H_{30}N_2O$ : 266.2358. Found: 266.2347. IR (KBr),  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3269, 2918, 2851, 1513, 1472, 1236, 1111, 1089, 1068, 904, 668.

**1-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)tridecan-1-ol (2f)**

The compound was prepared according "General Procedure 1" from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde and the Grignard reagent prepared from 1.87 g (7.5 mmol) 1-bromododecane to give 895 mg (64%) of **2f** as a white solid. M.p. 86 °C.  $^1H$ -NMR ( $d_4$ -methanol):  $\delta$  0.90 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3 H,  $CH_3$ ), 1.32 (m, 16 H, 8  $CH_2$ ), 1.86 (m, 2 H,  $CH_2$ ), 3.72 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 4.64 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1 H, CH), 6.86 (s, 1 H, aromat. CH), 7.55 (s, 1 H, aromat. CH).  $^{13}C$ -NMR ( $d_4$ -methanol):  $\delta$  14.4 ( $CH_3$ ), 23.8 ( $CH_2$ ), 27.2 ( $CH_2$ ), 30.5 ( $CH_2$ ), 30.6 ( $CH_2$ ), 30.7 (2  $CH_2$ ), 30.8 (3  $CH_2$ ), 32.2 (CH), 33.1 ( $CH_2$ ), 36.8 ( $CH_2$ ), 65.5 (CH), 126.3 (aromat. CH), 136.1 (quart. C), 139.8 (aromat. CH). MS (CI) ( $m/z$ , %): 281 ( $M^+$ +1, 100), 263 (26). HR-MS Calcd. for  $C_{17}H_{32}N_2O$ : 280.2515. Found: 280.2516. IR (KBr),  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3103, 2921, 2850, 1510, 1470, 1270, 1111, 1070, 941, 823, 717, 664.

**1-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)-3-phenyl-propan-1-ol (2g)**

The compound was prepared according "General Procedure 1" from 550 mg (5 mmol) 1-methyl-1H-imidazole-5-carbaldehyde and the Grignard reagent prepared from 1.39 g (7.5 mmol) 1-bromo-2-phenylethane to give 455 mg (42%) of **2g** as a viscous oil.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  2.21 (m, 2 H,  $CH_2$ ), 2.75 (m, 1 H,  $CH_2$ ), 2.86 (m, 1 H,  $CH_2$ ), 4.62 (dd,  $J$  = 5.8 Hz,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H, CH), 6.90 (s, 1 H, aromat. CH), 7.20 (m, 3 H, 3 aromat. CH), 7.28 (m, 2 H, 2 aromat. CH), 7.44 (s, 1 H, aromat. CH).  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  32.1 ( $CH_3$ ), 32.2 ( $CH_2$ ), 37.2 ( $CH_2$ ), 64.1 (CH), 125.4 (aromat. CH), 126.1 (aromat. CH), 128.5 (2 aromat. CH), 128.5 (2 aromat. CH), 134.2 (quart. C), 138.5 (aromat. CH), 141.2 (quart. C). MS (EI) ( $m/z$ , %): 216 ( $M^+$ , 10), 111 (100), 83 (35). MS (CI) ( $m/z$ , %): 217 ( $M^+$ +1, 100), 199 (23). HR-MS Calcd. for  $C_{13}H_{16}N_2O$ : 216.1263. Found: 216.1262.

**4-Chlorobenzoic acid 1-(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)heptyl ester (3b)**

The compound was prepared according "General Procedure 2" from 232 mg (1.18 mmol) **2b** and 964 mg (5.5 mmol) 4-chlorobenzoyl chloride to give 113 mg (29%) of **3b** as a pale yellow oil.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  0.87 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3 H,  $CH_3$ ), 1.31 (m, 8 H, 4  $CH_2$ ), 1.90 (m, 2 H,  $CH_2$ ), 6.10 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.14 (s, 1 H, aromat. CH), 7.41 (s, 1 H, aromat. CH), 7.41 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2 H, 2 aromat. CH), 7.95 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2 H, 2 aromat. CH).  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  14.0 ( $CH_3$ ), 22.5 ( $CH_2$ ), 25.7 ( $CH_2$ ), 28.9 ( $CH_2$ ), 31.6 ( $CH_2$ ), 32.0 ( $CH_3$ ), 33.8 ( $CH_2$ ), 67.3 (CH), 128.3 (quart. C), 128.8 (aromat. CH), 128.9 (2 aromat. CH), 130.6 (quart. C), 131.1 (2 aromat. CH), 138.9 (aromat. CH), 139.7 (quart. C), 165.2 (CO). MS (EI) ( $m/z$ , %): 335 ( $M^+$ +1, 28), 239 (31), 179 (100). HR-MS Calcd. for  $C_{18}H_{23}ClN_2O_2$ : 334.1448. Found: 334.1450. IR (KBr),  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 2954, 2928, 2857, 1716, 1593, 1502, 1487, 1466, 1401, 1334, 1268, 1098, 1014, 760.

**4-Chlorobenzoic acid 1-(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)decyl ester (3c)**

The compound was prepared according "General Procedure 2" from 235 mg (0.99 mmol) **2c** and 310 mg (1.8 mmol) 4-chlorobenzoyl chloride to give 90 mg (24%) of **3c** as a almost colourless oil.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  0.84 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3 H,  $CH_3$ ), 1.21 (m, 14 H, 7  $CH_2$ ), 2.06 (m, 2 H,  $CH_2$ ), 3.65 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 6.07 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, CH), 7.12 (s, 1 H, aromat.

CH), 7.38 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H, 2 aromat. CH), 7.39 (s, 1 H, aromat. CH), 7.92 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H, 2 aromat. CH).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 22.5 ( $\text{CH}_2$ ), 25.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 (2  $\text{CH}_2$ ), 29.3 (2  $\text{CH}_2$ ), 31.7 ( $\text{CH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_3$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ ), 67.2 (CH), 128.2 (quart. C), 128.7 (2 aromat. CH), 128.8 (aromat. CH), 130.5 (quart. C), 130.9 (2 aromat. CH), 138.8 (quart. C), 139.6 (aromat. CH), 165.0 (CO). MS (EI) ( $m/z$ , %): 377 ( $\text{M}^+ + 1$ , 70), 221 (100). HR-MS Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_2$ : 376.1918. Found: 376.1917. IR (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 2926, 2854, 1716, 1594, 1496, 1458, 1398, 1275, 1171, 1095, 1017, 920, 852, 830, 767.

#### Agar Diffusion Assay (DIN Method)

The bacteria and fungi were cultivated on AC agar (Sigma). The substances were placed on 6 mm paper discs on the agar, each impregnated with 50  $\mu\text{g}$  of the tested compound or 50  $\mu\text{g}$  of the reference drugs. The bacteria media were incubated for 24 h at 32 °C; the fungi media for 48 h at 28 °C, and the diameter of the zone of inhibition [mm] was then registered [15].

#### Determination of MIC (DIN Method)

99  $\mu\text{L}$  of a suspension of *Candida glabrata* ( $1 \times 10^3$  CFU/ml) in All Culture media (AC Agar, Aldrich) were incubated with 1  $\mu\text{L}$  ethanolic test solution for 36 h at 28 °C in a 96 well plate. After 36 h, the turbidity was measured at 590 nm and compared to the cell suspensions without the substance and AC agar media [15].

#### Acknowledgement

The authors wish to thank Martina Stadler for her technical support with the bacterial cultures.

#### Authors' Statement

##### Competing Interests

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- [1] Benveniste P. Sterol biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol.* 1986; 37: 275–308. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.37.060186.001423>
- [2] Bastert J, Schaller M, Korting HC, Evans EGV. Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int J Antimicrob Agents.* 2001; 17: 81–91. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00323-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00323-X)
- [3] Taton M, Benveniste P, Rahier A. Use of rationally designed inhibitors to study sterol and triterpenoid biosynthesis. *Pure Appl Chem* 1987; 59: 287–294. <http://dx.doi.org/10.1351/pac198759030287>

- [4] Song Z, Nes WD. Sterol biosynthesis inhibitors: Potential for transition state analogs and mechanism-based inactivators targeted at sterol methyltransferase. *Lipids*. 2007; 42: 15–33. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-006-3017-1>
- [5] Burden RS, Cooke DT, Carter GA. Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi. *Phytochemistry*. 1989; 28: 1791–1804. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97862-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97862-2)
- [6] Renard D, Perruchon J, Giera M, Müller J, Bracher F. Side chain azasteroids and thiasteroids as sterol methyltransferase inhibitors in ergosterol biosynthesis. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17: 8123–8137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.09.037>
- [7] Van den Bossche H, Willemsens G, Cools W, Lauwers WFJ, Le Jeune L. Biochemical effects of miconazole on fungi. II. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Chem Biol Interact*. 1978; 21: 59–78. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797\(78\)90068-6](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797(78)90068-6)
- [8] Dolle RE, Allaudeen H S, Kruse LI. Design and synthesis of 14- $\alpha$ -methyl-15-aza-homosterols as novel antimycotics. *J Med Chem*. 1990; 33: 817–880. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00164a065>
- [9] Baloch RI, Mercer EI, Wiggins TE, Baldwin BC. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* by tridemorph, fenpropimorph and fenpropidin. *Phytochemistry*. 1984; 23: 2219–2226. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80523-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80523-3)
- [10] Zirngibl L. Antifungal azoles. Weinheim: Wiley-VCH, 1994.
- [11] Wahbi Y, Tournaire C, Cajouille R, Payard M, Linas MD, Seguela JP. Aliphatic ethers and esters of 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazolyl)ethanol: study of antifungal activity against yeasts and hydrophobic character. *Eur J Med Chem*. 1994; 29: 701–706. [http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234\(94\)90032-9](http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234(94)90032-9)
- [12] Kelly SL, Lamb DC, Baldwin BC, Corran AJ, Kelly DE. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J Biol Chem*. 1997; 272: 9986–9988. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.15.9986>
- [13] Ator MA, Schmidt SJ, Adams JL, Dolle RE, Kruse LI, Frey CL, Barone JM. Synthesis, specificity, and antifungal activity of inhibitors of the *Candida albicans*  $\Delta^{24}$ -sterol methyltransferase. *J Med Chem*. 1992; 35: 100–106. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00079a012>
- [14] Krauss J, Unterreitmeier D. Synthesis of new lipophilic ipomeanol analogues and their cytotoxic activities. *Arch Pharm Pharm Med Chem*. 2005; 338: 44–48. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.200400916>



- [15] DIN Deutsches Institut für Normung e.V.  
Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika.  
DIN 58940, Teil 3 - Beiblatt 1 und Teil 4 - Beiblatt 1, Beuth Verlag, Berlin 1998.
- [16] Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II.  
The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer.  
*Am J Med.* 2002; 112: 380–385.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)01130-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(01)01130-5)
- [17] Lee I, Fishman NO, Zaoutis TE, Morales KH, Weiner MG, Synnestvedt M, Nachamkin I, Lautenbach E.  
Risk factors for fluconazole-resistant *Candida glabrata* bloodstream infections.  
*Arch Intern Med.* 2009; 169: 379–383.  
<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.169.4.379>
- [18] Müller C, Staudacher V, Krauss J, Giera M, Bracher F.  
A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total cholesterol biosynthesis.  
*Steroids.* 2013; 78: 483–493.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.006>
- [19] Goldstein AS.  
Synthesis and bioevaluation of  $\Delta^7$ -5-desaturase inhibitors, an enzyme late in the biosynthesis of fungal sterol ergosterol.  
*J Med Chem.* 1996; 39: 5092–5099.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jm9605851>
- [20] de Savignac A, Roques C, Hinedi M, Michel G, Lattes A.  
Synthèse et propriétés antibactériennes et antifongiques d'une série de 1-alkylimidazoles.  
*Eur J Med Chem.* 1990; 25: 449–454.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234\(90\)90009-R](http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234(90)90009-R)

**1.3.2.3.3 Beitrag am Artikel**

Die Syntheseplanung und Durchführung unterlag Jürgen Krauss, Carina Gratzl und Verena Sturm. Verena Staudacher und ich waren für die Ergosterol-Biosynthese-Testung der Substanzen verantwortlich. Die gewonnenen Daten aus den biologischen Testsystemen wurden von Jürgen Krauss und Prof. Dr. Franz Bracher interpretiert. Die Erstellung und Verbesserung des Manuskripts unterlag Prof. Dr. Franz Bracher, Jürgen Krauss und Christoph Schmidt.

### 1.3.3 Einfluss von unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf das Sterolmuster von *Aspergillus* spp.

Binder U, Maurer E, **Müller C**, Bracher F, Lass-Flörl C. Influence of hypoxia on antifungal susceptibility, sterol pattern and biomarker release of *Aspergillus* spp. Fungal Genetics Conference in Asilomar, März 2013.

#### 1.3.3.1 Zusammenfassung

Die nachfolgenden Forschungsergebnisse sind in Zusammenarbeit mit der Sektion für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Innsbruck entstanden.

Die Schlauchpilz-Gattung *Aspergillus*, v.a. *Aspergillus fumigatus*, aber auch *Aspergillus flavus* und *Aspergillus terreus*, sind verantwortlich für die invasive Aspergillose. Dabei wächst der Pilz bevorzugt im Lungengewebe und breitet sich bei Nicht-Behandlung auf andere Organe wie Nieren, Herz und Gehirn aus. Die Sterblichkeitsrate der meist immunsupprimierten Patienten liegt bei bis zu 90%. Um die Aspergillose bestmöglich behandeln zu können, müssen die eingesetzten Therapeutika schnell und gut wirken. Für die Identifizierung zur Therapie geeigneter Antimykotika werden *in vitro* Tests (v.a. MHK-Test) durchgeführt. Diese berücksichtigen meist nur den jeweiligen Pilzstamm, jedoch nicht die vorliegenden Wachstumsbedingungen. Daher ist es wenig überraschend, dass es oft eine starke Abweichung zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen gibt. Im Fokus der nachfolgenden Untersuchung stand die Nachahmung der Sauerstoffbedingungen in der Lunge. Durch die Anpassung des Testsystems auf die vorliegenden Wachstumsbedingungen des Pilzes in der Lunge (Hypoxie = 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 94% N<sub>2</sub>) konnte im Folgenden der Stoffwechsel des Pilzes genauer untersucht werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Aufklärung der unterschiedlichen Sensitivität von Pilzen gegenüber Antimykotika unter Normoxie (= 21% O<sub>2</sub>, 1% CO<sub>2</sub> und 78% N<sub>2</sub>) gegenüber Hypoxie.

Im ersten Schritt wurden MHK-Werte von Amphotericin B sowie von verschiedenen Azol-Antimykotika bestimmt (auch von Echinocandinen; vgl. Kapitel 1.3). Alle Testsubstanzen zeigten niedrigere MHK-Werte (engl. MIC) unter Hypoxie. Daraus resultierten niedrigere epidemiologische „cut-offs“ (ECOFFs), welche zwei Verdünnungsstufen oberhalb der MHK-Werte liegen und eine Population in „resistent“ und „empfindlich“ gegenüber einem Antimykotikum bei einer fixen Konzentration trennen. Außerdem zeigte sich eine Erhöhung der MHK-Werte in Abhängigkeit von verschiedenen Mediumzusätzen (10% oder 25% Vollblut bzw. Zusatz von Ergosterol).

In Versuchen wurden die Pilze mit Azol-Antimykotika behandelt unter gleichzeitiger Gabe von Ergosterol. Es kam dabei zu einem Anstieg des MHK-Wertes im Vergleich zu Proben ohne Ergosterol-Zufütterung (vgl. Kapitel 1.3.3.2; Abbildung 3 im nachfolgenden Poster). Durch diese Beobachtung wurde der Schwerpunkt auf die Ergosterol-Biosynthese gerichtet. Dabei wurden sowohl

die quantitative als auch die qualitative Veränderung des Sterolmusters unter Hypoxie/Normoxie nach unterschiedlichen Inkubationszeiten betrachtet. Es konnte ein Anstieg der Gesamt-Sterolmenge unter Hypoxie beobachtet werden. Jedoch änderte sich weder das auftretende Sterolmuster, noch konnte eine Veränderung der prozentualen Anteile einzelner Sterole, gefunden werden.

Im letzten Schritt wurde die Biomarker-Freisetzung von Galactomannan und  $\beta$ -1,3-Glucan untersucht, welche eine wichtige Rolle bei der Früherkennung der invasiven Aspergillose spielen. Hier konnte nach 24 h ein Anstieg von Galactomannan um das dreifache des Ausgangswertes und ein Anstieg von  $\beta$ -1,3-Glucan um das vierfache des Ausgangswertes in hypoxischen Pilzzellen beobachtet werden. Beide Anstiege normalisierten sich wieder nach 48 h.

Warum eine erhöhte Sensitivität von *Aspergillus*-Arten in frühen hypoxischen Stadien auftritt (Antimykotika wirken besser), bleibt vorerst unbeantwortet. Weitere Untersuchungen, nicht nur in der Ergosterol-Biosynthese und in der Biomarker-Freisetzung, müssen durchgeführt werden, um die erhöhte Sensitivität erklären zu können.

## 1.3.3.2 Poster



# Influence of hypoxia on antifungal susceptibility, sterole pattern and biomarker release of *Aspergillus* spp.

Ulrike Binder<sup>1</sup>, Elisabeth Maurer<sup>1</sup>, Christoph Müller<sup>2</sup>, Franz Bracher<sup>2</sup> and Cornelia Lass-Flörl<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Austria, e-mail: [ulrike.binder@i-med.ac.at](mailto:ulrike.binder@i-med.ac.at), <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Ludwig Maximilians University Munich, Germany



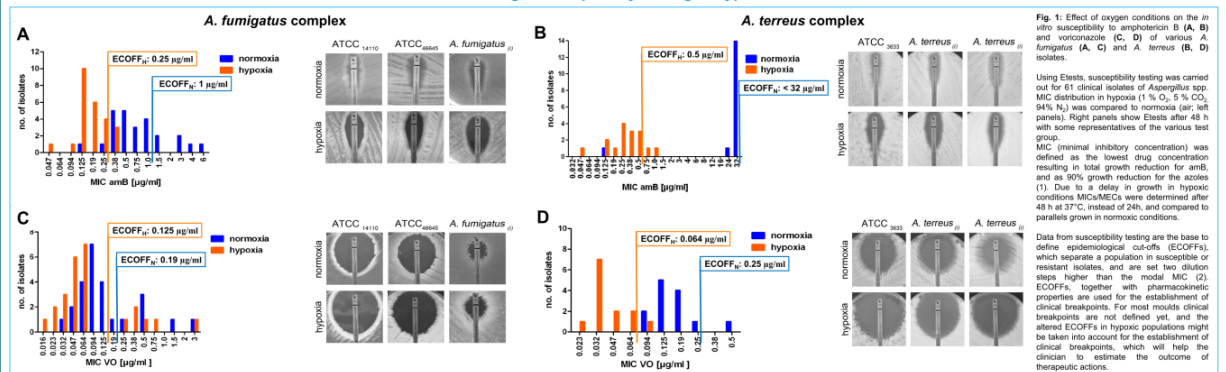
## Introduction

Invasive aspergillosis (IA) is a major life-threatening disease in immunocompromised patients, with mortality rates up to 90%. The most common species causing aspergillosis is *Aspergillus* (*A.*) *fumigatus*, accounting for approximately 90% of infections. Depending on regional distinctions, *A. flavus* and *A. terreus* are frequently reported. To improve clinical outcome of IA, it is essential to advance diagnosis, and subsequently to administer effective antifungal agents rapidly. Data collected from *in vitro* susceptibility testing help to guide the clinician in applying appropriate antifungal agents and to predict therapeutic success or failure. However, correlation between *in vitro* response and *in vivo* outcome is poor for certain antifungals and adaptation of susceptibility testing mimicking environmental situation in the host might help to improve this.

At sites of infection, oxygen availability decreases, with  $O_2$  concentrations even  $\leq 1\%$  and at the same time  $CO_2$  levels are increasing. Such oxystress conditions are usually not taken into account in current *in vitro* models of infection, the assessment of antifungal susceptibility or the release of biomarkers used for diagnosis. Therefore, we compared the *in vitro* activity of amphotericin B (amB), different azoles and echinocandins against isolates of *A. fumigatus*, *A. terreus* and other aspergilli in hypoxic conditions (1%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , 94%  $N_2$ ), and compared susceptibility profiles to that in normoxic conditions. Since we found that susceptibility to antifungals that target ergosterol or its biosynthesis seems to differ in hypoxia, we investigated if hypoxia leads to changes in the sterole pattern of different *Aspergillus*.

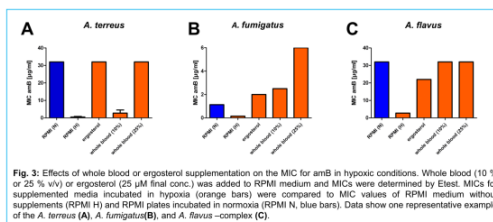
The outcome of IA not only depends on proper antifungal treatment, but also on a fast and highly specific diagnosis. One common diagnostic strategy is the detection of circulating fungal antigens such as galactomannan (GM) and  $\beta$ -glucan (BG). Because such tests have great variations in their specificity and sensitivity, for which reasons are only partially understood, we investigated if hypoxia influences the release of such antigens.

## Antifungal susceptibility testing in hypoxia



**Table 1:** Summary: Effect of hypoxia on the MIC of amB, triazoles and MEC (minimal effective concentration) of echinocandins. Changes of MIC indicated by ↓ (decrease) or ↑ (increase), n.t. = not tested.

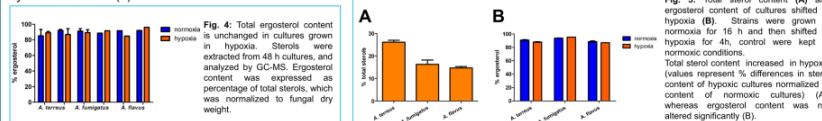
test group	amB	triazoles	echinocandins
<b>A. fumigatus (25)</b>	↓	vor- & itraconazole pos- & ketoconazole	~
<b>A. terreus (17)</b>	↓	all azoles tested	~
<b>A. flavus (9)</b>	↓	all azoles tested	n.t.
<b>A. fumigatiformis (5)</b>	↓	voriconazole	n.t.
<b>A. lentulus (5)</b>	↓	voriconazole	n.t.



- in all *Aspergillus* spp., MIC of amB was significantly reduced in hypoxia
- similarly, decreased MIC of tested azoles was shown, with most pronounced difference for *A. terreus* isolates
- ECOFFs in hypoxia differ from those in normoxia
- supplementation of test media with blood or ergosterol abrogated the reduction of the MIC

## Influence of hypoxia on sterol content and biosynthesis

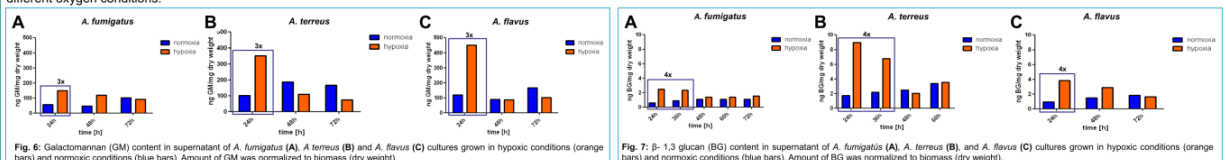
Since we found higher susceptibility to antifungals that target ergosterol or its biosynthesis in hypoxia, we investigated if hypoxia leads to changes in the sterol content and composition of different *Aspergillus*. Sterol extraction was done according to (3) using lyophilised mycelia from cultures grown in different oxygen conditions. Sterols were measured via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and analysis was carried out by as described in (3).



