

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EVALUIERUNG VON TRITERPEN-CARBONSÄURE-DERIVATEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Sven Sommerwerk

geb. am 25.03.1987 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. R. Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
Prof. Dr. D. Schinzer (Otto von Guericke Universität Magdeburg)

Datum der Verteidigung: 26. Juni 2017

Danksagung

Einen ganz besonderen Dank möchte ich in erster Linie meinem hochgeschätzten Doktorvater Prof. Dr. René Csuk für die Überlassung des überaus interessanten Themas aussprechen. Für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Ratschläge und den ein oder anderen Schubser in die richtige Richtung möchte ich mich hiermit bedanken. Mit Ihrer Begeisterung für chemische Reaktionen und neue Strukturen aller Art waren Sie stets ein großes Vorbild für mich. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme und dabei die richtige Lösung meistens bereits parat – das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Herzlichen Dank.

Weiterhin möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit und die gewährte Hilfe danken. Dabei möchte ich einen besonderen Dank an M.Sc. L. Heller richten, ohne deren Beitrag für die biologischen Assays ein Gelingen dieser Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre. Aber auch M.Sc. A. Kramell und M.Sc. J. Wiemann möchte ich für die zahlreichen Gespräche jeglicher Art und die gemeinsamen Kaffeepausen danken.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Studenten, durch deren direkte oder indirekte Hilfe ein Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet wurde. Hier möchte ich mich zunächst bei Dipl.-LMChem. J. Kuhfs bedanken, einerseits für die synthesechemische Unterstützung aber vor allem für die sehr angenehme Zusammenarbeit. Darüber hinaus möchte ich mich bei M.Sc. A. Loesche und M.Sc. I. Serbian bedanken. Es war mir eine Ehre euch ein Stück weit auf eurem Weg begleiten zu dürfen – vielen Dank für die schöne Zeit mit euch und alles Gute für eure Zukunft.

Bei Dr. R. Schäfer möchte ich mich für die Unterstützung und die netten Gespräche während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe bedanken. Für die Aufnahme der zahlreichen NMR-Spektren danke ich Dr. D. Ströhl, Yvonne Schiller und B.Sc. S. Kuring. Ein besonderer Dank geht an Dr. R. Kluge für die Anfertigung der ESI-MS-Spektren, die vielen hilfreichen Gespräche sowie für die angenehme gemeinsame Zeit im Praktikum. Bei B.Sc. V. Simon und J. Pech bedanke ich mich für die UV/Vis-, IR- und Drehwertmessungen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die finanzielle und moralische Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Ein letzter Dank gilt meiner Freundin Jana für die stetige Unterstützung in allen Bereichen meines Lebens. Danke, dass es Dich gibt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Pentacyclische Triterpene	1
1.2 Maslinsäure	3
1.3 Geschichte zur strukturellen Aufklärung	3
1.3.1 Vorkommen	5
1.3.2 Allgemeine Pharmakologische Wirkung	6
1.3.3 Zytotoxische Wirkung von Maslinsäure	8
1.3.4 Zytotoxische Wirkung von Maslinsäure-Derivaten	10
1.4 Apoptose – der kontrollierte Zelltod	11
1.5 Carboanhydrasen als Ziel von Antitumortherapie	12
2 Zielstellung	13
3 Zusammenfassung und Einordnung der Forschungsergebnisse	14
3.1 Sulfamate von Triterpenmethylestern als Inhibitoren von Carboanhydrase II und deren zytotoxische Wirkung	14
3.2 „Large-Scale“-Synthese von Maslinsäure und Augustussäure	16
3.3 Synthesen der vier diastereomeren 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-28-säuren	18
3.4 Harnstoff-Derivate der Maslinsäure	19
3.5 Selektive Antitumoraktivität bei Chinolin-substituierten Triterpen-Carbonsäure-Amiden	20
3.6 Maslinsäure-Rhodamin B-Konjugate	23
4 Zusammenfassung der Dissertation	26
5 Literaturverzeichnis	29
6 Abbildungsverzeichnis	38
7 Tabellenverzeichnis	39
8 Anhang	40
8.1 Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II	41
8.2 Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates	42
8.3 Convenient and chromatography-free partial syntheses of maslinic acid and augustic acid	43
8.4 Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid	44