- increase in total sterol content in hypoxia
- no significant difference in amount of ergosterol in mycelia grown in hypoxia or shifted to hypoxia for none of the isolates tested
- current data suggest no direct link between ergosterol and increased susceptibility to amB in hypoxia, but further analysis of sterol intermediates needs to be done in more detail

## Biomarker release in hypoxia

*Aspergillus* biomarkers play an important role in the early diagnosis of IA. Galactomannan (GM) and  $\beta$ -1,3 glucan (BG) are components of the fungal cell wall and can be detected from serum by commercial detection kits. The Platelia<sup>TM</sup> Aspergillus EIA is an immunoenzymatic sandwich assay for the detection of GM antigen. BG can be measured by the Fungitell assay, which is based on the ability of BG to activate factor G of the horseshoe crab coagulation cascade. Even if this assays show high sensitivity and specificity, variations in diagnostic performances are reported (4), reasons for which are not fully explained yet. Here, we tried to evaluate the effect of hypoxic growth conditions on the release of GM and BG *in vitro*, by measuring GM and BG levels in the supernatant of *A. fumigatus*, *A. terreus* and *A. flavus* cultures grown in different oxygen conditions.



- species specific amount of detected galf (GM) and BG
- 3 fold higher amount of GM, and 4 fold higher amount of BG in hypoxia at early growth stages
- no obvious trend comparing amount of biomarker in normoxia vs. hypoxia after 48h

### **1.3.3.3 Beitrag an den im Poster präsentierten Forschungsergebnissen**

Ulrike Binder, Elisabeth Maurer und Prof. Dr. Cornelia Lass-Flörl waren für die Konzeptionierung der Experimente und des Posterbeitrages verantwortlich. Unter der Verantwortung von Prof. Dr. Franz Bracher war meine Aufgabe die Sterol-Analyse mittels GC-MS (*iontrap*) an verschiedensten Pilzproben. Die Auswertung erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ. Die Anpassung der Aufarbeitung ausgehend von dem neu entwickelten Testsystem (siehe Kapitel 1.3.1.2) wurde von mir in Zusammenarbeit mit Ulrike Binder und Elisabeth Maurer durchgeführt. Die bisherige Vorgehensweise war die Aussaat einer bestimmten Zahl an Kolonie-bildenden Einheiten, bei *Aspergillus* Arten ist dies jedoch nicht möglich, daher wurden 2 mg lyophilisierte Pilzprobe verwendet. Die Probenvorbereitung unterlag Ulrike Binder und Elisabeth Maurer.

### 1.3.4 Diskussion zur Ergosterol-Biosynthese-Testung

Durch eine deutliche Weiterentwicklung bestehender Testsysteme und Ausbau zu einer umfassenden GC-MS-Datenbank (siehe Kapitel 1.3.1, 1.3.2) ist es gelungen, einen leistungsfähigen Assay aufzubauen, der sowohl für die Charakterisierung von neuen Antimykotika als auch für die Erforschung von unbekannten Sterol-Biosynthesewegen geeignet ist.

Der Grund, warum der entwickelte Assay "nur" für den Post-Lanosterol-Abschnitt der Ergosterol-Biosynthese geeignet ist und nicht wie der Cholesterol-Biosynthese-Assay ab dem Triterpen Squalen, hat zwei Hauptgründe:

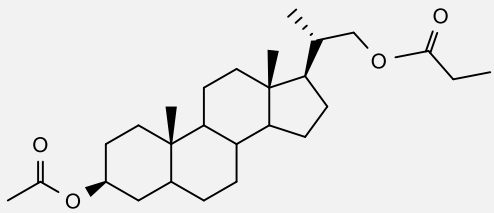
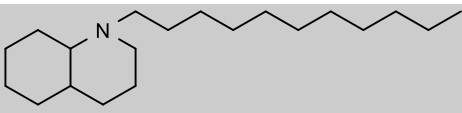
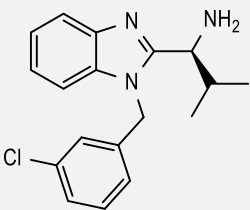
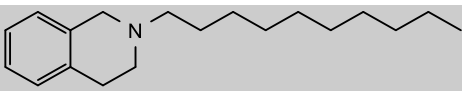
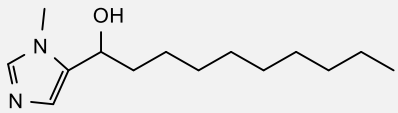
- Alle drei verwendeten Pilze hatten generell stark schwankende Squalen-Konzentrationen (zum Teil > als Faktor 2). Daher kann eine durch einen Inhibitor verursachte Anreicherung von Squalen nur schwer eindeutig nachgewiesen werden.
- Die Detektion von Squalenepoxid war schon in Inkubationsansätzen mit humanen HL60 Zellen schwierig (vgl. Kapitel 1.2.1). Zwar ist Ro 40-8071 als unspezifischer Referenzinhibitor für humane und fungale Zellen beschrieben, dennoch konnte nach Inkubation mit dieser Substanz in dem Ergosterol-Ganzzell-Assay keine Anreicherung von Squalenepoxid beobachtet werden. Auch durch Variation der Anzuchtbedingungen (v.a. durch Änderung des Nährmediums) und Einführung zweier weiterer Pilze konnte kein Squalenepoxid detektiert werden. Entweder verstoffwechselt der Pilz das Epoxid auf andere Wege oder es kommt zur Hochregulierung der Squalenepoxidase-Aktivität oder aber alle Substanzen waren nicht genügend zellgänig. Die meisten synthetisierten OSC-Inhibitoren zeigten im Agar-Diffusionstest ebenfalls eine geringe Aktivität. Nachträgliches Aufstocken der Pilzproben mit Squalenepoxid lieferte Squalenepoxid-Signale im Chromatogramm. Daher kann die Aufarbeitung und die Detektion als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

#### Bedeutung der neu entwickelten Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren (Tabelle 10):

- Neue Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren konnten (vgl. Kapitel 1.2.4, 1.3.1, 1.3.2, 1.3.2.2, 1.3.2.3) nicht nur durch Agar-Diffusionstest und MHK-Wert charakterisiert werden (vgl. Abbildung 3) sondern auch deren Targets in der Ergosterol-Biosynthese.
- Die Testung der neuen Substanzen (n = 140) lieferte keine neuen Angriffspunkte an Enzymen im Post-Lanosterol-Abschnitt der Ergosterol-Biosynthese. Zu jedem adressierten Enzym (Tabelle 10) sind bereits Inhibitoren bekannt.
- Die am besten charakterisierten Substanzen sind JK-250 und EMC120B12.
- Einige Substanzen von Sandra Hemmers zeigten eine C24-Methyltransferase-Hemmung, jedoch auch eine Aktivität im Cholesterol-Biosynthese-Assay (Kapitel 1.2.4). Zwar kommt die

C24-Methyltransferase (Kapitel 1.2.4) nur in fungalen Zellen vor, jedoch wurden auch verschiedene Enzyme in der Cholesterol-Biosynthese inhibiert.

- Weitere Substanzklassen von Jürgen Krauss erwiesen sich als unspezifische Inhibitoren (Kapitel 1.3.2.2), da entweder die  $\Delta^{14}$ -Reduktase und/oder die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase inhibiert wurde. Andere Substanzen von Jürgen Krauss zeigten zwar eine Aktivität im Agar-Diffusionstest, jedoch keine Aktivität im Ergosterol-Biosynthese-Assay.
- Alle Inhibitoren zeigten jedoch keine ausgeprägte Selektivität gegenüber einem Organismus (Pilz- oder Humanzellen), bis auf EMC120B12. Daher gilt diese Substanz als besonders interessant, zumal ein großer Datensatz an biologischen Testergebnissen zu dieser Substanz vorliegt [43], unabhängig von unseren Ergebnissen. Ich konnte nicht nur den Wirkmechanismus der Substanz aufklären (C14-Demethylase-Inhibitor) sondern auch bis dato unbekannte Sterole charakterisieren, die in *Candida krusei* nach Inkubation mit EMC120B12 auftreten (Kapitel 1.3.2.1).

Struktur	Herkunft	Kapitel	Inhibiertes Enzym	MHK [µg/mL]
	Sandra Hemmers	1.2.4	C24-Methyltransferase	> 8
	Jürgen Krauss	1.3.1	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	2,5
	EMC Microcollections GmbH	1.3.2.1	C14-Demthylase	2,8
	Jürgen Krauss	1.3.2.2.2	$\Delta^{8/7}$ -Isomerase	5,0
	Jürgen Krauss	1.3.2.3.2	(C5-Desturase)	25

**Tabelle 10:** Übersicht über die potentesten und Verbindungen der einzelnen Kapiteln der Ergosterol-Biosynthese Testung; Die angegebenen MHK-Werte wurden an *Candida glabrata* ermittelt



Generelles Fazit der Ergosterol-Biosynthese-Testung:

- In Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart konnten pathogene Pilze untersucht werden. Dabei konnten nach Inkubation mit dem C14-Demethylase-Inhibitor EMC120B12 bis dato unbekannte Sterole identifiziert werden und eine plausible Biosyntheseroute für diese Sterole aufgestellt werden (vgl. Kapitel 1.3.2). Dieses Beispiel zeigt sehr schön, dass die Ergosterol-Biosynthese nicht unbedingt in strikten Enzymabfolgen verläuft, sondern vielmehr auf äußeren Druck verschiedenste Reaktionen nebeneinander ablaufen können.
- Wie schon in dem Artikel in Kapitel 1.3.1.2 beschrieben (Entwicklung neuer Testsysteme zur Charakterisierung von Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren), kann man mit dem neuen Assay fast immer Rückschlüsse auf das inhibierte Enzym ziehen. Anders als in der humanen Cholesterol-Biosynthese, wo bei Hemmung eines bestimmten Enzyms nur ein oder höchstens zwei Markersterole akkumulieren, kann in Pilzen eine ganze Reihe von unphysiologischen Sterolen gebildet werden, wie v.a. die Analyse von *Candida krusei* zeigte (Kapitel 1.3.2.1).
- Die Zusammenarbeit mit der Sektion für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Innsbruck beweist, dass es noch genügend interessante Beobachtungen gibt, bei der die Ergosterol-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt bzw. spielen könnte und eine anspruchsvolle Sterolanalytik benötigt wird
- Die Grundvoraussetzung für solche Analysen sind leistungsfähige Methoden (Probenvorbereitung und Analytik), Geräte mit hoher Selektivität und Sensitivität (vgl. Kapitel 3) und *Know-how* (z.B. GC-MS-Sterol-Datenbanken).



## 2 Studien zu Matrix-induzierten Effekten in der GC

*Matrix effects are „an influence of one or more undetected components from the sample on the measurement of the analyte concentration or mass. The response of some determination systems (e.g. GC, LC-MS, ELISA) to certain analytes may be affected by the presence of coextractives from sample (matrix)...“*

SANCO Guideline 10684/2009 [54].

Das Kapitel 2, „Studien zu Matrix-induzierten Effekten in der GC“ ist das Bindeglied zwischen den beiden großen Teilen meiner Arbeit, nämlich dem Kapitel 1, „Sterol-Biosynthese-Testung“ und dem Kapitel 3, „Methodenkonzepte für die Spurenanalytik“.

Unter dem Begriff „Matrix-induzierte Effekte“ wird eine Vielzahl von verschiedenen Effekten zusammengefasst. Nach einer Richtlinie der Europäischen Kommission für Gesundheit und Verbraucher (SANCO), welche verantwortlich ist für den Bereich Lebensmittel-/Pestizidanalytik, können *„matrix effects“* bezogen auf die GC-MS-Analytik wie folgt beschrieben werden [54]:

In der Gaschromatographie kann es durch den Einfluss der Matrix zu Peakflächenverkleinerung, zu schlechten Peakformen und sogar zum vollständigen Verlust des Signals nach mehreren Injektionen kommen (*„sample breakdown“*). Jedoch kann bei der Anwesenheit von originären oder zugesetzten Stoffen auch ein genau gegenteiliger Effekt beobachtet werden!

Einen entscheidenden Einfluss auf die Detektion des Analyten hat dabei die Matrix. Um die Einflüsse der Matrix zu minimieren gibt es zwei Möglichkeiten: entweder man arbeitet *„matrix matched“*, wie unter Kapitel 3.2 durchgeführt, oder man setzt den Proben sogenannte *„analyte protectants“* zu.

**ARBEITSWEISE:**

- ***matrix matched***

Unter dem Begriff „*matrix matched*“ versteht man, dass alle Proben nicht in reiner Lösung, sondern in ungefähr gleicher Matrix gelöst untersucht werden. Der Vorteil liegt darin, dass sich alle Proben, also alle Effekte gleich verhalten, da die Analyten in die gleiche Matrix eingebettet sind. Gleiche Analytkonzentrationen liefern über ein gewisses Messintervall gleiche Peakflächen, was bei wechselnder Matrix nicht der Fall sein muss. Nachteilig an dieser Vorgehensweise ist, dass die Kalibriergerade nur für diese Matrix gilt, d.h. bei der Verwendung einer anderen Matrix muss auch immer eine Kalibriergerade mit der jeweiligen Matrix hergestellt werden. Außerdem müssen einzelne Validierungsparameter für die jeweilige Matrix bestimmt werden. Dies bedeutet einen deutlichen Zeit- und Kostenaufwand. Ein weiteres Problem stellt die Beschaffung von unbelastetem Probenmaterial (Matrix) dar, da man für die Kalibriergerade solches zwingend benötigt (vgl. Kapitel 3.2).

- ***analyte protectants***

Dem gegenüber steht der Zusatz von bestimmten Stoffen, den sogenannten „*analyte protectants*“ (AP), die es ermöglichen, den Analyten vor Verlust der Signalstärke und dem „*sample breakdown*“ zu schützen. APs schützen den Analyten vor Zersetzung oder Anlagerung an aktiven Stellen, dazu gehören freie Silanolgruppen und Metallkationen im Liner und Säulenkopf. In der Pestizid-Analytik werden dazu meist hochkonzentrierte (mg/mL) und hochpolare Gemische eingesetzt (z.B. Ethylglycerol, Fructose, Sorbitol, Arabinose) [55].

Florian Plöchl beschrieb bereits in seiner Doktorarbeit und in einem Posterbeitrag bei der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft den positiven Einfluss von Cholesterol in Vollblut für die GC-Analytik [56, 57]. Er untersuchte damals Arzneistoffe im Vollblut mittels einer QuEChERS-Aufarbeitung (siehe Kapitel 3.1). Dabei stellte er fest, dass je nach zugesetzter Cholesterolmenge (bis zu 7,5 µg/mL) die Peakflächen zwischen 100 und 225% höher waren als ohne. Zudem zeigten die Analyten ein geringeres „*tailing*“ schon unter dem Zusatz von 5 µg/mL Cholesterol zur Matrix. Unter wiederholter Injektion einer Probe (n = 75) konnte eine annähernde Peakflächenkonstanz für eine Auswahl an Modellanalyten (Amitriptylin, Methylphenobarbital, Diethylstilbestrol) beobachtet werden.

Während der Methodenentwicklung zu „*Determination of nicotine in dried mushrooms by using a modified QuEChERS approach and a GC-MS-MS*“ (Kapitel 3.2.1) zeigten sich deutliche Matrix-Effekte bei Versuchen ohne Matrix, nur Analyt plus Lösungsmittel. Da sich die Analyse auf Pilzmatrix beschränkte, reichte es aus, *matrix matched* zu arbeiten. Damals wurden die auftretenden Effekte dem in der Pilzmatrix enthaltenen Ergosterol zugeschrieben. Ergosterol ist dem von Florian Plöchl

verwendeten Cholesterol strukturell sehr ähnlich. Es besitzt nur eine Methylgruppe und zwei Doppelbindungen mehr als Cholesterol (vgl. Abbildung 1). Die „*analyte protectants*“ Wirkung galt durch die Arbeit von Florian Plöchl für Cholesterol als bewiesen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit nahmen wir Gleiches auch für Ergosterol an, zumal dieses in einer relativ hohen Konzentration (0,5-1,0%) in getrockneten Pilzen vorkommt [58].

Nach Veröffentlichung des oben genannten Artikels wurde das Problem der Matrix-induzierten Effekte bzw. die Verifizierung von Ergosterol als AP genauer untersucht. Anfängliche Untersuchungen mit verschiedenen Ergosterol-Konzentrationen plus Analyt in reinem Lösungsmittel zeigten keinen positiven Effekt bei der Nikotin-Bestimmung. Auch Versuche mit Cholesterol verliefen negativ. Durch QuEChERS-Aufarbeitung von Pilzproben, wie unter Kapitel 3.1 beschreiben und GC-MS Analyse an der Ionenfalle (*iontrap*) im „*full scan*“-Modus (30-450 *m/z*) wurde Nikotinamid als Hauptkomponente des underivatisierten flüchtigen Anteils identifiziert. Daraufhin wurden ebenfalls AP Studien mit Nikotinamid durchgeführt.

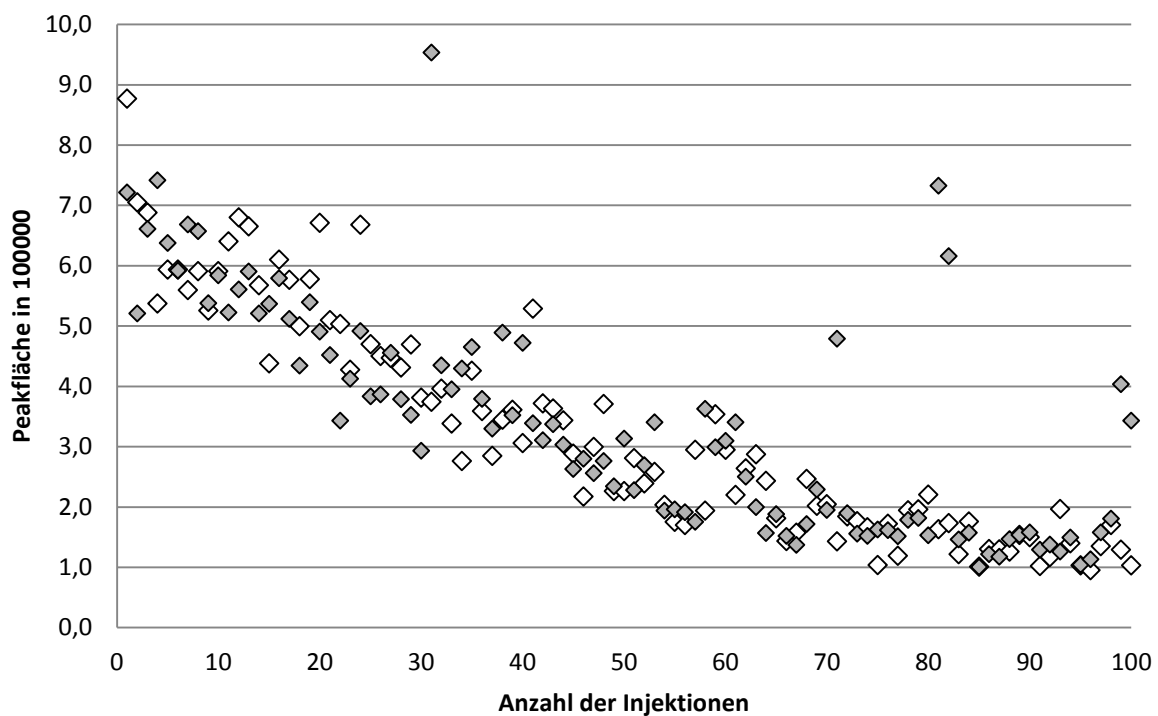
## STUDIE

### Das Studiendesign war wie folgt:

- Pro Experiment ein neuer deaktivierter Liner und neu gekürzte Säule
- Herstellung einer Stammlösung für jedes Experiment 100 ng/mL Nikotin in Ethylacetat als Lösungsmittel mit AP (Ergosterol oder Nikotinamid)
- Der Inhalt von 10 Vials wurde zehnmal injiziert ( $n = 100$ )
- Datenaufnahme und Datenverarbeitung wie in der oben genannten Publikation

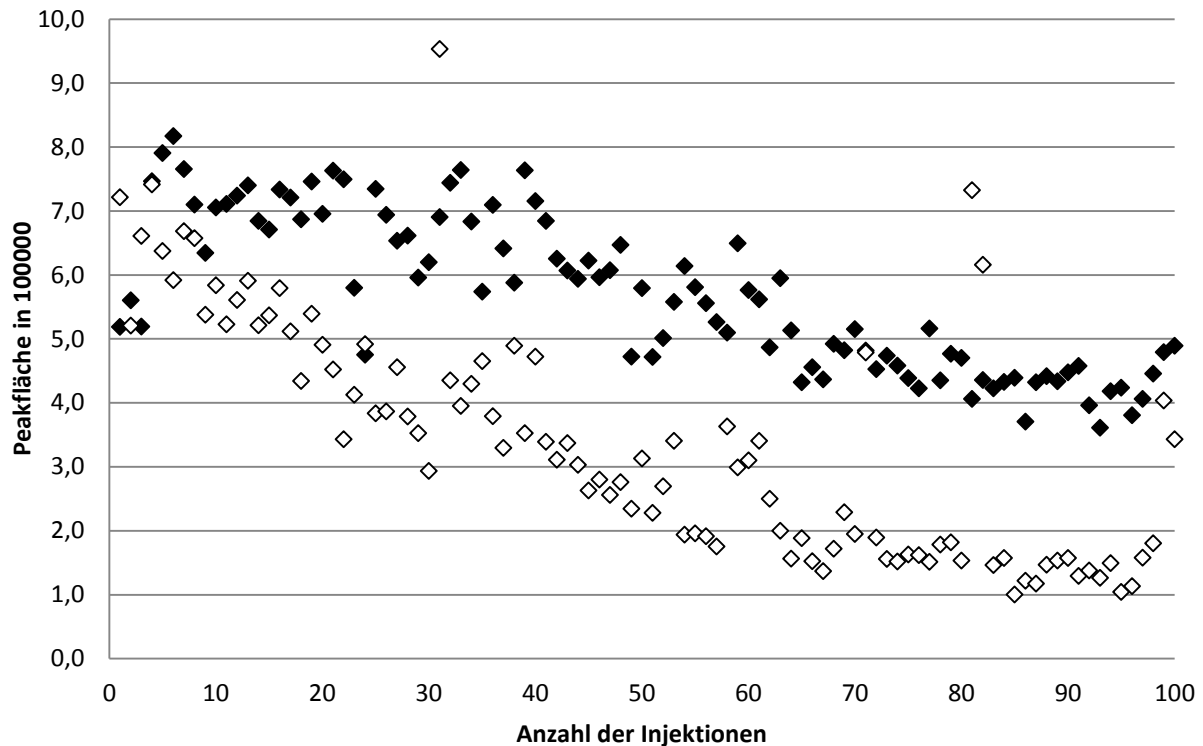
### Ergebnisse:

Im ersten Versuch (Abbildung 21) wurde mit 5 µg/mL (12,5 nM) Ergosterol als AP gegen eine reine Lösung von Nikotin getestet um zu untersuchen, ob Ergosterol einen positiven Einfluss auf die Bestimmung des Analyten hat. Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Experimenten festgestellt werden (vgl. Abbildung 21, Tabelle 11, Tabelle 12). Schon von Beginn an waren die Peakformen und die Peakflächen schlecht, was sich zum Ende der Experimente noch verstärkte (Abbildung 24).