8.5 Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines.....	45
8.6 Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment	46
8.7 Rhodamin B conjugates of triterpenoic acids are mitocans and cytotoxic even at nanomolar concentrations.....	47
Lebenslauf	V
Publikationsliste	VI
Erklärung über Autorenanteil.....	IX
Selbstständigkeitserklärung.....	XII

Abkürzungsverzeichnis

α (<i>alpha</i>)-Stellung	Substituent unterhalb der Molekülebene
Ac	Acetyl
β (<i>beta</i>)-Stellung	Substituent oberhalb der Molekülebene
Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH3	Bcl-2 Homologe Domäne 3
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
CA	Carboanhydrase
COX	Cyclooxygenase
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
et al.	und andere
F _{SI}	Selektivitätsfaktor
HIF-1a	Hypoxie induzierter Faktor
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
K _i	Inhibitionskonstante
max	maximal
<i>m</i> CPBA	<i>Meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRP-1	Multidrug Resistance Protein 1
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n.d.	nicht definiert
p53	Tumorsuppressorprotein
RNA	Ribonukleinsäure
R	Rest

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S.	Seite
SAR	Structure- Activity Relationship
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SRB	Sulforhodamine B
TNF- α	Tumornekrosefaktor <i>alpha</i>
u.a.	Unter anderem
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase Plasminogen Activator Receptor
UV	Ultraviolettes (Licht)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIS	Sichtbares (Licht)
vs.	<i>Versus</i>
XIAP	X-Linked Inhibitor of Apoptosis

1 Einleitung

Auch heutzutage zählt Krebs immer noch zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten – allein im Jahr 2012 wurden 8,2 Millionen Todesfälle registriert die auf Krebs zurückzuführen sind. Prognosen zufolge steigt diese Zahl innerhalb der nächsten 20 Jahre auf 13 Millionen an.^{1,2} Bei der Diagnose „Krebs“ sind die Behandlungsmöglichkeiten oft auf eine operative Entfernung, Radiotherapie oder Chemotherapie bzw. deren Kombination beschränkt. Die meisten Chemotherapeutika, die sich in klinischer Anwendung zur Bekämpfung von Krebs befinden, besitzen jedoch immer noch ein zu hohes Maß an unselektiver Toxizität. So weist z.B. Cisplatin eine hohe Aktivität gegen Tumore auf;³ der Einsatz ist jedoch aufgrund der nephro- und neurotoxischen Nebenwirkungen stark eingeschränkt.⁴ Bei der zukünftigen Entwicklung moderner Chemotherapeutika muss also der Fokus darin bestehen, Tumorzellen möglichst selektiv zu bekämpfen, ohne dabei die gesunde Zellpopulation zu beeinträchtigen. Für diese Herausforderung liefert z.B. die Naturstoffchemie ein breites Spektrum an potentiellen Arzneimitteln, die für eine gezieltere Anwendung in der Chemotherapie geeignet erscheinen.⁵ Bereits heute zählen nahezu die Hälfte (48 %) aller Antitumormittel, die seit dem Beginn der klassischen Chemotherapie für die Krebsbekämpfung eingesetzt werden, zu den Naturstoffen bzw. leiten sich von diesen ab. Werden Arzneimittel hinzugezählt die eine oder mehrere Eigenschaften von natürlichen Substraten nachahmen, steigt der prozentuale Anteil sogar auf 66 % an.⁶ Diese Zahlen verdeutlichen den überaus hohen Stellenwert von Naturstoffen in der modernen Medizin, aber auch das enorme Potential für die Zukunft.

1.1 Pentacyclische Triterpene

Als typische Vertreter der Naturstoffe stellen auch pentacyclische Triterpen-Carbonsäuren eine vielversprechende Verbindungsklasse zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar.⁷ Triterpene gehören der Gruppe der Terpenoide an, welche sich basierend auf der Anzahl der Isopren-Einheiten im Gerüst in Hemiterpene (C5), Monoterpene (C10), Sesquiterpene (C15), Diterpene (C20), Sesterterpene (C25), Triterpene (C30) und Tetraterpene (C40) einteilen lassen.⁸ Sie beschreiben eine vielfältige Gruppe von Naturstoffen ausgehend vom Squalen – über 4000 Triterpene wurden bereits isoliert und konnten nahezu 40 Grundgerüsttypen zugeordnet werden.⁹

Unter den Triterpenoiden weisen die biogenen pentacyclischen Triterpene die größte Bandbreite an biologischem Potential auf. Ihnen wird u.a. eine antitumor sowie entzündungs-

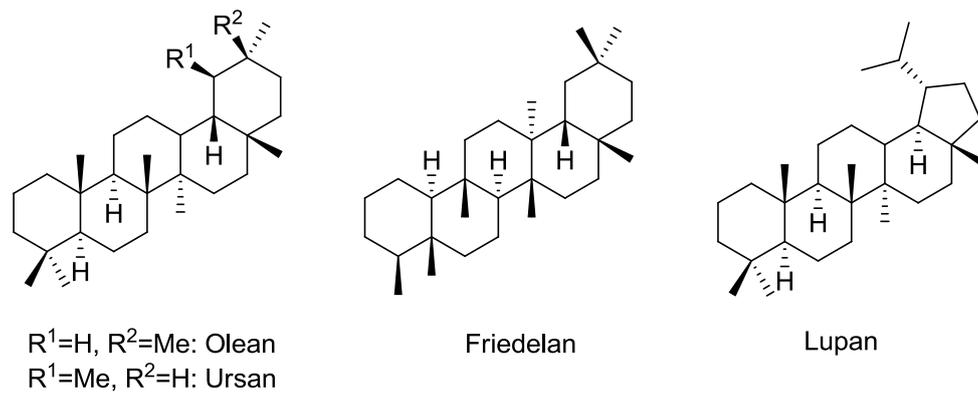


Abbildung 1: Triterpen Grundgerüst-Typen

hemmende Wirkung zugeschrieben, gefolgt von bacteriziden, fungiziden, antiviralen, zytotoxischen, analgesischen, spermiciden, cardiovasculären und anti-allergenen Eigenschaften. Ihr Grundgerüst, basierend auf 30 Kohlenstoffatomen, gliedert sich entweder in fünf Sechsringe (Ursan-, Olean- und Friedelan-Typ) oder in vier Sechsringe und einen Fünfring (Lupan-Typ) (Abbildung 1).⁵

Innerhalb der letzten Jahre ist dem Bereich der Triterpen-Carbonsäuren ein wachsendes Interesse zu Teil geworden – nahezu 40 % aller Publikationen dieses Themengebietes wurden während der letzten fünf Jahre veröffentlicht (SciFinder Recherche basierend auf α -Amyrin-, β -Amyrin und Lupan-Grundgerüst). Vor allem Oleanolsäure und deren Derivate wurden bezüglich ihrer biologischen Aktivität bereits eingehend untersucht und sind darüber hinaus mittlerweile kommerziell leicht zugänglich. Charakteristisch für Oleanolsäure ist die Hydroxy-Gruppe an Position C-3, eine Doppelbindung zwischen Position C-12 und C-13 sowie eine Carboxy-Gruppe an Position C-28. Die Biosynthese von Oleanolsäure ausgehend von 2,3-Oxidosqualen wird in Abbildung 2 gezeigt.¹⁰ Die Bezifferung spiegelt die offizielle Nummerierung nach IUPAC wider.¹¹