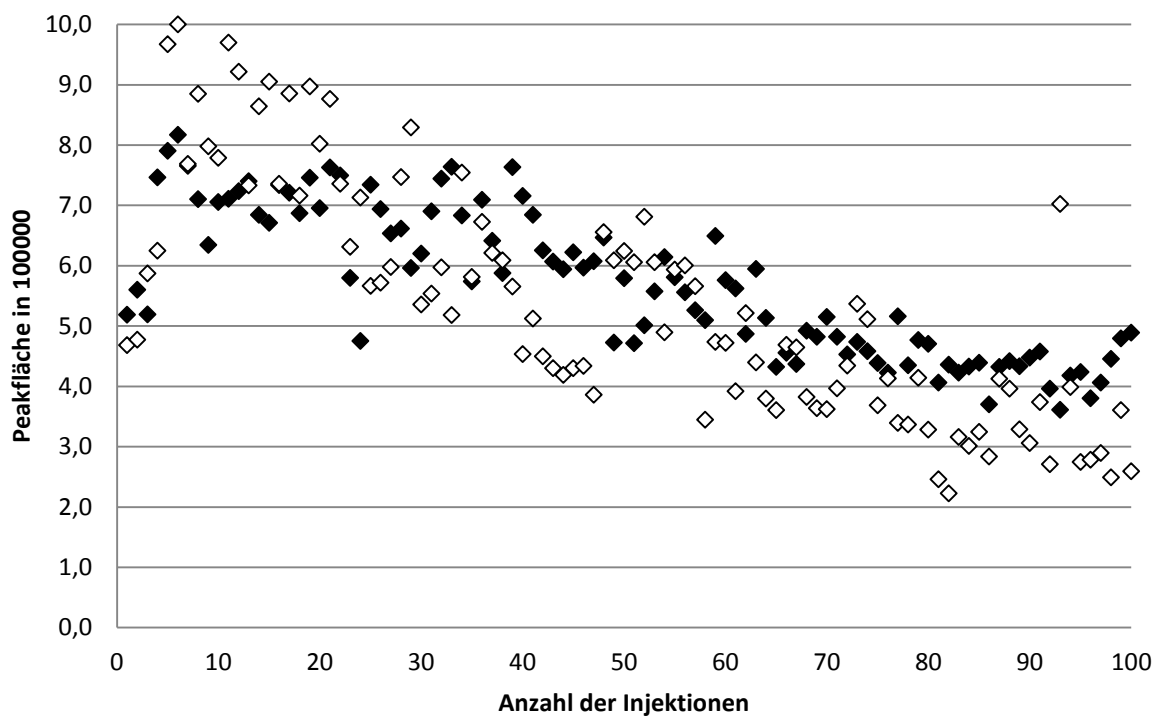
**Abbildung 21:** AP-Effekt von 5 µg/mL (12,5 nM) Ergosterol (weiß) bzw. 0 µg/mL Ergosterol (grau) (graphische Darstellung) auf die Bestimmung von Nikotin

Im anschließenden Versuch wurde eine 5 µg/mL (41 nM) Nikotinamid-Lösung als AP getestet (Abbildung 22; Abbildung 24). Hier zeigte sich ein deutlich positiver Effekt auf die Peakform, sowie ein deutlich verringertes „*tailing*“ und ein geringerer Abfall der Peakflächen mit zunehmender Zahl an Injektionen gegenüber der 5 µg/mL (12,5 nM) Ergosterol-Lösung (vgl. Abbildung 24, Tabelle 11). Die Flächenabnahme über die 100 Injektionen und die Schwankungen der einzelnen Peakflächen waren deutlich geringer als bei 5 µg/mL (12,5 nM) Ergosterol. Die Unterschiede der Peakflächen bei Verwendung der 0 µg/mL bzw. der 5 µg/mL (12,5 nM) Ergosterol Lösung waren hoch signifikant (Tabelle 12).



**Abbildung 22:** AP-Effekt von 5 µg/mL (12,5 nM) Ergosterol (weiß) und 5 µg/mL (41 nM) Nikotinamid (schwarz) (graphische Darstellung) auf die Bestimmung von Nikotin

In der Spurenanalytik ist es üblich, die Konzentration von Analyten in mg, µg oder ng pro Volumen-/Gewichtseinheit anzugeben und nicht als molare Konzentrationen. Da aber bei einer Konzentration von 5 µg/mL die Stoffmengenkonzentration von Nikotinamid deutlich höher ist als von Ergosterol (41 nM zu 12,5 nM), wurde in einem letzten Versuch die Stoffmengenkonzentration von Ergosterol an die von Nikotinamid angepasst (Abbildung 23). Zum Einsatz kam nun eine 16,2 µg/mL Ergosterol-Lösung. Auch diese Lösung war der Nikotinamid-Lösung nicht gleichwertig (hoch signifikanter Unterschied, Tabelle 12). Zwar lieferte die 16,2 µg/mL Ergosterol-Lösung anfänglich höhere Nikotinflächen, jedoch war auch hier ein deutlich stärkerer Abfall der Flächen („*sample breakdown*“) zu beobachten, was sich in einer steiler abfallenden Steigung der Regressionsgerade (Peakfläche aufgetragen gegen die Anzahl der Injektionen) bemerkbar machte (Tabelle 11). Dadurch wurde die relative Standardabweichung (RSD) der Peakflächen ebenfalls negativ beeinflusst (Tabelle 11). Selbst die Peakform war nicht annähernd so gut wie bei Nikotinamid, weder nach der ersten Injektion noch nach der hundersten (Abbildung 24).



**Abbildung 23:** AP-Effekt von 16,2 µg/mL (41 nM) Ergosterol (weiß) und 5 µg/mL (41 nM) Nikotinamid (schwarz) (graphische Darstellung) auf die Bestimmung von Nikotin

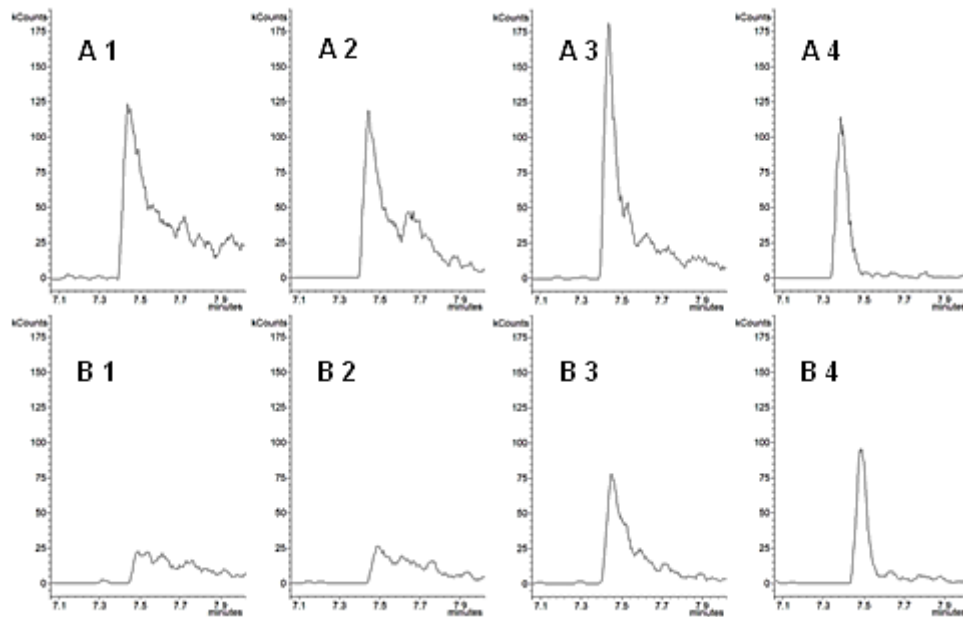
Lösung	Summe der Peakflächen (n = 100)	RSD Peakflächen [%] (n = 100)	Geradengleichung der Ausgleichsgeraden
Ohne AP	3265 * 10 <sup>4</sup>	57	y= -5680x + 613600
Mit Ergosterol 5 µg/mL	3402 * 10 <sup>4</sup>	54	y= -4820x + 583500
Mit Ergosterol 16,2 µg/mL	5371 * 10 <sup>4</sup>	36	y= -5460x + 812800
Mit Nikotinamid 5 µg/mL	5698 * 10 <sup>4</sup>	21	y= -3490x + 745940

**Tabelle 11:** Veränderung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Zugabe von AP (mathematische Darstellung) auf die Bestimmung von Nikotin



Lösung	Ohne AP	Ergosterol 5 µg/mL	Ergosterol 16,2 µg/mL	Nicotinamid 5 µg/mL
Ohne AP	↔	↕	↕	↑
Ergosterol 5 µg/mL	↕	↔	↕	↑
Ergosterol 16,2 µg/mL	↕	↕	↔	↑
Nicotinamid 5 µg/mL	↑	↑	↑	↔

**Tabelle 12:** Prüfung der Peakflächen auf Signifikanz mittels F-Test; ↑ hoch signifikant, ↔ kein Unterschied, da selbe Lösung, ↕ nicht signifikant



**Abbildung 24:** Veränderung der Peakform/-fläche nach 100 Injektionen; A Reihe erste Injektion, B Reihe hunderste Injektion, A1/B1 ohne AP, A2/B2 mit Ergosterol 5 µg/mL, A3/B3 mit Ergosterol 16,2 µg/mL, A4/B4 mit Nikotinamid 5 µg/mL

#### Zusammenfassung der Ergebnisse:

Nikotinamid als AP-Substanz war in allen Versuchen dem Ergosterol überlegen. Es lieferte homogenere Peakflächen (niedrigere RSD und flachere Steigung der Regressionsgeraden) und bessere Peakformen. Die Summe der Peakflächen war bei Nikotinamid am größten, trotz der etwas niedrigeren Anfangsflächen gegenüber den Anfangsflächen mit Ergosterol 16,2 µg/mL als AP.

#### Interpretation der Ergebnisse:

Cholesterol und Ergosterol kann man nicht generell als AP-Substanz bezeichnen. Zwar konnten positive Effekte in einer QuEChERS-Methode zur Bestimmung von Arzneistoffen in Vollblut gezeigt werden, jedoch nicht für die Untersuchung von Nikotin. Der Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Verdampfbarkeit und Retentionszeit der Analyten bzw. der AP-Substanzen liegen. Die verwendeten Arzneistoffe von Florian Plöchl wiesen eine niedrigere Verdampfbarkeit und damit eine längere Retentionszeit auf als Nikotin. Der relative Retentionszeitenabstand bzw. der Abstand im Temperaturgradientenprogramm zwischen Arzneistoffen und Cholesterol war geringer als der von Nikotin und Ergosterol. Zwar werden für die Matrix-induzierten Effekte vor allem aktive Stellen (Metallkationen, freie Silanol-Gruppen) im Liner und die heiße Injektionstechnik (Liner-Temperatur 250 °C) verantwortlich gemacht. Da die Injektionstemperatur aber bei allen Versuchen gleich blieb und

immer ein neuer deaktivierter Liner verwendet wurde, muss für die beobachteten Matrix-induzierten Effekte eine andere Begründung gefunden werden:

Die unterschiedliche Verdampfbarkeit von Ergosterol, Nikotin und Nikotinamid spielt während der Injektion keine Rolle, da die Verdampfung der Lösung nur wenige zehntel Sekunden dauert.

Die „*analyte protectant*“ Wirkung von Nikotinamid auf Nikotin hängt maßgeblich mit der Retentionszeit zusammen, da diese Analyten fast zeitgleich eluieren. Die Messung im MRM-Modus (vgl. Kapitel 3.2), macht eine Verfälschung der gemessenen Peakflächen unmöglich. Für die positiven Effekte von Nikotinamid müssen daher Effekte während der Trennung auf der 5 %-Phenyl-95 %-Dimethylpolysiloxan Kapillarsäule verantwortlich gemacht werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

Nikotinamid ist als „*analyte protectant*“ Substanz zumindest für den Analyten Nikotin geeignet. Weitere Analyten wurden nicht getestet. Nikotinamid wurde nachfolgend immer als AP bei Flüssiginjektionen in Vorversuchen für die Analyse von Tabakalkaloiden in Milch und Schokolade verwendet (vgl. Kapitel 3.2).

Die Entscheidung für die Verwendung von „*analyte protectants*“ oder einer „*matrix matched*“ Arbeitsweise ist je nach Problem und bindender Richtlinie zu treffen. Die Analyse von Produkten für den amerikanischen Markt kann nicht mit einer „*matrix matched*“ Arbeitsweise durchgeführt werden, da die FDA (*Food and Drug Administration*) und die US EPA (*United States Protection Agency*) diese Vorgehensweise nicht anerkennen, da nach ihrer Ansicht keine konstante Probenzusammensetzung für die Matrix gewährleistet werden kann [56]. Damit machen FDA und US EPA die Benutzung von APs zwingend nötig, um eine robuste Analytik zu erhalten. Nach den SANCO-Richtlinien sind „*matrix matched*“ Ergebnisse für die Lebensmittelanalytik im europäischen Raum jedoch verwendbar, unterliegt ein Analyt Matrix-induzierten Effekten so ist eine „*matrix matched*“ Arbeitsweise sogar zwingend erforderlich [59].

Beide Arbeitsweisen liefern eine deutlich „bessere“ Analytik sowie höhere Peakflächen/-formen, und niedrigere LOD-, LOQ- und RSD-Werte. Ist kein unbelastetes Referenzmaterial verfügbar, ist keine „*matrix matched*“ Arbeitsweise möglich. Dem gegenüber steht ein extra Arbeitsschritt bei der Verwendung von APs, da diese erst zugesetzt werden müssen. Dafür sind die gemessenen Proben nicht auf eine Matrix beschränkt. Die Kehrseite davon ist eine stärkere Belastung und Verschmutzung des Gerätes, da die APs relativ meist hochkonzentriert eingesetzt werden müssen (mg/mL).



## 3 Methodenkonzepte für die Spurenanalytik

Das Kapitel 3 und das Kapitel 1 sind die zwei grundsätzlich verschiedenen Teile meiner Arbeit. Das Kapitel 2 verknüpft beide Teile, indem es die „*analyte protectants*“ Wirkung von Sterolen in der Spurenanalytik beschreibt.

### 3.1 Einleitung

*“Analytical Criteria of 6 Ss: Specificity, Sensitivity, Speed, Sampling, Simplicity and \$!”*

Fred McLafferty (1984)

Der amerikanische Chemiker Fred McLafferty (geboren 1923) gilt als einer der Pioniere und Wegbereiter der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). In dem Zitat sind alle Kriterien enthalten, die moderne Methodenkonzepte für die Spurenanalytik erfüllen müssen:

#### KRITERIEN:

- **Specificity**

Die Spezifität ist nach SANCO Richtlinie [54] die Fähigkeit des Detektors, unterstützt durch die Selektivität des aufgereinigten, notfalls derivatisierten Extraktes Signale zu erzeugen, welche eindeutig den Analyten identifizieren. GC-MS mit EI (*electron ionisation*) ist eine nicht-selektive Methode mit hoher Spezifität. Techniken mit hochauflösender Masse und/oder MS<sup>n</sup> besitzen sowohl hohe Selektivität als auch Spezifität [54]. Dieses Kriterium wird heutzutage hauptsächlich durch das Gerät bestimmt. Je leistungsfähiger das Gerät, desto höher die Spezifität. Eine langwierige Aufarbeitung von Proben ist daher nicht mehr nötig. Die Arbeiten im Kapitel 3.2 wurden mit MS<sup>2</sup> (= Tandemmassenspektrometrie, auch als MS/MS bezeichnet) durchgeführt, um eine hohe Selektivität und Spezifität zu erreichen.

- **Sensitivity**

Die Veränderung in der Antwort eines messenden Systems (z.B. GC-MS), geteilt durch die dazugehörige Veränderung des Impulses, wird als Sensitivität bezeichnet [60]. Die Sensitivität hängt somit von dem generellen Ansprechverhalten des Analyten in seiner Matrix auf den Detektor und auf das Messinstrument ab. Leistungsfähige Geräte können durch eine sehr hohe Spezifität ihre Sensitivität steigern, da unerwünschte Komponenten aus der Matrix

ausgeblendet werden können (z.B. MS/MS). Die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) sind somit auch abhängig von der Leistungsfähigkeit des Gerätes. Je höher die Signalstärkenänderung bei kleiner Änderung der Konzentration, desto höher ist die Sensitivität. Je sensitiver ein Gerät/Methode desto niedriger liegen LOD und LOQ. Gut aufgereingte Probenextrakte können einen positiven Einfluss auf LOD und LOQ haben.

- **Speed**

Die Geschwindigkeit spielt eine wesentliche Rolle in der analytischen Chemie. Durch kürzere Analysenzeiten können mehr Proben pro Zeiteinheit/Arbeitstag bewältigt werden. Es kommt zur Kostensenkung für die einzelne Analyse. Eine komplette Analyse umfasst den Probenzug, die Probenvorbereitung, die Trennung, die Detektion und die Datenauswertung. Bis zu 80 % der Gesamtzeit stecken meist immer noch in der Probenvorbereitung. Daher müssen schnellere Methoden entwickelt werden um damit Zeit und Kosten zu sparen (vgl. Kapitel 3.2) [61].

- **Sampling**

Der Probenzug ist ein wichtiger Punkt jeder Analyse. Er steht immer am Anfang jeder Analyse. Wird die Probe falsch gezogen, spiegelt sie nicht den tatsächlichen Querschnitt der gesamten Probe wider. Die Anzahl der zu entnehmenden Proben pro Charge ist reglementiert, da davon das Ergebnis beeinflusst wird [62]. Waren in den 80er Jahren noch große Mengen an Probenmatrix nötig, so können heute Proben mit wenigen Mikrogramm bis Milligramm untersucht werden, da die Leistungsfähigkeit der Analysenmethoden und der instrumentellen Ausstattung stark gestiegen ist (z.B. Mikrowellenaufschluss von pflanzlichen Material). Der Ansatz ist die Miniaturisierung (vgl. Kapitel 3.3) [61]. Dadurch können viele Arbeitsschritte während der Aufarbeitung automatisiert und geringere Mengen an Verbrauchsmaterialien verwendet werden, was wiederum Kosten und Zeit spart.

- **Simplicity**

Je einfacher die Analyse, insbesondere die Probenvorbereitung, desto weniger Fehler können gemacht werden. Die Häufigkeit von Aufarbeitungsfehlern sinkt. Man braucht für die Probenvorbereitung kein hochqualifiziertes Personal mehr, was zur Folge hat, dass Kosten gesenkt werden. Durch wenige Aufarbeitungsschritte kann zudem noch Zeit gespart werden, was sich wieder in den Gesamtkosten pro Analyse widerspiegelt. Durch die Verwendung von leistungsfähigen, hochselektiven und –sensitiven Geräten können die Aufarbeitungs- und Aufreinigungsschritte verkürzt oder einfacher werden, was jedoch einen höheren Anspruch an das Gerät und an die Auswertung bzw. an den Anwender (Fachpersonal) stellt (vgl. Kapitel 3.2)

- \$

Die Wirtschaftlichkeit einer Analyse sollte nicht im Mittelpunkt stehen, sondern die Zuverlässigkeit und Aussagekraft eines Ergebnisses. Die Kosten einer Analyse können hauptsächlich durch die oben genannten Faktoren wie *speed* (höherer Probendurchsatz), *sampling* (Miniaturisierung) und *simplicity* (Personal) gesenkt werden. Die Anschaffungspreise für leistungsfähige Systeme sind zwar hoch, dennoch sind die Personalkosten und der Zeitaufwand der ausschlaggebende Punkt um die Gesamtkosten zu senken.

Erst durch die Probenvorbereitung wird der Analyt zugänglich für die Analyse. Die Auswahl der geeigneten Vorbereitung richtet sich nach den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten und nach der Matrix, in die der Analyt eingebettet ist. Für die Klassifizierung der Probenvorbereitungsmethoden gibt es verschiedene Möglichkeiten.

Chen et al. [61] unterteilen in elf Hauptprinzipien:

- durch Mechanik (z. B. Mahlen, Mischen)
- durch die Schwerkraft (z.B. Sedimentation, Zentrifugation)
- durch ein magnetisches Feld
- durch Größenausschluss
- elektrochemisch
- durch Derivatisierung oder Markierung (z.B. Methylierung, Silylierung)
- durch Abbau (z.B: Edman-Abbau, Verbrennung)
- durch Filtration (z.B. Dialyse, Gelfiltration)
- durch Phasentrennung (z.B. Flüssig-Flüssig-Extraktion, Soxhletextraktion)
- durch Anlagerung (z.B: Festphasenmikroextraktion (SPME), Festphasenextraktion (SPE))
- durch geschwindigkeitsabhängige Methoden (z.B. Elektrophorese, Säulenchromatographie)

Im Normalfall kommen mehrere Prinzipien während der Probenvorbereitung und Probenanalyse zum Tragen.

In den folgenden Kapiteln 3.2 und 3.3 werden einzelne neu entwickelte Probenvorbereitungsmethoden näher beschreiben. An dieser Stelle soll nur kurz darauf eingegangen werden, welche Prinzipien nach Chen et al. [61] in meiner Arbeit Anwendung fanden.

Bereits in Kapitel 1 und im noch folgenden Kapitel 3.3 werden bei der Probenvorbereitung fünf der elf Hauptprinzipien eingesetzt, um die Ergebnisse der einzelnen Forschungsprojekte zu erhalten:

- durch die Schwerkraft (Zentrifugation)
- durch Phasentrennung (Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE))
- durch Anlagerung (dispersive Festphasenextraktion (dSPE))
- durch Derivatisierung oder Markierung (Silylierung)
- durch geschwindigkeitsabhängige Methoden (Säulenchromatographie)

Das Innovative an dieser Probenvorbereitung ist mit den verwendeten Prinzipien: a) der Einsatz geringster Probenmengen, b) die Aufreinigung des Extraktes durch die dSPE und c) der Ansatz zur Miniaturisierung.

In Kapitel 3.2.2 werden bei der Probenvorbereitung vier der elf Hauptprinzipien erfolgreich kombiniert, um eine leistungsfähige Aufarbeitungsmethode zu erhalten:

- durch Schwerkraft (Zentrifugation)
- durch Anlagerung (SPME)
- durch geschwindigkeitsabhängige Methoden (Säulenchromatographie)

Das Innovative an dieser Probenvorbereitung ist: a) der Aufschluss der Analyten aus einer sehr schwierigen Matrix, b) Automatisierung, c) Nachweis der Analyten im g/kg- bzw. ng/kg-Bereich in einer Analyse und d) einfachste Probenaufarbeitung (vgl. *simplicity*)

Ziel dieses Teils meiner Arbeit war es, neue Methodenkonzepte im Arbeitskreis zu etablieren um den steigenden Ansprüchen der Spuren- und Umweltanalytik gerecht zu werden. Im Fokus der pharmazeutischen Analytik stehen nicht nur Wirkstoffe in verschiedenen Darreichungsformen, sondern auch aus biologischen Matrices, wie Vollblut, Urin, Fleisch (vgl. Kapitel 3.3), pflanzlichen Geweben und Lebensmitteln (vgl. Kapitel 3.2). Florian Plöchl legte mit seiner Dissertation: "Neue Anwendungsformen der dispersiven SPE in der pharmazeutischen Analytik" [56] und mit der Publikation "*Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood*" [63] den Grundstein für moderne Methodenkonzepte, da er die QuEChERS Methode erstmals im Arbeitskreis einsetzte. Martin Giera konnte mit seiner Dissertationsschrift: „Entwicklung neuer Testsysteme zur Charakterisierung von Enzym-Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese“ [1] und dem Artikel „*Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway*“ [2] die Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion im Arbeitskreis etablieren. Beide setzten bereits erfolgreich die dispersive Festphasenextraktion ein.



Unter dem Begriff Methodenkonzepte verbirgt sich eine bestimmte Herangehensweise, wie man Analyten aus verschiedenen Matrices bestimmen kann. Dabei werden verschiedene Prinzipien der Probenvorbereitung in einer bestimmten Reihenfolge kombiniert.

In den zwei nachfolgenden Kapiteln 3.2 und 3.3 werden moderne Probenvorbereitungen bzw. Methodenkonzepte vorgestellt, die eine leistungsfähige, hochselektive und –sensitive Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) unumgänglich machen, da die Analysen mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und GC-Kopplung nicht möglich wären mit dem im folgenden verwendeten „aufgereinigten“ Extrakten. Durch den Einsatz der GC-MS und der neu entwickelten Methodenkonzepte können die analytischen Kriterien der 6 Ss nach Fred McLafferty erfüllt werden. Die im nachfolgenden vorgestellten Erbenbisse zeigen, dass sehr geringe Mengen an Analyt (Entspricht: einem Stückchen Würfelzucker im Stausee) eindeutig bestimmt werden können. Die Analytik von solchen Stoffen, in diesem Fall Nikotin, wäre in dieser Matrix (Schokolade) und in dieser Konzentration (ng/kg) vor ein paar Jahren noch schwer zu bewerkstelligen gewesen. Mit der hier vorgestellten Methode ist es jedoch „ein Kinderspiel“ (Kapitel 3.2.2). Das Methodenkonzept in Kapitel 3.3 ermöglicht es eine Vielzahl an Proben an einem Tag analysieren zu können, auch das wäre vor Jahren nicht möglich gewesen.

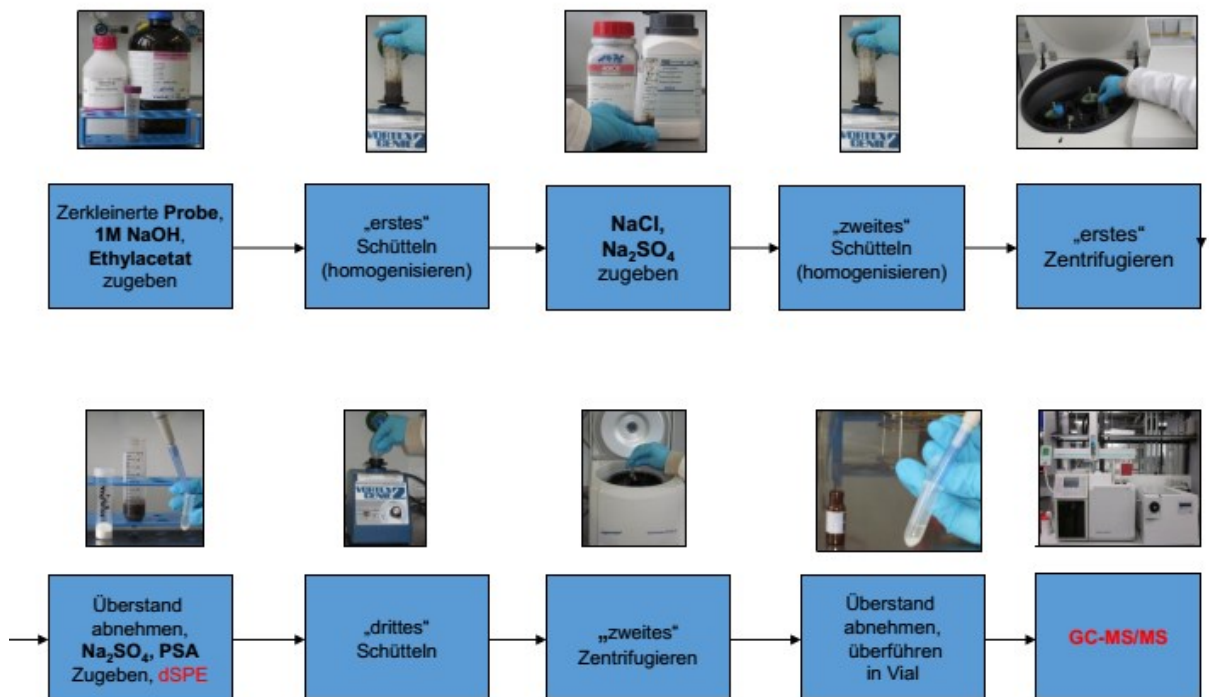
#### VORSTELLUNG DER VERWENDETEN METHODENKONZEPTE IN DIESEM KAPITEL:

- **QuEChERS**

Das Wort QuEChERS ist ein Kunstwort, welches für *quick, easy, cheap, effective, rugged* und *safe* steht. Die sich dahinter verbergende Aufarbeitungsmethode ist sowohl für die LC als auch für die GC gleichermaßen anwendbar. Steven Lehotay und Michelangelo Anastassiades entwickelten ca. 2003 maßgeblich dieses Konzept [64].

Im Grunde handelte es sich dabei nur um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), kombiniert mit einer dSPE. Durch den Zusatz von Salzen (v.a. Magnesiumsulfat, Natriumsulfat, Magnesiumchlorid und Natriumchlorid) zur Matrix und anschließende Homogenisierung wird die Ionenstärke erhöht und eine bessere Phasentrennung erreicht (Abbildung 25). Als Extraktionsmittel kommen zuweilen Acetonitril, Aceton oder Ethylacetat zum Einsatz. Zusätze, um ein bestimmtes pH-Millieu zu schaffen, sind manchmal von Vorteil bzw. erforderlich (vgl. Kapitel 3.2). Die dispersive Festphasenextraktion (dSPE) dient nur der Aufreinigung des Extraktes. Dabei kommen im Grunde die gleichen Sorbentien (funktionalisiertes Kieselgel) wie bei der SPE zum Einsatz, jedoch wird das dSPE-Material direkt in Pulverform dem Extrakt zugeführt. Abbildung 25 zeigt PSA als dSPE-Material. PSA ist ein mit primären und sekundären Aminogruppen funktionalisiertes Kieselgel, welches die Aufgabe hat Fettsäuren und andere hydrophile Substanzen zu binden. Der aufgereinigte Extrakt (Verunreinigungen werden vom dSPE-Material gebunden) wird zuletzt mittels Zentrifugation vom dSPE-Material befreit bevor er der GC- oder LC-Analyse zugänglich ist. Das Konzept kommt v.a. in der Pestizidanalytik von

Lebensmitteln zum Einsatz, Florian Pözl konnte das Konzept auf die Analyse von Arzneistoffen in Vollblut ausdehnen [63, 65].



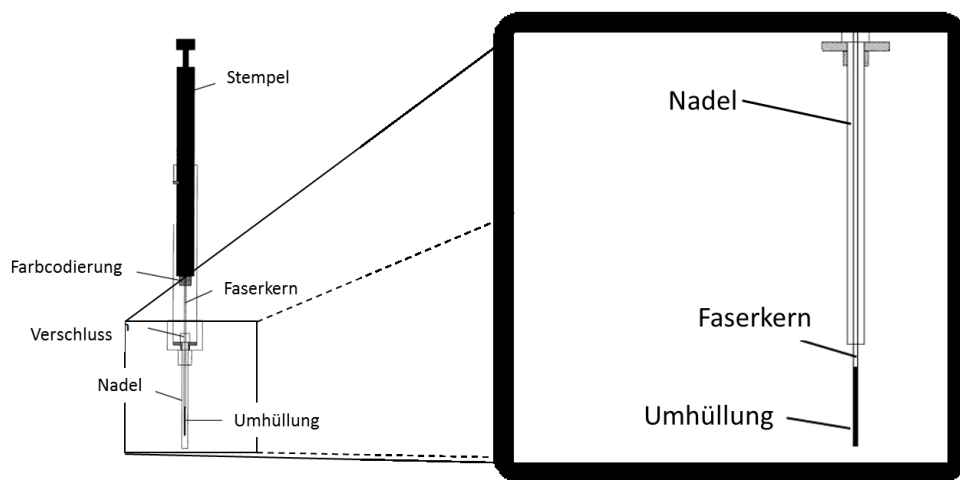
**Abbildung 25:** Methodenkonzept QuEChERS: einzelne Aufarbeitungsschritte und eingesetzte Reagenzien für die Bestimmung von Nikotin in Steinpilzen

## • SPME

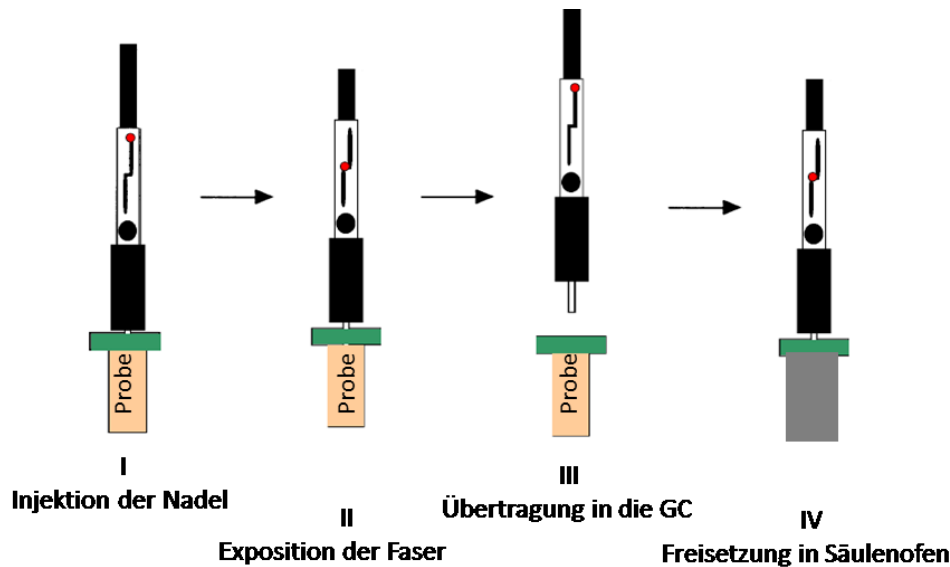
Unter dem Begriff SPME verbirgt sich der Begriff der Festphasenmikroextraktion (engl. *solid phase micro extraction*). Diese Methode wurde von Janusz Pawliszyn entwickelt und 1990 erstmals vorgestellt [66]. Die Technik musste jedoch noch weiter ausgearbeitet werden um sie einem breiten Anwendungsfeld zur Verfügung stellen zu können. Erst Anfang des neuen Jahrhunderts waren die Entwicklungen bzgl. Software (Implementierung in bestehende Computerprogramme) und Hardware (Vollautomatisierung) abgeschlossen. Der einzige lizenzierte Faser-Hersteller ist die Firma Supelco® (Bellafonte, USA).

Wie schon der Name verrät, gibt es einige Ähnlichkeiten zur Festphasenextraktion (SPE, engl. *solid phase extraction*). In beiden Trenntechniken kommt es zur Anlagerung von Substanzen auf einem adsorptiven Material. Bei der SPE kann der Analyt auf der SPE-Kartusche angereichert werden und so die Begleitstoffe (Verunreinigung) entfernt werden. Jedoch ist es auch möglich, dass man den Extrakt durch gezielte Anreicherung der Begleitstoffe auf der Kartusche aufreinigt, dabei kommt es nicht zur Anreicherung des Analyten, da der Analyt nicht vom SPE-Material retardiert wird. Bei der SPME soll nur die Anreicherung des Analyten

auf der Faser, stattfinden die sich in einer Nadel befindet (Abbildung 26: Aufbau einer SPME-Faser; aus Masterarbeit Florian Vetter [J]). Für die Anreicherung des Analyten auf der Faser (Umhüllung) stehen mittlerweile ca. 10 funktionalisierte Kieselgel-Materialien zur Verfügung. Der Vorteil der SPME-Technik ist, dass sie kein Lösungsmittel benötigt und zudem vollautomatisierbar ist, was die Technik vereinfacht und somit Kosten und Zeit spart (vgl. Kapitel 3) [67]. Die Anreicherung eines Analyten kann an der ausgefahrenen Faser (Exposition, Abbildung 27 aus Masterarbeit Florian Vetter [78]) im Dampfraum (engl. *head space*, HS) oder in einer Flüssigkeit (engl. *direct immersion*) erfolgen [68]. Die Dampfraum-Analyse ist nur für leicht- bis mittelflüchtige Verbindungen geeignet, nichtflüchtige Matrixbestandteile stören somit die Analyse nicht. Die Analyse erfolgt dann entweder durch Thermodesorption im Liner der GC oder durch Herunterwaschen des Analyten von der Faser mit einem Fließmittel für die LC.



**Abbildung 26:** Aufbau einer SPME-Faser; aus Masterarbeit Florian Vetter [69]



**Abbildung 27:** Ablauf der Mikroextraktion; aus Masterarbeit Florian Vetter [69]

- **Mikro-LLE**

Die Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. *micro-liquid-liquid extraction*) ist im Grunde eine normale Flüssig-Flüssig-Extraktion, allerdings mit dem Unterschied, dass Kleinstmengen an Flüssigkeiten (< 1 mL) eingesetzt werden. Durch die stetige Verbesserung von leistungsfähigen und sensitiven Analysengeräten ist es möglich geworden, aus einem kleinen Probenvolumen die gewünschten Analyten dennoch nachzuweisen. Ein hoher Aufkonzentrierungsgrad ist daher nicht mehr notwendig. Durch die Mikro-LLE, welche als Teil der Miniaturisierung gesehen werden kann, können zum einen Verbrauchsmaterialien und Lösungsmittel gespart werden und zum anderen Arbeitszeit pro Probe, sprich ein höherer Probendurchsatz ist möglich. Erst durch die Mikro-LLE ist die dSPE sehr praktikabel geworden, da nur eine Zentrifuge für die Aufarbeitung benötigt wird und alle Schritte in Mikroraktionsgefäßen stattfinden können. Da die Analytkonzentration nach einer Mikro-LLE meist sehr gering ist, kommen meist sehr leistungsfähige Analysengeräte zum Einsatz (z.B. MS)

## ZUSAMMENFASSUNG

Komplexe Matrices und Analyten sowie ein steigender Anspruch an die Methoden selbst (z.B. LOD, LOQ, Probendurchsatz, Minimierung von Matrixeffekten) machen die Entwicklung von neuen, leistungsfähigen Probenvorbereitungen und Methodenkonzepten unumgänglich. Durch die Einführung der SPME-Technik im Arbeitskreis und durch die Erweiterung der Mikro-LLE auf Organe, in diesem Fall Leber, konnten die analytischen Möglichkeiten im Arbeitskreis deutlich erweitert werden.

## 3.2 Bestimmung von Tabakalkaloiden in komplexen Matrices

### 3.2.1 Einleitung

Die Analyse von Nikotin in pflanzlicher Matrix und Speisepilzen war bereits Thema meiner Diplomarbeit [70]. Auf dieser Arbeit basiert der nachfolgend zusammengefasste Artikel, der zur Hinführung auf das Kapitel 3.2.2 dienen soll. Dieser Artikel war der Grundstein für die Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Elmar Richter vom Walther-Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie München. Daraus resultierte zum größten Teil Kapitel 3.2.2 sowie die gesamte Masterarbeit von Florian Vetter. Zudem begründet der Artikel, warum die *anolyte protectants* Wirkung von Ergosterol und Nikotinamid am Analyten Nikotin in Kapitel 2 untersucht wurde.

**Müller C, Bracher F, Plössl F.** Determination of nicotine in dried mushrooms by using a modified QuEChERS approach and GC-MS-MS. *Chromatographia* 2011;73:807-11.

Nikotin, das Hauptalkaloid der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) wurde Anfang des letzten Jahrhunderts als Pflanzenschutzmittel eingesetzt, zumal es leicht und billig aus der Tabakpflanze extrahiert werden konnte. Auch in anderen Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) kann Nikotin nachgewiesen werden, jedoch in deutlich niedrigeren Konzentrationen. So enthält z.B. die Tomate eine Nikotin-Konzentration von 0,055 mg/kg (Trockengewicht), dem gegenüber steht ein Gehalt von 70.000 mg/kg (Trockengewicht) in der Tabakpflanze. Es ist bekannt, dass auch andere Pflanzen in sehr niedrigen Konzentrationen Nikotin enthalten können, z.B. der Blumenkohl (*Brassica oleracea*), der zur Familie der *Brassicaceae* gehört. Der Einsatz von Nikotin als Pflanzenschutzmittel ist EU-weit verboten, da schon geringste Dosen zu Vergiftungen führen und 50 mg peroral eingenommen tödlich sind.

Heutzutage werden besser wirkende, synthetisch hergestellte Analoga des Nikotins eingesetzt, da der Einsatz von Nikotin als obsolet gilt und die Anwendung von Nikotin als Pestizid zudem verboten ist. Moderne Analysenkonzepte sind daher in der Regel nicht mehr auf das Erfassen von Nikotin ausgelegt. Aktuelle Analysenmethoden können bis zu 200 verschiedene Pestizide mit einem Aufarbeitungsprotokoll in einem Lauf erfassen (sogenannte Multimethoden). Der Vorteil dieser Methoden liegt in ihrer Selektivität und Sensitivität, welche dem MRM-mode des Massenspektrometers geschuldet ist, jedoch mit dem Nachteil, dass sie für andere Pestizide, in dem Fall für Nikotin, „blind“ sind (vgl. 3.2.2).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) konnte 2006 Nikotin, welches damals illegal als Insektizid in den Tierställen eingesetzt wurde, in Hühnereiern nachweisen. Viel überraschender war es, dass Ende 2008 das BfR Nikotin auch in getrockneten Speisepilzen gefunden hat. Eine eindeutige Klärung des Befundes gab es nicht. Ob Nikotin in diesem Fall als Kontamination, Pestizid oder als Pflanzeninhaltsstoff angesehen werden muss, war unklar. Es wurden Proben mit einer bis zur 100-fachen Grenzwertüberschreitung (Grenzwert: 0,09 mg/kg Trockengewicht) vom BfR gemessen, folglich waren fast alle getrockneten Pilze nicht verkehrsfähig. Davon betroffen waren vor allem getrocknete Steinpilze aus China. Geringere Konzentrationen, jedoch immer noch über dem geltenden Grenzwert, wurden auch in anderen Pilzen aus anderen Herkunftsländern gefunden [71, 72]. Handelt es sich jedoch um natürliche Pflanzeninhaltsstoffe gelten die festgesetzten Grenzwerte nicht, da diese nur für Kontaminationen oder Pestizideinsatz gelten. Lebensmittel können also im Handel bleiben, trotz Grenzwertüberschreitung eines Bestandteils, solange dieser als natürlicher Inhaltsstoff bekannt ist, jedoch sollten auch diese Inhaltsstoffe kontrolliert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass es keine modernen Analysenmethoden für die Bestimmung des Nikotins in Pilzen gibt und dass es unklar war/ist woher das gefundene Nikotin stammt, wurde von mir eine leistungsfähige GC-MS/MS Methode im MRM-*mode* erarbeitet. Durch Abänderung der QuEChERS-Aufarbeitung, Quellen mit Natronlauge, Verwendung von Ethylacetat anstatt dem gängigeren Acetonitril und Optimierung der Salzmenge und -art, gelang es, Nikotin weit unter dem geltenden Grenzwert von 0,09 mg/kg zu detektieren (LOD 0,006 mg/kg). Die Bestimmungsgrenze (LOQ) lag bei 0,020 mg/kg. Der Arbeitsbereich der Methode lag bei 0,02-10,00 mg/kg, mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,9998. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate war annähernd 100%, die Methodenpräzision und Gerätepräzision konnte mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von 6% bzw. 3% bestimmt werden.

Mit dieser Methode wurden anschließend verschiedene getrocknete Pilzproben untersucht. In acht gekauften Steinpilzproben konnte Nikotin in einer Konzentration von 0,03 – 3,30 mg/kg gefunden werden, in zwei selbst gesammelten Steinpilzproben konnte kein Nikotin nachgewiesen werden. In weiteren 69 gesammelten Wildpilzproben konnte in 23 Proben kein Nikotin nachgewiesen werden. In 46 Proben war schließlich Nikotin nachweisbar (Gehalt lag zwischen LOD und LOQ). Davon konnten 15 Proben auch quantifiziert werden. Die gefundenen Konzentrationen lagen jedoch unter dem geltenden Grenzwert (0,020 – 0,056 mg/kg).

Die Methode ist somit bestens für die Bestimmung von Nikotin in getrockneten Pilzen geeignet. Die Herkunft des Nikotins bleibt weiter unklar. Meine Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass es eine hohe Belastung bei gekauften und eine niedrige Belastung bei selbst gesammelten Pilzen gibt. Die Frage, ob Nikotin als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wurde oder nicht, bleibt ungeklärt, ebenso die Frage ob Nikotin ein natürlicher Pflanzeninhaltsstoff von Pilzen ist.

Bis zur endgültigen Klärung des Problems wurde am 25.08.2010 von der EU ein vorübergehender Grenzwert von 1,2 mg/kg (Trockengewicht) in Wildpilzen und von 2,3 mg/kg (Trockengewicht) in Steinpilzen festgelegt [73].

### 3.2.2 Methodenkonzept: Festphasenmikroextraktion

*Müller C, Vetter F, Richter E, Bracher F. Determination of caffeine, myosmine, and nicotine in chocolate by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Food Science 2014;79:251-55.*

#### 3.2.2.1 Zusammenfassung

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elmar Richter zeigten, dass die Alkaloide Nikotin und Myosmin (beides Tabakalkaloide) in Futtermitteln vorkommen und sich in der Kuh in Horn, Pansensaft, Plasma und Urin anreichern. Durch die Messung im MRM-mode (folglich „blind“ für andere Analyten) konnte Myosmin ebenfalls in Kuhmilch und Schokolade nachgewiesen werden [74], daher konnte kein Nikotin erfasst werden. Da Myosmin hauptsächlich als Nebenalkaloid des Nikotins auftritt, stellte sich anfänglich die Frage, ob auch in Milch, Milchprodukten und Schokolade (v.a. Milkschokolade) Nikotin gefunden werden kann.

Die entwickelte Methode von Tyroller et al. [74] (ehemaliger Mitarbeiter von Herrn Prof. Dr. Richter) war zwar praktikabel, jedoch wurde sie den Kriterien der 6 Ss (vgl. Kapitel 3) nur schwer gerecht, da viele Aufarbeitungsschritte, ein hoher Zeitaufwand und die Verwendung eines chlorierten Lösungsmittels (Dichlormethan) nötig war. Die Methode verwendete nach Aufschluss der Matrix (Gemüse, Milch und Obst) entweder die SPE-Technik oder die präparative Dünnschichtchromatographie (DC) zur Aufreinigung/Anreicherung des Analyten, gefolgt von einer GC-MS Analyse. Herr Prof. Dr. Richter wandte sich nach Veröffentlichung des in Kapitel 3.2.1 geschilderten Artikels an uns wegen der Entwicklung einer verbesserten Analysenmethode und zur Überprüfung, ob Nikotin in Milch und Milchprodukten vorkommt. Die Ergebnisse dazu finden sich in der von mir mitbetreuten Masterarbeit von Florian Vetter [69].

Eine einfache LLE, SLE (Fest-Flüssig-Extraktion; engl. *solid (supported) liquid extraction*) oder die QuEChERS-Methode, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, lieferten in Vorversuchen keine zufriedenstellenden Ergebnisse für die beiden Matrices Milch und Schokolade. Daher musste eine neue Möglichkeit gefunden werden, um Nikotin möglichst einfach analysierbar zu machen.

Die SPME-Technik erwies sich als am besten geeignet, da sie ohne große Aufarbeitungsschritte auskommt und die Analyten flüchtig sind. Die neu entwickelte SPME-Methode funktionierte bereits alleine nach Alkalisierung der Probe [70] und Salzzugabe (Natriumcarbonat) zur Steigerung der Extraktionseffizienz. Die Methode wurde im Anschluss daran weiter optimiert bezgl. der SPME-Bedingungen (Temperatur, Equilibrierungszeit, Schüttelstärke), der Probemenge und der idealen Salzzugabe. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze konnte durch einen zusätzlichen Schritt ca. um den Faktor zehn gesenkt werden. Die Analyten werden zuerst im stark Sauren protoniert, damit sie sich besser in der wässrigen Phase lösen können. Durch Zentrifugation kommt es zur Trennung der



Matrix und der wässrigen Phase. Ein Aliquot (3,5 mL) der wässrigen Phase wird entnommen, neutralisiert und in ein Headspace-Vial geben, welches 3,5 g Natriumcarbonat enthält. Die Probe wird anschließend vollautomatisch mit der SPME-Technik und GC-MS/MS analysiert.

Die Analyten Coffein, Myosmin und Nikotin sind bekannte Pflanzeninhaltsstoffe. Sie kommen in diversen Pflanzen verschiedenster Familien vor und gelten als bioaktiv. Coffein regt das zentrale Nervensystem an, wirkt am Herzen positiv inotrop, positiv chronotrop, an den Bronchien dilatorisch und regt die Magensäuresekretion an [7]. Zwar besitzt Coffein Suchtpotential, welches durch körperliche Abhängigkeit und Entzugssymptome (z.B. Kopfschmerzen, Müdigkeit) geprägt ist, dennoch schadet es dem gesunden Menschen auch unter Langzeitanwendung nicht [7, 75]. Myosmin wirkt vasokonstriktorisch, schädigt die Fruchtbarkeit und wirkt karzinogen [74]. Nikotin wirkt ebenfalls vasokonstriktorisch, sowie hypertonisch und psychomotorisch [7]. Im Gegensatz zu Coffein besitzt es eine hohe Toxizität und ein hohes Suchtpotential, weswegen für Nikotin festgeschriebene MRL-Werte für Lebensmittel existieren (vgl. Kapitel 3.2.1) [71]. Diese Werte sind nur gültig, wenn Nikotin durch Kontamination oder als Pestizid in das Lebensmittel gelangt ist (vgl. Kapitel 3.3.1). Handelt es sich jedoch um einen natürlichen Pflanzeninhaltsstoff dürfen die Werte auch den Grenzwert überschreiten, sollen aber kontrolliert werden.

In erschlossenen/bevölkerten Gebieten gelten v.a. Coffein und Nikotin als ubiquitär vorhanden, da sie vom Menschen in verschiedenster Form (Arzneistoffe, Lebensmittel, Tabakwaren) aufgenommen und wieder ausgeschieden werden. So konnte z.B. eine spanische Forschergruppe Nikotin in spanischen Mineralwassern nachweisen [76]. Beide Stoffe können als Indikatoren für den menschlichen Eingriff ins bzw. für die Verschmutzung des Ökosystems angesehen werden.

Die Analyse von Coffein oder Nikotin mit HS-SPME-GC-MS ist bereits mehrfach beschrieben. Nikotin wurde in Urin von rauchenden Müttern und Coffein aus verschiedenen wässrigen Matrices (z.B. Getränke, Speichel, Urin) bestimmt [77, 78]. Aber es ist bisher keine Methode oder Technik beschrieben, die alle drei Analyten auf einmal erfasst, geschweige in den schwierigen Matrices Milch und Schokolade. Die Masterarbeit von Florian Vetter beschäftigt sich hauptsächlich mit der Entwicklung einer SPME-Methode und der Bestimmung von Nikotin in Milch und Sahne, sowie von Schokolade [69]. Der Artikel in Kapitel 3.2.2.2 befasst sich ausschließlich mit der Matrix Schokolade, da dort nennenswerte Mengen an Nikotin gefunden wurden.

Eine weitere Herausforderung für die Methodenentwicklung war der große Konzentrationsunterschied der Analyten im Bereich von mg/kg für Coffein und von ng/kg für Myosmin und Nikotin (Faktor 100.000). Da keine unbelastete Probe zur Verfügung stand und die Herstellung von artifizieller Schokolade schwierig ist, wurden deuterierte Referenzsubstanzen verwendet, um der SANCO-Richtlinie und den auftretenden Matrixeffekten gerecht zu werden (vgl. Kapitel 2) [54]. Trotz der aufgeführten Schwierigkeiten konnte eine leistungsfähige Methode mit sehr niedrigen LOD und LOQ nach DIN 32645 [79], berechnet aus der Kalibriergeraden, erarbeitet werden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate

für alle drei Analyten bei drei unterschiedlichen Konzentrationen lag bei 94,1 % ( $n = 9$ ) (vgl. Kapitel 3.2.2.2, im Artikel Tabelle 2).

Neben der Methodenentwicklung und Validierung stand das Vermessen von Proben im Mittelpunkt. Insgesamt wurden 30 Schokoladenproben von 5 verschiedenen Herstellern untersucht. Der Kakaogehalt variierte von 30 % (Vollmilchschokolade) bis zu 99 % (Bitterschokolade). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung und unter Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls (siehe Kapitel 3.2.2.2, im Artikel Grafik 1 und 2) angegeben, da die Angabe einer Standardabweichung bei  $n = 3$  Messungen keine Aussagekraft besitzt [80]. Der durchschnittliche Coffeingehalt lag bei 1640 mg/kg (420-2780 mg/kg). Eine Korrelation zwischen steigendem Coffeingehalt und Kakaogehalt konnte mit Hilfe einer Spearman-Korrelation eindeutig nachgewiesen werden ( $r_s = 0,9158$ ). In allen Proben konnte ebenfalls Nikotin in einem Konzentrationsbereich von 230-1590 ng/kg (durchschnittlich 645 ng/kg) ermittelt werden. Die Korrelation zwischen steigendem Kakaogehalt und Nikotingehalt war nur mäßig ( $r_s = 0,5634$ ), ein Zusammenhang zwischen steigendem Coffein- und Nikotingehalt war schwach ( $r_s = 0,3588$ ). Eine deutliche Korrelation wäre hier von Vorteil gewesen, da man durch die wesentlich einfachere Analyse von Coffein Rückschlüsse auf den Nikotingehalt hätte ziehen können. Myosmin konnte in keiner Probe nachgewiesen werden, dies steht im Widerspruch zu den oben aufgeführten früheren Ergebnissen von Tyroller et al. [74]. Die verschiedenen gemessenen Coffeingehalte stimmen mit literaturbekannten Werten weitestgehend überein.

Mit dieser Methode konnte zum ersten Mal Nikotin eindeutig in Schokolade gefunden und quantifiziert werden. Da die Höchstwerte nur ein Sechstel des geltenden MRL von 0,01 mg/kg betragen, sind untersuchten die Schokoladen als voll verkehrsfähig einzustufen, auch wenn der Grund der Belastung unklar ist. Die von derart „belasteter“ Schokoladen ausgehende Gesundheitsgefahr ist als (sehr) gering einzustufen.

## 3.2.2.2 Artikel

# Determination of Caffeine, Myosmine, and Nicotine in Chocolate by Headspace Solid–Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

Christoph Müller, Florian Vetter, Elmar Richter, and Franz Bracher

**Abstract:** The occurrence of the bioactive components caffeine (xanthine alkaloid), myosmine and nicotine (pyridine alkaloids) in different edibles and plants is well known, but the content of myosmine and nicotine is still ambiguous in milk/dark chocolate. Therefore, a sensitive method for determination of these components was established, a simple separation of the dissolved analytes from the matrix, followed by headspace solid–phase microextraction coupled with gas chromatography–tandem mass spectrometry (HS–SPME–GC–MS/MS). This is the first approach for simultaneous determination of caffeine, myosmine, and nicotine with a convenient SPME technique. Calibration curves were linear for the xanthine alkaloid (250 to 3000 mg/kg) and the pyridine alkaloids (0.000125 to 0.003000 mg/kg). Residuals of the calibration curves were lower than 15%, hence the limits of detection were set as the lowest points of the calibration curves. The limits of detection calculated from linearity data were for caffeine 216 mg/kg, for myosmine 0.000110 mg/kg, and for nicotine 0.000120 mg/kg. Thirty samples of 5 chocolate brands with varying cocoa contents (30% to 99%) were analyzed in triplicate. Caffeine and nicotine were detected in all samples of chocolate, whereas myosmine was not present in any sample. The caffeine content ranged from 420 to 2780 mg/kg (relative standard deviation 0.1 to 11.5%) and nicotine from 0.000230 to 0.001590 mg/kg (RSD 2.0 to 22.1%).

**Keywords:** caffeine, chocolate, myosmine, nicotine, solid-phase microextraction

**Practical Application:** We worked out a method for simultaneous determination of the alkaloids caffeine, myosmine and nicotine in the complex matrix chocolate using modern sample preparation and chromatographic techniques. This method allows the determination of the bioactive compounds in spite of the strongly different ranges for caffeine (420 to 2780 mg/kg) and for myosmine (below limit of detection) and nicotine (0.000230 to 0.001590 mg/kg). The content of caffeine and of the hitherto undetected nicotine correlated with the content of cocoa (30 to 99%) in the chocolate brands.

## Introduction

Caffeine is a natural xanthine alkaloid which is mostly associated with coffee from *Coffea arabica* (Rubiaceae), tea from *Thea sinensis* (Theaceae), and cocoa from *Theobroma cacao* (Malvaceae) (Graham 1976; Zoumas and others 1980), but more than 60 other plant species contain caffeine (Barone and Roberts 1996; Bradley and others 2007). Nicotine is the major pyridine alkaloid of tobacco plants, *Nicotiana spp.* (Solanaceae) and is widely distributed at lower concentrations in the plant kingdom (Dawson and Solt 1960; European Food Safety Authority 2011; Müller and others 2011). Recently, the minor tobacco pyridine alkaloid myosmine has been found in peanuts, *Arachis hypogaea* (Aeschynomeneae) (Zwickenpflug and others 1998). Tyroller (2002) detected new sources of dietary myosmine uptake in milk (3.5% fat), cream (30%

fat), and cocoa. Sheen (1988) did not detect nicotine above the detection limit of 1 mg/kg in chocolate chips and cocoa powder.

Nicotine and its major metabolite cotinine as well as caffeine have also been used as indicators for the human pollution in wastewater-impacted ecosystems (Benotti and Brownawell 2007; Bradley and others 2007; Buerge and others 2008). However, nicotine was also detected in bottled mineral water from springs which are not expected to be contaminated by humans (González Alonso and others 2012). The pyridine alkaloids are also used for determination of human exposure to environmental tobacco smoke (ETS) which is potentially carcinogenic (Int. Agency for Research of Cancer 2004; Jenkins and others 1996). In contrast, caffeine has *in vivo* only a stimulant effect and no negative consequences for healthy adults (Rudolph and others 2012; Shin and others 2002). Long-term and low-dose consumption of these bioactive components may lead to toxicological effects especially for children and pregnant women. The different sources, regardless of origin, natural or through contamination, the content of such alkaloids should be known and monitored.

The analysis of pharmaceuticals in water, caffeine, and nicotine included (Benotti and Brownawell 2007; Huerta-Fontela and others 2007), and the determination of caffeine from cocoa and

MS 20131207 Submitted 8/26/2013, Accepted 11/15/2013. Authors Müller, Vetter, and Bracher are with Dept. of Pharmacy, Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-Universität, Butenandstr. 5-13, D-81377, Munich, Germany. Author Richter is with Dept. of Toxicology, Walther Straub Inst., Ludwig-Maximilians-Universität, Nussbaumstr. 26, D-80336, Munich, Germany. Direct inquiries to author Müller (E-mail: christoph.mueller@cup.uni-muenchen.de).

© 2014 Institute of Food Technologists®  
doi: 10.1111/1750-3841.12339  
Further reproduction without permission is prohibited

Vol. 00, Nr. 0, 2014 • Journal of Food Science T1

**Table 1**–MS/MS acquisition parameters for the alkaloids. Precursor and product ion with (\*) were used for quantification.

Analyte	Segment	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)	Relative intensity
(±)–Nicotine	1 (6.5–7.5 min)	133	118	–20.0	0.33
		84*	82*	–5.0	1.00
(±)–Nicotine–d <sub>3</sub>		136	118	–20.0	0.33
		87*	85*	–5.0	1.00
Myosmine	2 (7.5–9.0 min)	146*	145*	–5.0	1.00
		118	78	–25.0	0.14
Myosmine–d <sub>4</sub>		150*	149*	–5.0	1.00
		122	82	–25.0	0.14
Caffeine	3 (9.0–12.0 min)	194*	109*	–20.0	1.00
		109	82	–5.0	0.56
Caffeine–d <sub>3</sub>		197*	109*	–20.0	1.00
		109	82	–5.0	0.56

chocolate extracts (Graham 1976; Zoumas and others 1980; Risner 2008; Rudolph and others 2012) are well described with different liquid chromatography approaches. The determination of volatile xanthine and pyridine alkaloids using different SPME approaches were mostly described in fluids (Hawthorne and others 1992; Yang and others 1997; Brčić Karačonji and others 2007).

The aim of this project was to confirm or to rebut the content of pyridine alkaloids in chocolate because, as mentioned above, the content in chocolate is still ambiguous. This work is a continuation of our area of research (Zwickenpflug and others 1998; Tyroller and others 2002; Müller and others 2011). Analytical methods for simultaneous determination of partly addictive and bioactive stimulants caffeine, myosmine, and nicotine in such a complex matrix have not been described so far in the literature. The present method only requires dispersing the melted chocolate in dilute hydrochloric acid, followed by a centrifugation step for phase separation prior to alkalization and fully automatic HS-SPME with highly sensitive and specific GC-MS/MS.

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

Deionized and distilled water was self-prepared. Caffeine (purity > 99%), myosmine (purity > 98%) and (±)–nicotine (purity > 99%) were purchased from Sigma Aldrich (Schnelldorf, Germany). Caffeine–d<sub>3</sub> (1–methyl–d<sub>3</sub>; 99.8 atom % D, purity > 99%), myosmine–2,4,5,6–d<sub>4</sub> (pyridine–d<sub>3</sub>; 98.5 atom % D, purity > 98%), and (±)–nicotine–d<sub>3</sub> (N–methyl–d<sub>3</sub>; 99.8 atom % D, purity > 99%) were obtained from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). The compounds were dissolved in deionized and distilled water, 25 mg/mL for the xanthine alkaloids and 100 ng/mL for the pyridine alkaloids. The stock solutions were stored at –20 °C.

### Sample preparation

Thirty different chocolates from 5 manufacturers with varying content of cocoa (30% to 99%) were bought at local supermarkets. The chocolate was melted in a laboratory drying cabinet from WTB Binder Labortechnik (Tuttlingen, Germany). The mixing step was carried out on a Vortex Genie 2 from Scientific Apparatus (Bohemia, N.Y., U.S.A.) and a centrifuge from Heraeus/Kendro Megafuge 1.0R (Berlin, Germany) was used.

For analysis, 5.0 g (±0.2 g) chopped chocolate was weighed into a 15 mL plastic centrifuge tube. The samples were spiked with the deuterated analytes (2.5 ng pyridine alkaloids, 1.25 mg xanthine alkaloid), and deionized and distilled water was added to obtain a volume of 5 mL. Two milliliters of hydrochloric acid (2 mol/L)

were added. The sample was melted at 80 °C for 20 min, vortexed and shaken for 2 min. For phase separation, the sample was centrifuged at 3000 × g for 10 min. Then 3.5 mL of the aqueous supernatant (protonated analytes included) were transferred into a 20 mL headspace vial, then 1.5 mL sodium hydroxide solution (2 mol/L) and 3.5 g potassium carbonate added to deliver the free alkaloids (Müller and others 2011) and to improve extraction efficiency (Brčić Karačonji and others 2007). The vial was closed tightly and after vortexing for 1 min placed into the autosampler.

### Solid-phase extraction and analysis

The headspace vial was rotated in the Agitator (CTC Analytics; Zwingen, Switzerland) at 400 rpm and 80 °C for 5 min (sample preincubation time). A StableFlex® polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) SPME fiber from Supelco Inc. (Bellefonte, Pa., U.S.A.) with 65 µm coating was exposed to the headspace over the aqueous sample for 40 min. After extraction the samples were analyzed with a Varian 1200 triple quadrupole mass spectrometer coupled with a Varian 3800 gas chromatograph (Darmstadt, Germany), equipped with a CombiPal from CTC Analytics (Zwingen, Switzerland). The stationary phase was an Agilent VF–5ms capillary column 30 m × 0.25 mm inner diameter, 0.25 µm film thickness and 10 m EZ–Guard column (Darmstadt, Germany). The mobile phase was helium 5.0 (purity > 99.999%) at a constant flow rate of 1.3 mL/min. The desorption of analytes from the SPME fiber occurred at 270 °C splitless for 2 min in a Varian 1177 split/splitless injector. The GC parameters had the following settings: initial GC oven temperature 70 °C for 2 min, then ramped at 20 °C/min up to 240 °C, followed by an increase of 50 °C/min to 310 °C (2 min hold). The total GC run time was 13.9 min; MS transfer line 250 °C, ion source temperature 200 °C, manifold temperature 40 °C, electron-impact 70 eV. The triple quadrupole mass spectrometer was operated in multi-reaction monitoring (MRM) mode (Table 1). Instrument control and data analysis were conducted with a Varian Workstation 6.9 SP 1. Nicotine was detected at 7.2 min, myosmine at 7.9 min, and caffeine at 10.3 min (Figure 1).

### Method validation

The detector responses of deuterated (labeled) and unlabeled (natural origin) alkaloids were identical, hence the deuterated standards were used for the method validation as spiked analytes to compensate the natural analyte background level because no alkaloid free matrix was available. All quantitative analyses were computed considering the response ratios between labeled and unlabeled analytes. For verification of selectivity, 10

## Caffeine and nicotine in chocolate...

different chocolates extracts were analyzed in MRM mode in the presence or absence of labeled analytes.

A blended bulk of chocolate extract was spiked with increasing amounts of caffeine- $d_3$  (250, 500, 750, 1000, 2000, 3000 mg/kg), myosmine- $d_4$ , nicotine- $d_3$  (each 0.000125, 0.000250, 0.000500, 0.001000, 0.001500, 0.003000 mg/kg), and fixed amounts of unlabeled alkaloids (xanthine alkaloid 250 mg/kg and pyridine alkaloids 0.000500 mg/kg). For generating the calibration curve the ratio of the integrated peak areas of the quantifier ions for labeled and unlabeled analytes were plotted versus the corresponding concentration (Yang and others 1997). The linearity of the approach was assessed according to the method of least squares and expressed by the coefficient of determination ( $R^2$ ) with 0.9891 for caffeine- $d_3$ , 0.9950 for myosmine- $d_4$ , and 0.9973 for nicotine- $d_3$ . The linearity was proven visually and mathematically with a Mandel test according to DIN 38402 (1986).

The limit of quantification (LOQ) was set as the lowest point of the calibration curve because all residuals were in the range (5% to 15%) according to SANCO/12495/2011 (2012) ( $\pm 20\%$ ) and no lower concentration had to be determined (Zheng and others 2013). The limit of detection (LOD,  $CC\beta$ ) was determined according to DIN 2008 and calculated with a statistical certainty of  $1 - \beta$  ( $\beta = 0.05$ ) (Plössl and others 2006). The LOD value, all calculated from linearity data, for caffeine- $d_3$  was 216 mg/kg, for myosmine- $d_4$  0.000110 mg/kg, and for nicotine- $d_3$  0.000120 mg/kg. A blended bulk of chocolate fortified with 3 different analyte levels was extracted and analyzed ( $n = 6$ ). The recovery

**Table 2**—Accuracy and precision data for the deuterated alkaloids at 3 representative concentrations: level 1: caffeine- $d_3$  250 mg/kg, myosmine- $d_4$  and nicotine- $d_3$  0.000250 mg/kg; level 2 caffeine- $d_3$  1000 mg/kg, myosmine- $d_4$  and nicotine- $d_3$  0.001000 mg/kg; level 3 caffeine- $d_3$  3000 mg/kg, myosmine- $d_4$  and nicotine- $d_3$  0.003000 mg/kg.

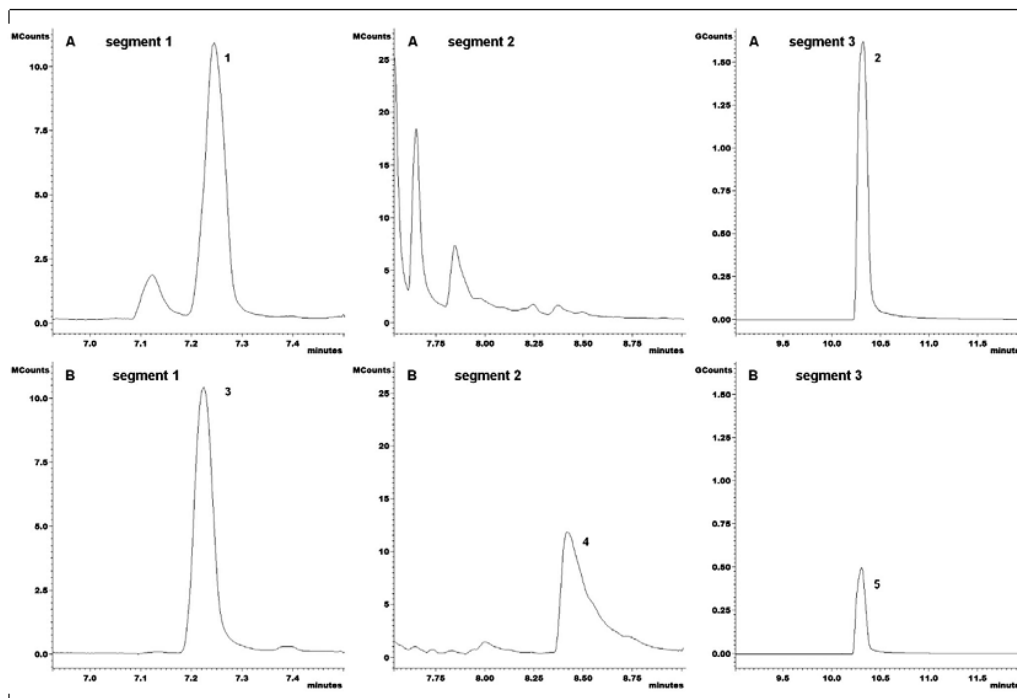
Analyte	Level 1	Level 2	Level 3
	Recovery (%) $\pm$ RSD ( $n = 6$ )	Recovery (%) $\pm$ RSD ( $n = 6$ )	Recovery (%) $\pm$ RSD ( $n = 6$ )
Caffeine- $d_3$	101.6 $\pm$ 2.3	98.5 $\pm$ 3.0	102.5 $\pm$ 4.2
Myosmine- $d_4$	80.3 $\pm$ 14.9	95.4 $\pm$ 14.2	96.6 $\pm$ 11.2
( $\pm$ )-Nicotine- $d_3$	84.4 $\pm$ 5.2	91.8 $\pm$ 6.7	95.6 $\pm$ 5.3

and the relative standard deviation (RSD) were calculated and are listed in Table 2.

## Results and Discussion

### Quantitative results

Blank sample analyses were arranged to determine carry-over effects from the fiber or cross-contamination from reagents and consumables. For distinct identification of the alkaloids 2 product ions (see Table 1) with a maximal  $\pm 20\%$  tolerance of ion intensities were used in combination with the retention time according to SANCO/12495/2011 (2012). All samples were analyzed in



**Figure 1**—Chromatograms of a chocolate sample, cacao content 70%. (A) quantifier ions of nicotine (segment 1, number 1), myosmine (segment 2, not detected) and caffeine (segment 3, number 2). (B) quantifier ions of ( $\pm$ )-nicotine- $d_3$  (segment 1, number 3), myosmine- $d_4$  (segment 2, number 4) and caffeine- $d_3$  (segment 3, number 5).



triplicate. The results were expressed as the mean value in milligrams per kilogram plus the 95% confidence interval ( $n = 3$ ) (Figure 2 and 3).

Caffeine and nicotine were detected in all 30 samples of chocolates. Whereas the presence of nicotine in chocolate was verified unequivocally for the first time, the minor tobacco alkaloid myosmine could not be detected within the level of the LOD of the present method. The average caffeine content was 1640 mg/kg (range: 420 to 2780 mg/kg) with a mean relative standard deviation (RSD) of 3.6% (range: 0.1% to 13.8%). The mean nicotine value was 0.000645 mg/kg (range: 0.000230 to 0.001590 mg/kg) with an average RSD of 11.5% (range: 2.0% to 22.1%).

#### Qualitative results

For interpretation of the qualitative results, the species of the cocoa plants, the habitat of the plants and the manufacturing process could play an important role and should be taken into account. However, this was not possible because no further classification was available from the chocolate brand labeling.

Generally, the concentration of caffeine increased with increasing content of cocoa (Spearman's  $r = 0.9158$ ,  $p < 0.0001$ ) and less so with nicotine ( $r = 0.5634$ ,  $p < 0.05$ ). There was no significant correlation between caffeine and nicotine content ( $r = 0.3588$ ,  $p = 0.0512$ ). The caffeine and nicotine contents were not dependent on other ingredients.

Caffeine contents are in the range of published data: Graham (1976) determined caffeine in cocoa beans from 700 to 17000 mg/kg, Risner (2008) detected in cocoa from 1500 to 2400 mg/kg, and Zoumas and others (1980) detected in milk chocolate 50 to 540 mg/kg caffeine and in sweet chocolate 170 to 1250 mg/kg. Only Rudolph (2012) reported approximately 10-fold lower concentrations of caffeine in chocolate (milk chocolate 17 mg/kg and dark chocolate 114 mg/kg). Nicotine is present in other dietary components at much higher concentrations than in chocolate. By regulation of the European Parliament (2011) nicotine residues in food should not exceed a maximum residual level (MRL) of 0.01 mg/kg, more than 6-fold higher than the maximum residue level found in a dark chocolate in this study.

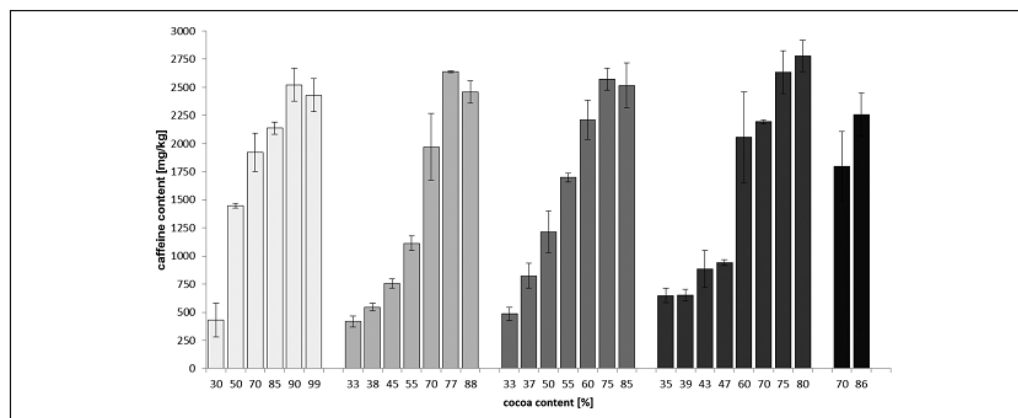


Figure 2—Caffeine content in relation to the percentage of cocoa in chocolate; different gray shades for different manufacturers ( $n = 5$ ), error bars show the 95% confidence interval of triplicate analyses of caffeine.

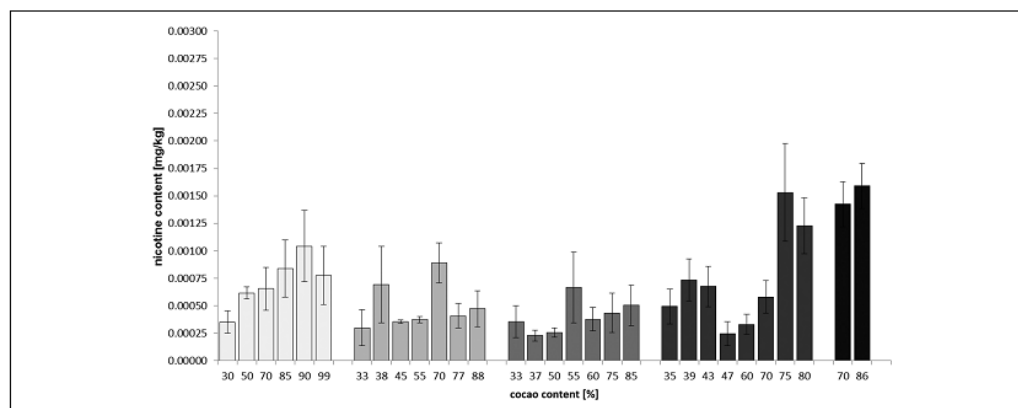


Figure 3—Nicotine content in relation to the percentage of cocoa in chocolate; different gray shades for different manufacturers ( $n = 5$ ), error bars show the 95% confidence interval of triplicate analyses of nicotine.

## Caffeine and nicotine in chocolate . . .

Due to recent findings of nicotine in mushrooms, tea, herbal infusions, spices, rose hips, and fresh herbs, the MRL has been raised to values between 0.03 and 4.0 mg/kg (European Food Safety Authority 2011; Commission Regulation (EC) No. 812/2011 of 10 August 2011 amending Annex III to Regulation (EC) No. 396/2005 2011). No MRL has been set for nicotine in edible nightshades such as tomatoes, potatoes, eggplants, and bell pepper (Siegmund and others 1999).

## Conclusions

The described HS-SPME-GC-MS/MS method allows simultaneous determination of the prominent alkaloids caffeine, myosmine, and nicotine in the complex matrix chocolate in spite of the strongly different concentrations of the single compounds. Sample preparation requires only centrifugation and one additional work-up step switching from acid to alkaline conditions before SPME. The method has satisfactory linearity, accuracy, and precision at a broad concentration range of the different analytes, respectively.

## Author Contributions

C. Müller designed the study, collected all test data, interpreted the results and drafted the manuscript. F. Vetter developed the HS-SPME-GC-MS/MS method for analysis of the alkaloids in chocolate. E. Richter had the idea of tobacco alkaloid analysis in food, he was further involved by interpreting the results (Spearman correlation) and by improving the manuscript. F. Bracher interpreted the results, drafted and improved the manuscript.

## References

- Barone JJ, Roberts HR. 1996. Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol* 34:119–29.
- Benotti MJ, Brownawell BJ. 2007. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ Sci Technol* 41:5795–802.
- Bradley PM, Barber LB, Kolpin DW, McMahon PB, Chapelle FH. 2007. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators. *Environ Toxicol Chem* 26:1116–21.
- Brčić Karačonji I, Skender L, Karačić V. 2007. Determination of nicotine and cotinine in urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography with mass spectrometric detection. *Acta Chim Slov* 54:74–8.
- Buerge IJ, Kahle M, Buser H-R, Müller MD, Poiger T. 2008. Nicotine derivatives in wastewater and surface waters: application as chemical markers for domestic wastewater. *Environ Sci Technol* 42:6354–60.
- Commission Regulation (EC) No. 812/2011 of 10 August 2011 amending Annex III to Regulation (EC) No. 396/2005 as regards maximum residue levels for dimethomorph, fluopicolide, mandipropamid, metrafenone, nicotine and spirotetramat in or on certain products. *Off J Eur Union* 208:1–22.
- Dawson RF, Solt ML, Christman DR. 1960. Nicotine and its botanical sources. *Ann N Y Acad Sci* 90:7–12.
- DIN 38402 Part 51, German standard methods for examination of water, waste water and sludge; general information (group A); calibration of analytical methods, evaluation of analytical results and linear calibration functions used to determine the performance characteristics of analytical methods (A 51); Beuth Verlag GmbH, Berlin, Germany 1986.
- DIN 32645, Chemical analysis—decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions—terms, methods, evaluation; Beuth Verlag GmbH, Berlin, Germany, 2008.
- European Food Safety Authority 2011. Setting of temporary MRLs for nicotine in tea, herbal infusions, spices, rose hips and fresh herbs. *EFSA J* 9:2098:1–50.
- González Alonso S, Valcárcel Y, Montero JC, Catalá M. 2012. Nicotine occurrence in bottled mineral water: analysis of 10 brands of water in Spain. *Sci Total Environ* 416:527–31.
- Graham DM. 1976. Caffeine—its identity, dietary sources, intake and biological effects. *Nutr Rev* 36:97–102.
- Hawthorne SB, Müller DJ, Pawliszyn J, Arthur CL. 1992. Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers. *J Chromatogr* 603:185–91.
- Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F. 2007. Ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters. *Anal Chem* 79:3821–9.
- IARC. 2004. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, tobacco smoke and involuntary smoking. Vol. 83. France: WHO Lyon.
- Jenkins RA, Palausky, MA, Counts RW, Guerin MR, Dindal AB, Bayne CK. 1996. Determination of personal exposure of non-smokers to environmental tobacco smoke in the United States. *Lung Cancer* 14:195–13.
- Müller C, Bracher F, Plössl F. 2011. Determination of nicotine in dried mushrooms by using a modified QuEChERS approach and GC–MS–MS. *Chromatographia* 73:807–11.
- Plössl F, Giera M, Bracher F. 2006. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J Chromatogr A* 1135:19–26.
- Risner CH. 2008. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (–)-epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and butter. *J Chromatogr Sci* 46:892–9.
- Rudolph E, Färbering A, Kötting J. 2012. Determination of the caffeine contents of various food items within the Austrian market and validation of a caffeine assessment tool (CAT). *Food Addit Contam Part A* 29:1849–60.
- SANCO, Document No. SANCO/12495/2011, Method validation and quality control procedures for pesticides analysis in food and feed, implemented by 01/01/2012.
- Sheen SJ. 1988. Detection of nicotine in foods and plant materials. *J Food Sci* 53:1572–3.
- Shin H-S, Kim J-G, Shin Y-J, Jee SH. 2002. Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in urine, plasma and saliva by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B* 769:177–83.
- Siegmund B, Leitner E, Pfannhauser W. 1999. Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *J Agric Food Chem* 47:3113–20.
- Tyroller S, Zwickenpflug W, Richter E. 2002. New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. *J Agric Food Chem* 50:4909–15.
- Yang MJ, Orton ML, Pawliszyn J. 1997. Quantitative determination of caffeine in beverages using a combined SPME–GC/MS method. *J Chem Educ* 74:1130–2.
- Zheng X, Mi X, Li S, Chen G. 2013. Determination of xylazine and 2,6-xylidine in animal tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Food Sci* 78:955–9.
- Zoumas BL, Kreiser WR, Martin RA. 1980. Theobromine and caffeine content of chocolate products. *J Food Sci* 45:314–6.
- Zwickenpflug W, Meger M, Richter E. 1998. Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J Agric Food Chem* 46:2703–6.

### **3.2.2.3 Beitrag am Artikel**

Der gesamte Artikel wurde von mir verfasst sowie alle dazu gehörigen Versuche wurden von mir selbst durchgeführt. In vielen Vorversuchen zur Aufarbeitung von Milch und Schokolade zeigte sich die SPME-Technik als vielversprechendste Möglichkeit. Florian Vetter entwickelte und validierte in seiner Masterarbeit, welche von Prof. Dr. Franz Bracher und mir betreut wurde, die Spurenanalyse von Tabakalkaloiden in Milchprodukten mittels Festphasenmikroextraktion und Tandem-Massenspektrometrie [69]. Auf meine Anregung hin hatte er bereits einige Schokoladenproben auf den Nikotingehalt hin untersucht. Die Matrix Schokolade im Zusammenhang mit Milchprodukten empfand ich als besonders interessant. Die entwickelte Methode von Florian Vetter [69] wurde von mir für die in diesen Artikel beschriebene Untersuchung für die spezielle Anwendung der Matrix Schokolade modifiziert (andere Volumina und Aufarbeitungsschritte geändert), und um das biogene Xanthinalkaloid Coffein erweitert. Prof. Dr. Elmar Richter führte die Berechnungen zur Spearman-Korrelation durch und war wie Prof. Dr. Franz Bracher für die Verbesserung des Manuskripts verantwortlich.

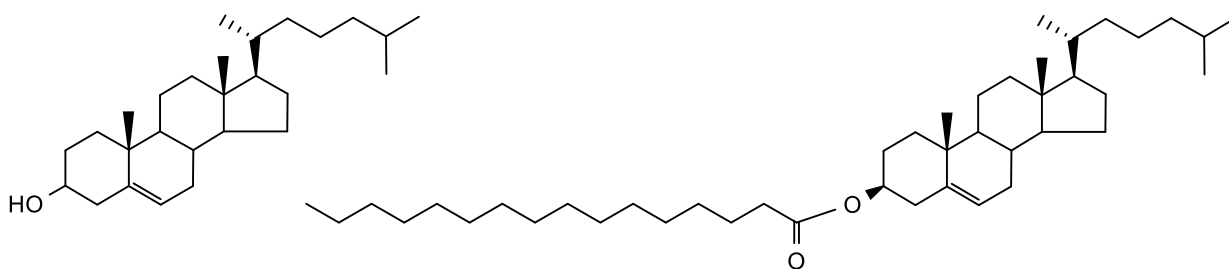


## 3.3 Bestimmung von Cholesterol in Mäuseleber

### 3.3.1 Einleitung

Mit der Erfahrung in der Sterol-Analytik (vgl. Kapitel 1) und mit der Flexibilität auf verschiedenste analytische Fragestellungen (vgl. Kapitel 3.2) einzugehen, wurden Prof. Dr. Franz Bracher und ich für die Bestimmung von freiem und verestertem Cholesterol in Mäuseleber von Prof. Dr. Martin Biel, Prof. Dr. Christian Wahl-Schott und Dr. Dr. Christian Grimm vom Department für Pharmazie Zentrum für Pharmaforschung und Center for Integrated Protein Science München als Kooperationspartner gewonnen.

Wie schon in Kapitel 1.2 beschrieben ist Cholesterol ein wichtiger Bestandteil der humanen Zellen sondern natürlich auch von ganzen Geweben (v.a. Leber). Cholesterol selbst kommt dabei frei, also unverestert, oder aber mit einer Fettsäure (z.B. Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure) verestert vor (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Freies Cholesterol (links) und gebundenes Cholesterol als Cholesterolpalmitat (rechts)

Beltroy et al. [81] untersuchten 2007 die Konzentrationen von freiem und verestertem Cholesterol in Mäuseleber. Die verwendete Aufarbeitungsmethodik gilt, nicht einmal 10 Jahre später, als veraltet und wird den Kriterien der 6Ss (vgl. Kapitel 3.1) nur schwer gerecht. Daher soll an dieser Stelle kurz auf die Methode von Beltroy eingegangen werden, um dann in Kapitel 3.3.2 das neu entwickelte Aufarbeitungskonzept vorzustellen.

Freies und verestertes Cholesterol wurde aus homogenisierten Mäuseleber-Aliquoten (0,6-0,8 g) mit 100 mL Chloroform/Methanol extrahiert. Chloroform gilt als gesundheitsgefährdend. Anschließend wurden 20 mL des Extraktes unter Stickstoff zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 2 mL Hexan/TBME-Mischung aufgenommen. Die Aufreinigung des aufkonzentrierten Extraktes erfolgte mittels SPE. Das veresterte Cholesterol wurde zuerst mit 18 mL Hexan/TBME-Mischung von der SPE-Kartusche gewaschen, bevor das unveresterte Cholesterol mit 18 mL einer Mischung aus TBME/Eisessig extrahiert wurde. Beide Fraktionen wurden wieder eingedampft und mit alkoholischer Kalilauge verseift. Um nun das Cholesterol der Gaschromatographie zugänglich zu machen wurden die

alkalischen Lösungen in einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Petrolether extrahiert und Aliquote davon injiziert. Eine Derivatisierung des Cholesterols erfolgte nicht. Leider wurden in dem Extraktionsprotokoll keine weiteren Angaben zu Volumina gemacht, es ist aber davon auszugehen dass sicherlich jeweils Volumina >10 mL verwendet wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine große Menge an Lösungsmitteln verbraucht wurde sowie ein hoher Zeitaufwand von Nöten war um den jeweiligen Lösungsmittelwechsel durchzuführen.

### 3.3.2 Methodenkonzept: Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion

Grimm C, Holdt LM, Chen C-C, Hassan S, Butz E, Spahn S, Northoff B, **Müller C**, Castonguay J, Luber CA, Kissing S, Schröder B, Fendel C, Klugbauer N, Griesbeck O, Moser M, Bracher F, Teupser D, Mann M, Haas A, Saftig P, Biel M, Wahl-Schott C. *Two-pore 2 deficient mice are susceptible to hyperlipoproteinemia, hepatic cholesterol accumulation and fatty liver hepatitis*, 2013, eingereicht

#### 3.3.2.1 Zusammenfassung

Endosomen und Lysosomen sind wichtige Bestandteile von Zellorganellen. Sie sind beteiligt am Transport und Abbau von (Lipo-)Proteinen und anderen Makromolekülen sowie von Lipiden, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten. Die Vesikel besitzen Rezeptoren und Liganden für den Recycling-Pathway oder für den Degradations-Pathway (vgl. Kapitel 3.3.2.2; Grafik 1 in folgenden Artikel). Verschiedenste Interaktionen von SNARE-Proteinen (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) sind innerhalb des endolysosomalen Systems verantwortlich für Fusionsprozesse und für den Stofftransport.

Es wird angenommen, dass für die Fusion von zwei Vesikelmembranen ein lokaler Anstieg der Calcium-Konzentration notwendig ist. Inwieweit die Bereitstellung von Calcium für den Fusionsprozess ausschlaggebend ist und woher das Calcium stammt ist unklar. In den Membranen von intrazellulären Vesikeln wurden bereits eine Reihe von Ionenkanälen als mögliche Calcium-Transportsysteme identifiziert. Eine Klasse dieser Ionenkanäle sind die Zwei-Poren-Kanäle (eng. *two-pore channel*, TPC), da bereits gezeigt wurde, dass diese Calcium freisetzen können. TPC1 kommt hauptsächlich in Endosomen vor, während TPC2 in den späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist. Die genaue Funktion der TPCs bei der Fusion und dem Transport von Vesikeln war ebenfalls unklar.

Zur Aufklärung der Rolle von TPCs wurden eine Vielzahl an Versuchen und Techniken (vgl. Kapitel 3.3.2.2 wie im Artikel beschrieben) eingesetzt: a) durch Proteomik-basierende TPC2 Interaktions-Studien b) durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Messungen (FRET), c) durch Co-Immunpräzipitation und Western-blotting, d) durch *Patch-Clamp* Experimente an Endo/Lysosomen, e) durch TPC2 *knock-out* Mäuse, f) durch Transportexperimente mittels Immunocytochemie, g) durch endolysosomale pH-Wert-Messungen, h) durch Bestimmung von unverestertem und verestertem Cholesterol in Mäuselebern (mein Anteil an diesem Artikel), i) und durch Bestimmung des Cholesterol-Spiegels in Leber und Blut, j) durch Transkriptom-Analysen.

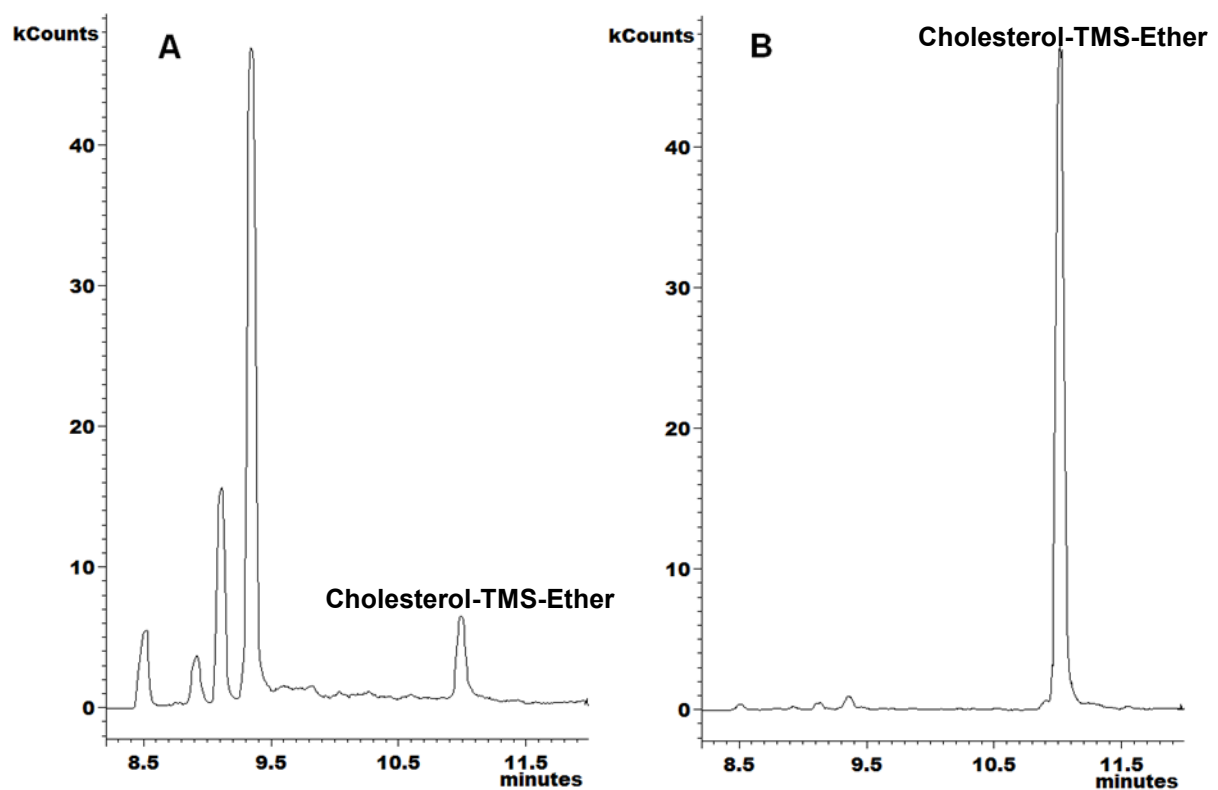
Dabei konnten verschiedene SNARE-Proteine als Interaktionspartner des TPC2 Kanals identifiziert werden, v.a. die Syntaxine (STX6, STX7 sowie STX12/13) und Tranferrin Rezeptor 1 (engl. transferrin, Tf). Die Interaktion von TPC2 mit STX7 wurde mit Co-Immunpräzipitation und FRET bestätigt. Ein Defekt von TPC2 unter Beteiligung von STX7 im Degradation-Pathway führte zu einer Anreicherung

von LDL in endolysosomalen Vesikeln. Dies konnte zudem durch fluoreszenzmarkiertes LDL gezeigt werden.

Im Recycling-Pathway wurde die Bedeutung von STX12/13 mit TPC2 untersucht. Dabei wurde markiertes Transferrin benutzt. Auch hier kam es zu einem Anstieg von Tf im Vesikel in defekten TPC2-Zellen.

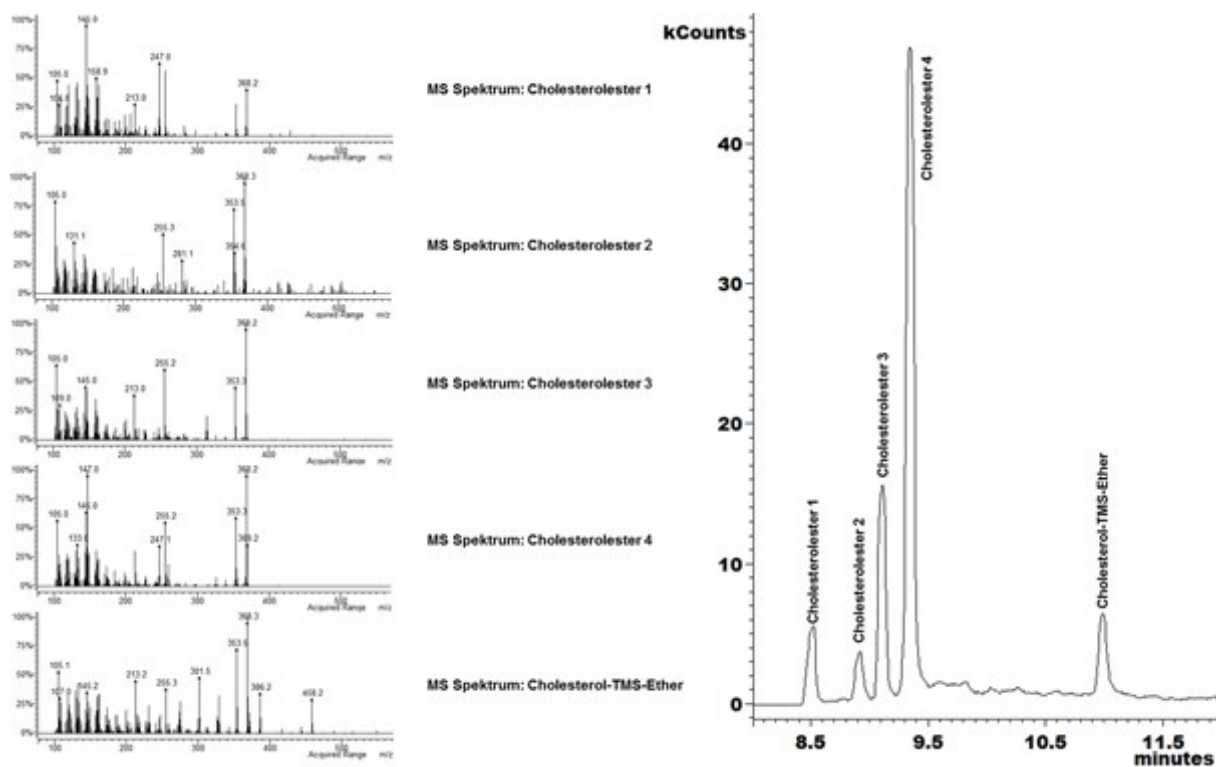
Die *knock-out* Mäuse mit defektem TPC2 zeigten im Vergleich zu „normalen“ Mäusen folgende phänotypischen Ausprägungen: a) Hyperlipoproteinämie, b) Anreicherung hepatischen Cholesterols, c) Fettleber-Hepatitis. Eine Bestätigung erfolgte durch Transkriptom-Analysen. Diese zeigten nur in TPC2 defekten Mäusen eine Hochregulierung von hepatischen Enzymen die an der Gallensäure-Bildung und an der Bildung von Cholesterolestern beteiligt sind, sowie eine Niederregulierung der endogenen hepatischen Cholesterol-Biosynthese.

Die genaue quantitative Bestimmung des hepatischen unveresterten und veresterten Cholesterols wurde mit einer von mir eigens dafür entwickelten Methode durchgeführt, um den Anforderungen der 6Ss gerecht zu werden (vgl. Kapitel 3.1). Die Methode stand ganz im Zeichen der Miniaturisierung, daher kam die Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion kombiniert mit der dSPE zum Einsatz. Die eingesetzten Mäuseleber-Aliquote (40-120 mg) betrugen dabei nur ein Zehntel derer von Beltroy [81]. Dadurch konnte wertvolles und nur in begrenzter Menge verfügbares Probenmaterial gespart werden und die restliche Leber ist für weitere Versuche zugänglich. Die Lebern wurden in 2 M Natronlauge schonend lysiert, um einen homogenen Extrakt herzustellen (10 mg Leber pro mL). Nach der Zelllyse wurden die Proben unterteilt in jeweils 50 µL zur Bestimmung von unverestertem Cholesterol (n = 5, Ansatz A) und 100 µL zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterols (ebenfalls n = 5, Ansatz B), welches sich aus verestertem und freiem Cholesterol zusammensetzt (Abbildung 29). Ansatz A erfasst nur freies Cholesterol (Abbildung 28) obwohl Cholesterolester darin vorkommen und Ansatz B erfasst nach Esterhydrolyse freies Cholesterol und ehemaliges verestertes Cholesterol. Um die Cholesterolester zu hydrolysieren wurden die Lysate (Ansatz B) mit 1 M ethanolischer Natronlauge für zwei Stunden bei 60 °C gelagert. Beiden Lösungen (Ansatz A und B) wurde 5 mL destilliertes Wasser zugegeben und gegen 1000 µL TBME ausgeschüttelt. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde mit weiteren 800 µL TBME wiederholt. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mittels dSPE weiter aufgereinigt (siehe QuEChERS, Kapitel 3.1). Bevor die Proben mittels GC-MS (Ionenfalle) analysiert wurden, wurden sie mittels MSTFA/TSIM-Mischung silyliert (vgl. Kapitel 1). Die GC-MS Bedingungen wurden speziell auf die Analyse von Cholesterol hin optimiert, da in diesem Fall keine Auftrennung von verschiedenen Sterolen notwendig war. Die GC-Laufzeit wurde durch einen steileren Temperaturgradienten im Vergleich zu den Cholesterol- bzw. Ergosterol-GC-MS Bedingungen verkürzt.



**Abbildung 29:** Chromatogramme der Cholesterolbestimmung in Mäuseleber; A: nur nach Zelllyse zur Bestimmung des freien Cholesterols (Split 1:3); B: gleiche Leberprobe nach alkalischer Hydrolyse zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterols (Split 1:15)

Die Identifizierung der einzelnen Cholesterolester, die v.a. bei Mäusen mit defektem TPC2 auftraten (vgl. Kapitel 3.3.2.2; Grafik 5e im Artikel), war für die Interpretation der Ergebnisse nicht erforderlich bzw. war mit dieser Methode auch nicht möglich. Wie in Abbildung 30 gezeigt lieferte die Analyse der Proben zwar verschiedene Peaks mit den charakteristischen Fragmenten für Cholesterol  $m/z$  368  $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z$  353  $[M-Me-H_2O]^+$ ,  $m/z$  255  $[M-Sc-H_2O]^+$  [51], aber keine auswertbaren Signale für mögliche Cholesterol-Fettsäureester. Die Fettsäuren wurden während der Ionisierung abgespalten, so konnten die Cholesterol-Fettsäureester zwar chromatographisch getrennt, jedoch nicht weiter charakterisiert werden, da dazu eindeutige Molekülonen  $[M]^+$  fehlten. Das Spektrum von Cholesterol-TMS-Ether zeigt hingegen ein  $[M]^+$  Fragment ( $m/z$  458). Durch eine sanftere Ionisation wäre eine Detektion der Cholesterolester  $[M]^+$  Fragmente vorstellbar.



**Abbildung 30:** MS Spektren der Cholesterolester in TPC2 defekten Mäuselebern

Mit der hier beschriebenen Aufarbeitungsmethode war es möglich, die 160 Proben für diesen Versuch an zwei Tagen aufzuarbeiten (16 Mäuseleber-Aliquote mit jeweils einer 5-fach Bestimmung für freies und verestertes Cholesterol). Der Verbrauch an Lösungsmitteln und der Zeitaufwand pro Probe waren gering. Die beschriebene Methode nach Beltroy [81] kann mit der neu entwickelten Methode nicht Schritt halten.

### 3.3.2.2 Artikel

Da sich der beschriebene Artikel (Stand 07.11.2013) noch in der Begutachtungsphase befindet, konnte dieser noch nicht in meine Arbeit eingefügt werden.

### 3.3.2.3 Beitrag am Artikel

Mein Betrag an dem Artikel war die Methodenentwicklung, Durchführung und Auswertung der gesammelten Daten für die Bestimmung von freiem und verestertem Cholesterol in Mäuseleber mittels GC-MS. Zusammen mit Prof. Dr. Franz Bracher, der mich zudem bei der Methodenentwicklung unterstützte, war ich bei der Interpretation der Daten und Kommentierung des Manuskripts, sowie an der Erstellung unseres Methodenteils im Skript verantwortlich. Christian Grimm konzipierte die Versuche, sammelte die Daten, analysierte diese und erstellte das Manuskript zusammen mit Prof. Dr. Martin Biel und Prof. Dr. Christian Wahl-Schott. Die Aufgaben der anderen Mitautoren waren ähnlich wie meine nur in ihrem jeweiligen Themengebiet.

## 3.4 Diskussion zur Spurenanalytik

Durch die stetige Entwicklung neuer Analysengeräte und neuer Analysenmethoden ist die analytische Chemie einem permanenten Entwicklungsdruck und Wandel ausgesetzt, da die Spezifität, Sensitivität, Geschwindigkeit, Einfachheit, Kostensenkung und der Probenzug immer weiter verbessert werden können. Wurden in den Jahren von 1970 bis 2000 maximal zwanzig Peaks pro Lauf detektiert/ausgewertet, können derzeit in sogenannten Multimethoden bis zu 200 Verbindungen pro Lauf analysiert werden (vgl. Pestizidanalytik, Kapitel 3.2.1). Die Zukunft gehört sicherlich dem „*Non-Target-Screening* als Target“ [82], sprich es wird jedes Signal hochsensitiv aufgezeichnet und hinterher der komplette Datensatz mit Blick auf die gewünschten Analyten untersucht. Dafür ist ein erheblicher instrumenteller Einsatz nötig (z.B. hochauflösende *Time-of-Flight* Geräte) [82, 83]. Die Probenvorbereitung rückt in den Hintergrund, da diese normalerweise selektiert. Die Selektivität und Spezifität des MRM-*mode* bleibt erhalten, jedoch ohne Verlust eines Analyten (vgl. Kapitel 3.2).

**Die entwickelten Methoden in diesem Kapitel sind für die Analyse von Vielstoffgemischen bestens geeignet:**

- GC-MS ANALYTIK

Das GC-MS/MS System im MRM-*mode* ist ein leistungsstarkes Analysengerät für die Analyse von festgelegten/bekannten Analyten. Die Selektivität und Sensitivität könnten damit deutlich gesteigert werden. Wie in Kapitel 3.2 gezeigt, konnte damit Nikotin in einer sehr komplexen Matrix (Schokolade) im ng/kg-Bereich quantifiziert werden. Das entspricht in etwa fünfzehn Stückchen Würfelzucker im Tegernsee. Das Screening von unbekannten Substanzen gelingt besser mit Ionenfallen-Technologie (vgl. Kapitel 1 und Kapitel 3.3.2) [33], jedoch müssen für das Screening deutlich höhere Analytmengen eingesetzt werden.

- SPME-TECHNIK

Die SPME-Technik erwies sich als gute Möglichkeit, um flüchtige bzw. mittelflüchtige Verbindungen aus schwierigen Matrices zu analysieren. Der Vorteil der Methode liegt in ihrer Einfachheit und leichten Abtrennung von Matrixbestandteilen (nicht flüchtige Bestandteile). Dadurch können sehr niedrige LOD- und LOQ-Werte erreicht werden, da es zu keinen Interferenzen mit anderen Stoffen kommt. Mit Hilfe der SPME-Technik war die Bestimmungsgrenze von Nikotin in Schokolade um den Faktor 50 niedriger als bei der QuEChERS-Aufarbeitung in Pilzen, obwohl am selben Gerät und mit fast der gleichen MS-Methode gemessen wurde. Leider ist die Headspace-SPME Methode nicht anwendbar auf schwer flüchtige Stoffe. So konnten (Kapitel 3.2.2) kein Cotinin und Theobromin mit der SPME-Technik im notwendigen ng/kg-Bereich erfasst werden.



- MIKRO-LLE

Mit dem Methodenkonzept der Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion ist es gelungen, eine Vielzahl an Proben in einfachster Weise aufzuarbeiten und sie mittels GC-MS zu analysieren. Eine einfache Abfolge von Aufarbeitungsschritten mit einem geringen Einsatz an Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien macht diese Methode in Zusammenhang mit einem GC-MS System zu einem guten Methodenkonzept, da im Vergleich zur SPME-Technik keine langen Equilibrierungszeiten der Faser eingehalten werden müssen (hoher Probendurchsatz möglich).

**Die Erkenntnisse aus den Analysenergebnissen in diesem Kapitel sind folgende:**

- QuEChERS-METHODE

Die QuEChERS-Methode kann sicherlich zur Identifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen in pharmazeutisch relevanten Drogen verwendet werden. Diese Aufbereitungsart ist universell einsetzbar, jedoch weniger gut geeignet für Matrices mit hohem Wasser- und/oder Fettanteil (vgl. Kapitel 3.2.1). Sie zeichnet sich v.a. durch ihre Einfachheit aus (Stichwort: *simplicity*)

- GC-MS ANALYTIK

Mittels GC-Ionenfalle oder GC-Quadrupol Technologie und den hier vorgestellten Methoden können zahlreiche Analyten und Fragestellungen aus unterschiedlichsten Matrices, sowohl qualitativ wie auch quantitativ, bearbeitet werden.

- NIKOTIN-BESTIMMUNG

Ob der Analyt Nikotin sowohl in der Schokolade als auch in Pilzen als Kontamination oder als Pflanzeninhaltsstoff anzusehen ist, bleibt ungeklärt. Der Einsatz als Pestizid gilt jedoch als sehr unwahrscheinlich. Da es bei den Schokoladen einen Zusammenhang zwischen dem Kakaogehalt und dem Nikotingehalt gibt (vgl. Kapitel 3.2.2), könnte hier Nikotin als natürlicher Pflanzeninhaltsstoff angesehen werden.

- CHOLESTEROL-BESTIMMUNG

Durch die Bestimmung von Cholesterol in Mäuseleber konnte gezeigt werden, dass die Analyse von Sterolen nicht nur eine wesentliche Rolle in der Entwicklung von neuartigen Sterol-Biosynthese-Inhibitoren hat, sondern auch im pharmakologisch/medizinischen Bereich.

**Die Perspektiven die sich aus diesem Kapitel ergeben sind folgende:**

- QuEChERS-METHODE

Eine Kombination aus dem Methodenkonzept QuEChERS und dem Ansatz der Miniaturisierung ist sicherlich vorstellbar zumal die Mikro-LLE bereits sehr erfolgreich eingesetzt wurde. (Stichwort: „Mikro-QuEChERS-Analyse“)

- GC-MS ANALYTIK

Die unterschiedlichsten Fragestellungen für lipophile verdampfbare Stoffe können auch zukünftig mittels leistungsfähiger Tandemmassenspektrometrie oder Ionenfallen-Technologie untersucht werden.

- SPME-TECHNIK

Die Etablierung der HS-SPME-Technik im Arbeitskreis bietet nun die Möglichkeit leicht flüchtige Substanzen sehr einfach zu analysieren. Eine mögliche Anwendung wäre z.B. die Bestimmung von Restlösemitteln in Proteinextrakten.

- MIKRO-LLE

Die Mikro-Flüssig-Flüssig-Extraktion gilt als so etabliert, dass sie spätestens ab jetzt überall zur Aufarbeitung von Extrakten benutzt werden sollte, wo keine Anreicherung des Analyten nötig ist.

- NIKOTIN-BESTIMMUNG

Die Bestimmung von Nikotin in verschiedenen Lebensmitteln ist immer interessant, zumal man eine Vielzahl an Analysetechniken einsetzen und kombinieren kann/muss (z.B. QuEChERS, SPME, Mikro-LLE). Ob es noch eine Matrix gibt, von der aufgrund einer starken Nikotinbelastung ein hohes Gesundheitsrisiko ausgeht, gilt als unwahrscheinlich, da die Hauptquellen von Nikotin sicherlich bekannt sind.

- CHOLESTEROL-BESTIMMUNG

Weitere Anwendungsgebiete für die Sterol-Analytik sind vorstellbar z.B. die Analyse von Phytosterolen oder die Bestimmung von Cholesterol und dessen Metaboliten in Cholesterol-sensitiven Tumoren (vgl. Einsatz von OSC-Inhibitoren).

*„Technische Entwicklung verläuft immer vom Primitiven über das Komplizierte zum Einfachen“*

Antoine de Saint-Exupéry

## 4 Allgemeine Zusammenfassung

Die beiden großen Teile meiner Dissertation Kapitel 1 „Sterol-Biosynthese-Testung“ und Kapitel 3 „Methodenkonzepte für die Spurenanalytik“ sind zwei grundsätzlich verschiedene Themengebiete.

Im gesamten Kapitel 1 stand die qualitative Auswertung, sprich Charakterisierung von neuen Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren, mit der Ionenfallen-Technologie im Vordergrund. Die Ionenfallen-Technologie erlaubt aufgrund ihrer Arbeitsweise eine deutlich detailliertere Aufnahme von Massenspektren als die Tandemmassenspektrometrie-Technologie, welche in Kapitel 3 verwendet wurde.

In dem Kapitel 1.2 konnte eine Reihe von neuen Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren charakterisiert werden, deren  $IC_{50}$ -Wert gemessen an der Gesamt-Cholesterol-Neubildung zum Teil im unteren nanomolaren Bereich lag.

In den Kapitel 1.2.1 bis 1.2.3 konnten neue Inhibitoren der humanen Oxidosqualencyclase charakterisiert werden. Das Einsatzgebiet dieser Inhibitoren könnte in der cholesterolsenkenden Therapie liegen bzw. sie könnten auch als Aduvants in der Chemotherapie eingesetzt werden.

In Kapitel 1.2.4 stand die Charakterisierung neuer Inhibitoren der humanen  $\Delta^{24}$ -Reduktase im Vordergrund. Sie könnten als molekulare Werkzeuge zur Erforschung der Desmosterolose eingesetzt werden. Weitere Einsatzgebiete könnten in der Chemotherapie liegen oder als Aduvants in der Alzheimer Therapie.

Die beiden nachfolgenden Kapitel 1.2.5 und 1.2.6 beschäftigen sich mit der Identifizierung neuer selektiver Inhibitoren der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Diese könnten einen Beitrag zur Aufklärung der Pathomechanismen von CHILD- und CDPX2-Syndrom leisten.

Mit der Charakterisierung von neuen 7-Dehydrocholesterolreduktase-Inhibitoren, in Kapitel 1.2.7, kann das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom besser erforscht werden. Dem Syndrom kommt innerhalb der Cholesterol-Biosynthese-assoziierten Erkrankungen die größte Bedeutung zu.

In dem Kapitel 1.3 konnten eine Reihe von neuen Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren charakterisiert werden. Die Charakterisierung erfolgte nicht nur durch Agar-Diffusionstest und MHK-Wert sondern auch durch eine von mir optimierte eindeutige Identifizierung des Targetenzym in der Ergosterol-Biosynthese. Eine  $IC_{50}$ -Wert Bestimmung bezogen auf die Gesamt-Ergosterol-Neubildung mittels Einbau nicht radioaktivem  $^{13}C$ -Acetat wurde ebenfalls etabliert.

In Kapitel 1.3.2.1 konnte der Wirkmechanismus eines von der Firma EMC Microcollections (Tübingen, Deutschland) entwickelten Benzimidazolderivats (EMC120B12) aufgeklärt werden. Es handelt sich dabei um einen sehr potenten Inhibitor der fungalen C14-Demethylase.

Ferner konnten in Kapitel 1.3.2.1.2 bis dato unbekannte Sterole charakterisiert werden. Dafür war die sichere Identifizierung der akkumulierenden Sterole durch detaillierte Massenspektren notwendig. Diese neuen Sterole mit  $3\beta,6\alpha$ -Diol-Struktur wurden anhand ihrer Massenspektren und relativen Retentionszeiten charakterisiert. Die neu identifizierten Sterole traten nur in dem pathogenen Pilz *Candida krusei* unter Inhibition des Enzyms der Sterol-C14-Demethylase auf.

In den anschließenden Kapiteln 1.3.2.2 und 1.3.2.3 werden weitere Substanzklassen von Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren vorgestellt. Diese erwiesen sich zum Teil als unspezifische Inhibitoren, da entweder die  $\Delta^{14}$ -Reduktase und/oder die  $\Delta^{8/7}$ -Isomerase inhibiert wurde. All diese Inhibitoren zeigten keine ausgeprägte Selektivität gegenüber einem Organismus (Pilz- oder Humanzellen).

Das Kapitel 2 „Studien zu Matrix-induzierten Effekten“ stellt das Bindeglied zwischen beiden großen Teilen dar. In diesem Kapitel wird die *analyte protectants* (AP) Wirkung von Cholesterol/Ergosterol untersucht um diese gegebenenfalls bei den in Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen als AP zu nutzen. Zur Beantwortung der Fragestellung wurden zwei unterschiedliche massenselektive Detektoren verwendet.

In Kapitel 1 wurden Cholesterol und Ergosterol als Analyten behandelt. In Kapitel 3 wurden die beiden Sterole nicht analysiert, aber durchaus als positive Matrixbestandteile angesehen, da Cholesterol bereits als AP beschrieben wurde. Es konnte in meinen Untersuchungen kein protektiver Effekt von Cholesterol/Ergosterol in der Spurenanalytik von Tabakalkaloiden nachgewiesen werden. Erst die Verwendung von Nikotinamid als AP zeigte eine protektive Wirkung. Die Identifizierung von Nikotinamid als AP wurde mittels der Ionenfallen-Technologie durchgeführt, die Bestätigung der AP Wirkung von Nikotinamid erfolgte mittels Tandemmassenspektrometrie-Technologie.

Im Kapitel 3.2 wird die Quantifizierung von Substanzen im niedrigen Konzentrationsbereich mittels Tandemmassenspektrometrie-Technologie beschrieben.

Das GC-MS/MS System im MRM-*mode* ist ein leistungsstarker massenselektiver Detektor für die Analyse von bekannten Analyten. Mit Hilfe diesen Detektors und der Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) gelang nicht nur der Nachweis sondern auch die Quantifizierung von Nikotin im ng/kg-Bereich in der komplexen Matrix Schokolade, bis dato war das Vorkommen von Nikotin in Schokolade unbekannt.

Ebenfalls konnte in dieser Untersuchung Koffein elegant mitquantifiziert werden, obwohl sich die Konzentrationen der beiden Analyten um den Faktor  $10^6$  unterschieden. Somit war es möglich, zwei biogene Alkaloide mit einer einzigen Aufarbeitungs- und Messtechnik zu bestimmen.

Als Probenvorbereitungstechnik konnte ich die Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in den Arbeitskreis etablieren. Die HS-SPME-Technik erlaubt die Analyse von flüchtigen bzw. mittelflüchtigen Verbindungen auch aus schwierigen Matrices. Mit Hilfe dieser Technik konnte die Bestimmungsgrenze von Nikotin in Schokolade um den Faktor 50 gesenkt werden, verglichen mit der Bestimmung von Nikotin in Speisepilzen mittels QuEChERS-Aufarbeitung [70].

Für die Durchführbarkeit weitere Experimente mussten unterschiedlichste Probenvorbereitungstechniken/Methodenkonzepte erarbeitet bzw. weiterentwickelt werden, da als Matrices Humanzellen (vgl. Kapitel 1.2), Pilzzellen (vgl. Kapitel 1.3), Lebensmittel (vgl. Kapitel 3.2) und Organe (vgl. Kapitel 3.3) zum Einsatz kamen. Diese Methodenkonzepte, wie die mikro Flüssig-Flüssig-Extraktion werden in dem Kapitel 3.3 besprochen.

Eine detailliertere Zusammenfassung meiner Ergebnisse finden sich in Kapitel 1.2.8 für die Charakterisierung von Cholesterol-Biosynthese-Inhibitoren, in Kapitel 1.3.4 für die Charakterisierung von Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren und in Kapitel 3.4 für die Methodenentwicklung in der Spurenanalytik.



## 5 Verzeichnisse

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

7-DHC	7-Dehydrocholesterol
7-DHCR	7-Dehydrocholesterolreduktase
[M] <sup>+</sup>	Molekülion
μg	Mikrogramm
μM	mikromolar
AP	Schutzstoffe, engl. <i>analyte protectants</i>
AS-HTS	Activity-Selectivity High-Throuhput-Screening Assays
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDPX2	<i>X-linked dominant chondrodysplasia punctata</i>
CETP	Cholesterolester-Transportprotein
CHILD	<i>Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects</i>
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
dSPE	dispersive Festphasenextraktion, engl. <i>dispersive solid phase extraction</i>
EBP	Emopamil-bindendes Protein
ECOFFs	epidemiologische <i>cut-offs</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EI	Elektronische Ionisation, engl. <i>electron ionisation</i>
EMA	European Medicines Agency
engl.	Englisch
FAD	Flavinadenindinucleotid
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FdUMP	5-Fluor-Desoxyuridinmonophosphat
FF-MAS	<i>Follicular fluid meiosis-activating sterol</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gramm

GC	Gaschromatographie
h	Stunde(n)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEI	<i>High energy intermediates</i>
HEM	<i>Hydrops-ectopic calcification-moth-eaten</i>
HL60	Humane promyelocytische Leukämie Zellen
HMG	Hydroxymethylglutaryl
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Inhibitorenkonzentration
IS	Interner Standard
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kg	Kilogramm
LBR	Lamin-B-Rezeptor
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion, engl. <i>liquid-liquid extraction</i>
LOD	Nachweisgrenze, engl. engl. <i>limit of detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze, engl. <i>limit of quantification</i>
M	molar
Me	Methylgruppe
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration engl. <i>minimal inhibitory concentration (MIC)</i>
mL	Milliliter
MRM	<i>Multi reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
m/z	Masse pro Ladung, engl. <i>mass over charge</i>
n	Anzahl
NADPH	Nikotinamidadeninucleotidphosphat
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>
OSC	Oxidosqualencyclase
PPAR	Peroxisomen-Proliferations-aktivierender-Rezeptor
QuEChERS	Kunstwort: <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Save</i>
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß



---

RRT	Relative Retentionszeit
$r_s$	Spearman Korrelationskoeffizient
RSD	Relative Standardabweichung
SANCO	Europäische Kommission für Gesundheit und Verbraucher
Sc	Seitenkette, engl. <i>side chain</i>
SLE	Fest-Flüssig-Extraktion; engl. <i>solid (supported) liquid extraction</i>
SLOS	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
SNARE	Soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SPE	Festphasenextraktion, engl. <i>solid phase extraction</i>
SPME	Festphasenmikroextraktion, engl. <i>solid phase microextraction</i>
<i>spp.</i>	<i>Species pluralis</i>
STX	Syntaxin
Tf	Transferrin
T-MAS	<i>Testis meiosis-activating sterol</i>
TMS	Trimethylsilyl
TMSOH	Trimethylsilanol
TPC2	<i>Two-pore channel 2</i>
TSIM	Trimethylsilylimidazol
US EPA	<i>United States Enviromental Protection Agency</i>
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 5.2 Literaturverzeichnis

- [1] Giera M. Dissertationsschrift Ludwig-Maximilians Universität München, Entwicklung neuer Testsysteme zur Charakterisierung von Enzym-Inhibitoren des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol- und Ergosterol-Biosynthese (2007).
- [2] Giera M, Plössl F, Bracher F. Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids* 2007;72:633-42.
- [3] Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical Reviews* 2011;111:642-51.
- [4] Woodward RB, Sondheimer F, Taub D, Heusler K, McLamore WM. The total synthesis of steroids. *Journal of the American Chemical Society* 1952;74:4223-51.
- [5] Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents - Part 84: Microdilution - Special requirements for testing of fungi against antifungal agents, in: DIN 58940-84, Beuth Verlag, 2002.
- [6] Vance DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1529:1-8.
- [7] Aktories K, Förstermann U, Hoffmann F, Starke K (Hrsg.). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier 2005, 9. Auflage. Seite 100ff.
- [8] Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1999, 5. Auflage. Seite 301ff.
- [9] Herman GE. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Human Molecular Genetics* 2003;12:R75-88.
- [10] Waterham HR, Wanders JA. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1529:340-56.
- [11] Rozman D, Monostory K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacology & Therapeutics* 2010;127:19-40.
- [12] Chugh A, Ray A, Gupta JB. Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Progress in Lipid Research* 2003;42:37-50.
- [13] Trapani L, Segatto M, Ascenzi P, Pallottini V. Potential role of nonstatin cholesterol lowering agents. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 2011;63:964-71.
- [14] Funk J, Landes C. Histopathologic findings after treatment with different oxidosqualene cyclase (OSC) inhibitors in hamsters and dogs. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2005;57:29-38.
- [15] Grinter SZ, Liang Y, Huang S, Hyder SM, Zou X. An inverse docking approach for identifying new potential anti-cancer targets. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2011;29:795-99.
- [16] Staedler D, Chapuis-Bernasconi C, Dehmlow H, Fischer H, Juillerat-Jeanneret L, Aebi JD. Cytotoxic effects of combination of oxidosqualene cyclase inhibitors with atorvastatin in human cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012;55:4990-02.
- [17] Di Stasi D, Vallacchi V, Campi V, Ranzani T, Daniotti M, Chiodini E, Fiorentini S, Greeve I, Prinetti A, Rivoltini L, Pierotti MA, Rodolfo M. DHCR24 gene expression is upregulated in melanoma metastases and associated to resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *International Journal of Cancer* 2005;115:224-30.

- [18] Lasunción MA, Martín-Sánchez C, Canfán-Duque A, Busto R. Post-lanosterol biosynthesis of cholesterol and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2012;12:1-7.
- [19] Aleck KA, Bartley DL. Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: report of an additional patient. *American Journal of Medicinal Genetics* 1997;72:253-56.
- [20] Greenberg CR, Rimoin DL, Gruber HE, DeSa DJB, Reed M, Lachman RS. A new autosomal recessive lethal chondrodystrophy with congenital hydrops. *American Journal of Medical Genetics* 1988;29:623-32.
- [21] Wassif CA, Brownson KE, Sterner AL, Forlino A, Zervas PA, Wilson WK, Starost MF, Porter FD. HEM dysplasia and ichthyosis are likely laminopathies and not due to  $3\beta$ -hydroxysterol  $\Delta^{14}$ -reductase deficiency. *Human Molecular Genetics* 2007;16:1176-87.
- [22] Herman GE. X-linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1529:357-73.
- [23] Giera M, Renard D, Plössl F, Bracher F. Lathosterol side chain amides – A new class of human lathosterol oxidase inhibitors. *Steroids* 2008;73:299-08.
- [24] Rodgers MA, Villareal VA, Schaefer EA, Peng LF, Corey KE, Chung RT, Yang PL. Lipid metabolite profiling identifies desmosterol metabolism as a new antiviral target for hepatitis C virus. *Journal of the American Chemical Society* 2012;134:6896-99.
- [25] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2012;62:10-29.
- [26] Lange S. Dissertationsschrift Ludwig-Maximilian Universität München, "Neuartige (S)-2,3-Oxidosqualencyclase-Inhibitoren" (München 2006).
- [27] Thoma R, Schulz-Gasch T, D'Arcy B, Benz J, Aebi J, Dehmlow H, Henning M, Stihle M, Ruf A. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* 2004;432:118-22.
- [28] Peri A, Serio M. Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2008;41:251-61.
- [29] Holleran AL, Lindenthal B, Aldaghtas TA, Kelleher JK. Effect of tamoxifen on cholesterol synthesis in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Metabolism* 1998;47:1504-13.
- [30] König M. Dissertationsschrift Ludwig-Maximilians Universität München, Synthese neuartiger Inhibitoren der humanen  $\Delta^{8/7}$ -Sterolisomerase (2011).
- [31] Parks LW. Metabolism of sterols in yeast. *Critical Reviews in Microbiology* 1978;6:301-41.
- [32] Müller J. Dissertationsschrift Ludwig-Maximilians Universität München, Analytik von freien Sterolen und Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren (2002).
- [33] Staudacher V. Masterarbeit Ludwig-Maximilians Universität München, Entwicklung eines Testsystems zur Charakterisierung von Enzym-Inhibitoren des Post-Lanosterol-Abschnitts mittels GC-MS (2012).
- [34] Fridkin S, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1996;9:499-11.

- [35] Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends in Microbiology* 1994;2:393-00.
- [36] White TC, Marr AM, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1998;11:382-02.
- [37] Van Minnebruggen G, Francois IEJA, Cammue BPA, Thevissen K, Vroome V, Borgers M, Shroot B. A general overview on past, present and future antimycotics. *The Open Mycology Journal* 2010;4:22-32.
- [38] Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, Burke MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:2234-39.
- [39] European Medicines Agency recommends suspension marketing authorisations for oral ketoconazole; Press release 26.07.2013.
- [40] Bracher F. Angriffspunkt Ergosterolbiosynthese: Wirkstoffe und Wirkprinzipien. *Pharmazie in unserer Zeit* 2003;32:118-23.
- [41] Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine* 2002;8:76-81.
- [42] Renard D, Perruchon J, Giera M, Müller J, Bracher F. Side chain azasteroids and thiasteroids as sterol methyltransferase inhibitors in ergosterol biosynthesis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009;17:8123-37.
- [43] Burger-Kentischer AB, Finkelmeier D, Keller P, Bauer J, Eickhoff H, Kleymann G, Rayvan WA, Singh A, Schröppel K, Lemuth K, Wiesmüller K-H, Rupp S. A screening assay based on host-pathogen interaction models identifies a set of novel antifungal benzimidazole derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4789-01.
- [44] Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance: *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006;27:359-66.
- [45] Ebert E, Gaudin J, Muecke W, Ramsteiner K, Vogel C, Fuhrer H. Inhibition of ergosterol biosynthesis by itraconazole in *Ustilago maydis*. *Zeitschrift für Naturforschung* 1982;38:28-34.
- [46] Quail M, Arnoldi A, Moore DJ, Goosey MW, Kelly SL. Itraconazole-mediated growth inhibition in *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 1993;32:273-80.
- [47] Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;207:910-15.
- [48] Nakanishi S, Nishino T, Nagai J, Katsuku H. Characterisation of nystatin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and Preparation of sterol intermediates using the mutants. *Journal of Biochemistry* 1987;101:535-44.
- [49] Kováts E. Gaschromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* 1958;48:1915-32.
- [50] Stein SE, Babushok VI, Brown RL, Lindstrom PJ. Estimation of Kováts indices using group contributions. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2007;47:975-80.

- [51] Gerst N, Ruan B, Pang J, Wilson WK, Schroepfer GJ. An updated look at the analysis of unsaturated C27 sterols by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 1997;38:1685-01.
- [52] Paik Y-K, Billheimer JT, Magolda RL, Gaylor JL. Micorsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol, solubilization and purification of steroid 8-isomerase. *Journal of Biological Chemistry* 1986;261:6470-77.
- [53] Goldstein AS. Synthesis and bioevaluation of  $\Delta^7$ -5-desaturase inhibitors, an enzyme late in the biosynthesis of the fungal sterol ergosterol. *Journal of Medicinal Chemistry* 1996;39:5092-99.
- [54] SANCO guideline, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document No SANCO 10684/2009.
- [55] Anastassiades M, Masátovká K, Lehotay SJ. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 2003;1015:163-84.
- [56] Plöchl F. Dissertationsschrift Ludwig-Maximilians Universität München, Neue Anwendungsformen der dispersiven SPE in der pharmazeutischen Analytik (2007).
- [57] Bracher F, Plöchl F. Cholesterol as analyte protactant for GC-MS analysis of drugs. Jahrestagung der deutschen pharmazeutischen Gesellschaft in Braunschweig, Oktober 2010.
- [58] Mattila P, Lampi A-M, Ronkainen R, Toivo J, Piironen V. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 2002;76:293-98.
- [59] Directorate – General Health and Consumers, European Commission. Document No. SANCO/20232/2006, Quality control procedures for pesticide residues analysis, 24.03.2006.
- [60] Eurachem. The Fitness for purpose of analytical methods; A laboratory guide to method validation and related topics. First English Edition 1.0 1998.
- [61] Chen Y, Guo Z, Wang X, Qiu C. Sample preparation. *Journal of Chromatography A* 2008;1184:191-19.
- [62] Kromidas S, Kuss H-J (Hrsg.). *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*. Wiley-VCH 2008, 1. Auflage. Seite 306ff.
- [63] Plöchl F, Giera M, Bracher F, Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *Journal of Chromatography A* 2006;11359-26.
- [64] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of the Association of Analytical Communities International* 2003;86:12-31.
- [65] Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tisdelen B, Oliva J, Barba A. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007;389:1697-14.
- [66] Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 1990;62:2145-48.

- [67] Hinshaw JV. Solid-phase microextraction. LC GC 2012;25:570-74.
- [68] Lord H, Pawliszyn J. Microextraction of drugs. Journal of Chromatography A 2000;902:17-37.
- [69] Vetter F. Masterarbeit Ludwig-Maximilian Universität München, Spurenanalyse von Tabakalkaloiden in Milchprodukten mittels Festphasenmikroextraktion und Tandem-Massenspektrometrie (2012).
- [70] Müller C. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Methodenentwicklung zur Bestimmung von Nikotin in getrockneten Pilzen mittels QuEChERS und GC-MS/MS (2011).
- [71] Commission Regulation (EU) No 149/2008 16 of January 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorothalonil clothianidin, difenoconazole, fenhexamid, flubendiamide, nicotine, spirotetramat, thiacloprid and thiamethoxam in or on certain products. Official Journal of the European Union (28.08.2010), p. 1-37.
- [72] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); Nikotin in getrockneten Steinpilzen: Ursache der Belastung muss geklärt werden, Stellungnahme 009/2009 des BfR vom 28. Februar 2009.
- [73] Commission Regulation (EU) No 765/2010 of 25 August 2010 amending Annexes II AND III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III, IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto. Official Journal of the European Union (2008), L58/1-L58/398.
- [74] Tyroller S, Zwicknnpflug W, Richter E. New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002;50:4909-15.
- [75] Rudolph E, Färber A, König J. Determination of caffeine contents of various food items within the Austrian market and validation of a caffeine assessment tool (CAT). Food Additives and Contaminants: Part A 2012;29:1849-60.
- [76] Alonso SG, Valcárcel Y, Montero JC, Catalá M. Nicotine occurrence in bottled mineral water: Analysis of 10 brands of water in Spain. Science of the Total Environment 2012;416:527-31.
- [77] Brčić Karačonji I, Skender L, Karačić V. Determination of nicotine and cotinine in urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography with mass spectrometric detection. Acta Chimica Slovenica 2007;54:74-78.
- [78] Yang MJ, Orton ML, Pawliszyn J. Quantitative determination of caffeine in beverages using combined SPME-GC/MS method. Journal of Chemical Education 1997;74:1130-32.
- [79] DIN 32645, Chemical analysis - decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions - terms, methods, evaluation, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Germany, 2008.
- [80] Meyer VR. Can we trust experimental standard deviations? LC GC Europe 2012;25:417-24.
- [81] Beltroy EP, Liu B, Dietschy JM, Turley SD. Lysosomal unesterified cholesterol content correlates with liver cell death in murine Niemann-Pick type C disease. Journal of Lipid Research 2007;48:869-81.
- [82] Mol H. Non-Targeted is our target. The Analytical Scientist 2013;5:24-28.
- [83] Little JL, Cleven CD, Howard AS, Yu K. Identifying "known unknowns" in commercial products by mass spectrometry. LC GC Europe 2013;26:163-68.





## 6 Veröffentlichungen

### Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften

- Grimm C, Holdt LM, Chen C-C, Hassan S, Butz E, Spahn S, Northoff B, **Müller C**, Castonguay J, Lubert CA, Kissing S, Schröder B, Fendel C, Klugbauer N, Griesbeck O, Moser M, Bracher F, Teupser D, Mann M, Haas A, Saftig P, Biel M, Wahl-Schott C. Two-pore 2 deficient mice are susceptible to hyperlipoproteinemia, hepatic cholesterol accumulation and fatty liver hepatitis. 2013; eingereicht
- **Müller C**, Vetter F, Richter E, Bracher F. Determination of caffeine, myosmine, and nicotine in chocolate by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Science* 2014;79:251-55.
- Krauss J, **Müller C**, Kießling J, Richter S, Staudacher V, Bracher F. Synthesis and biological evaluation of novel N-alkyl tetra- and decahydroisoquinolines: Novel antifungals that target ergosterol biosynthesis. *Archiv der Pharmazie* 2014;347:1-8.
- Krojer M, **Müller C**, Bracher F. Steroidomimetic aminoalkyl spiroacetals as novel inhibitors of the enzyme  $\Delta 8/7$ -sterol isomerase in cholesterol biosynthesis. *Archiv der Pharmazie* 2013;346:1-15.
- Krauss J, Gratzl C, Sturm V, **Müller C**, Staudacher V, Schmidt CQ, Bracher F. Synthesis and biological evaluation of novel alkyl imidazolyl carbionols and their esters: potent antimycotics. *Scientia Pharmaceutica* 2013;81:641-50.
- Lange S, Keller M, **Müller C**, Oliaro-Bosso S, Balliano G, Bracher F. Aminopropylindenes derived from Grundmann's ketone as a novel chemotype oxidosqualene cyclase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013;63:758-64.
- **Müller C**, Staudacher V, Krauss J, Giera M, Bracher F. A convenient cellular assay for target identification and selective potency determination of quantification of ergosterol biosynthesis. *Steroids* 2013;78:483-93.
- König M, **Müller C**, Bracher F. Stereoselective synthesis of a new class of potent and selective inhibitors of human  $\Delta 8/7$ -sterol isomerase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013;21:1925-43.

- Horling A, **Müller C**, Barthel R, Bracher F, Imming P. A new class of selective and potent 7-dehydrocholesterol reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012;55:7614-22.
- **Müller C**, Bracher F, Plössl F. Determination of nicotine in dried mushrooms by using a modified QuEChERS approach and a GC-MS-MS. *Chromatographia* 2011;73:807-11.

### Posterpräsentationen

- **Müller C**, Keller PD, Engelhardt I, Hiller E, Rupp S, Eickhoff H, Wiesmüller K-H, Bracher F. Old target- new effects: Accumulation of novel sterols caused by the new antifungal EMC120B12. Sonderforschungsbereich 630: Novel Agents against Infectious Diseases- An Interdisciplinary Approach in Würzburg, November 2013.
- **Müller C**, Keller PD, Engelhardt I, Hiller E, Rupp S, Eickhoff H, Wiesmüller K-H, Bracher F. Accumulation of novel sterols caused by a new antifungal sterol C14-demethylase inhibitor. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Freiburg, Oktober 2013.
- Hemmers S, **Müller C**, Bracher F. Side chain functionalized steroids as highly selective, noncytotoxic inhibitors of human  $\Delta 24$ -reductase. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Freiburg, Oktober 2013.
- Keller M, Wolfgardt A, **Müller C**, Oliaro-Bosso S, Balliano G, Wilcken R, Böckler F, Bracher F. Aryltetrahydropyridine and arylpiperidine derivatives as a new class of human oxidosqualene cyclase inhibitors. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Freiburg, Oktober 2013.
- Keller PD, Lemuth K, Hiller E, Engelhardt I, **Müller C**, Bracher F, Rupp S. Novel sterols in *Candida krusei* identified by novel antifungal compound. Fifth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and virulence in La Colle sur Loup, Mai 2013.
- Binder U, Maurer E, **Müller C**, Bracher F, Lass-Flörl C. Influence of hypoxia on antifungal susceptibility, sterole pattern and biomarker release of *Aspergillus* spp.. Fungal genetics conference in Asilomar, März 2013.

- Staudacher V, **Müller C**, Bracher F. In vitro screening of potential ergosterol biosynthesis inhibitors by GC-MS analysis. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Greifswald, Oktober 2012.
- Keller PD, Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Wiesmüller K-H, Lemuth K, Hiller E, Engelhardt I, **Müller C**, Schröppel K, Bracher F, Rupp S. Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal human pathogens. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. in Hamburg, Oktober 2012.
- Horling A, **Müller C**, Barthel R, Bracher F, Imming P. Tetrahydroisoquinoline alkaloid derivatives inhibit 7-dehydrocholesterol reductase. International congress of natural products in New York, Juli 2012.
- Keller PD, Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Wiesmüller K-H, Lemuth K, Hiller E, Engelhardt I, **Müller C**, Schröppel K, Bracher F, Rupp S. Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal human pathogens. Congress of the International Society for Human and Animal Mycology in Berlin, Juni 2012.
- Keller PD, Burger-Kentischer A, Wiesmüller K-H, Lemuth K, Hiller E, Engelhardt I, **Müller C**, Schröppel K, Bracher F, Rupp S. Identification and characterisation of novel antifungal compounds against fungal human pathogens. European conference on fungal genetics in Marburg, März 2012.
- Wolfgardt A, **Müller C**, Bracher F. Synthesis of new selective oxidosqualene cyclase inhibitors. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Innsbruck, September 2011.
- Bracher F, **Müller C**, König M. Selektive Inhibitors of  $\Delta^{8/7}$ - Isomerase in cholesterol biosynthesis. Fachgruppentagung der Deutschen Chemischen und der Pharmazeutischen Gesellschaft in Saarbrücken, März 2011.
- Paul A, **Müller C**, Kraus J, Bracher F, Imming P. Synthesis and biological evaluation of berberine derivatives. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Braunschweig, Oktober 2010.

- Paul A, **Müller C**, Krauss J, Bracher F, Imming P, Synthesis and biological evaluation of berberine derivatives. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung e.V. in Berlin, September 2010.

### Vorträge

- Keller PD, Lemuth K, Hiller E, Engelhardt I, **Müller C**, Bracher F, Rupp S, Novel sterols in *Candida krusei* identified by novel antifungal compound, Fifth FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and virulence in La Colle sur Loup, Mai 2013. (Referentin: Petra D. Keller)
- Keller M, **Müller C**, Bracher F. Synthesis of new and selective inhibitors of human oxidosqualene cyclase. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Jena, September 2009. (Referent: Marco Keller)

### Referent

- Bruker Daltoniks, Anwendertreffen, März 2012.
- Bayrische Landesapothekerkammer, Fortbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik, seit September 2010.