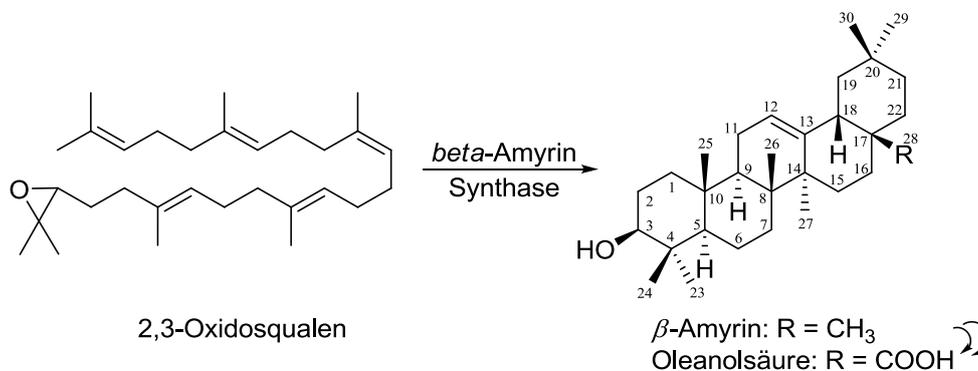


Abbildung 2: Biosynthese von Oleanolsäure ausgehend von 2,3-Oxidosqualen

1.2 Maslinsäure

Maslinsäure (Abbildung 3) ist eine pentacyclische Triterpen-Carbonsäure basierend auf dem Olean-Grundgerüst. Ebenso wie die Oleanolsäure besitzt sie eine Carboxy-Gruppe an C-28 sowie eine Doppelbindung an C-12 und eine *beta*-ständige OH-Gruppe an C-3. Darüber hinaus besitzt Maslinsäure eine weitere, in diesem Fall *alpha*-ständige OH-Gruppe an

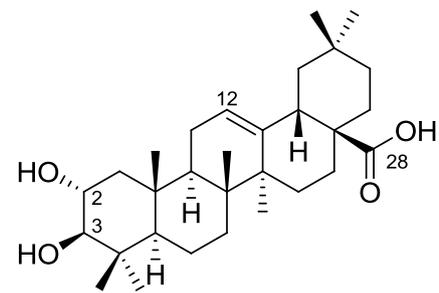


Abbildung 3: Struktur von Maslinsäure

C-2. Daraus ergeben sich für die Maslinsäure drei weitere Konformationsisomere – die Augustussäure ($2\beta,3\beta$), die 2-*epi*-Maslinsäure ($2\alpha,3\alpha$) und die Bredemolsäure ($2\beta,3\alpha$). Die Aufklärung der genauen Position dieser zusätzlichen OH-Gruppe, ebenso wie deren Konfiguration blieb auch lange Zeit nach der Entdeckung der Maslinsäure ungeklärt. Die insgesamt 34 Jahre andauernde Suche soll nachfolgend kurz beschrieben werden.

1.3 Geschichte zur strukturellen Aufklärung

Maslinsäure wurde erstmals im Jahre 1927 von BÄCHLER¹² im Zuge seiner Dissertation gewonnen. Aus dem Ether-Extrakt der Blätter des Weißdorns (*Crataegus oxyacantha*) isolierte er eine weiße, amorphe Substanz, die er fortan als Crataegussäure bezeichnete. Er ordnete ihr zwar fälschlicherweise die Summenformel $C_{32}H_{52}O_4$ zu, erkannte aber das Vorhandensein einer Carboxy-Gruppe. DIETERLE und DORNER¹³ bezweifelten somit zu Unrecht im Jahre 1937 die Existenz der Säurefunktion aufgrund einer nicht funktionierenden Ester-Bildung (HCl/MeOH) sowie einer fehlgeschlagenen alkalischen Titration. Der von ihnen auf dieser Grundlage basierende Strukturvorschlag eines Crataeguslaktons wurde erst im Jahr 1951 von TSCHESCHE¹⁴ widerlegt. Er erkannte auch, dass es sich bei der BÄCHLERSchen Crataegussäure um ein Gemisch von mindestens zwei Substanzen handeln musste. Nach sorgfältiger Umkristallisation konnte er nicht nur die korrekte Summenformel $C_{30}H_{48}O_4$ sondern auch das Vorhandensein einer Carboxy-Gruppe und zweier OH-Gruppen nachweisen. Aus dieser Erkenntnis heraus bezeichnete er seine Verbindung als Crataegolsäure – wohlwissend, dass es sich trotzdem um ein Gemisch aus zwei Isomeren handelte. In

Abbildung 4 ist der Strukturvorschlag für die Crataegolsäure dargestellt.

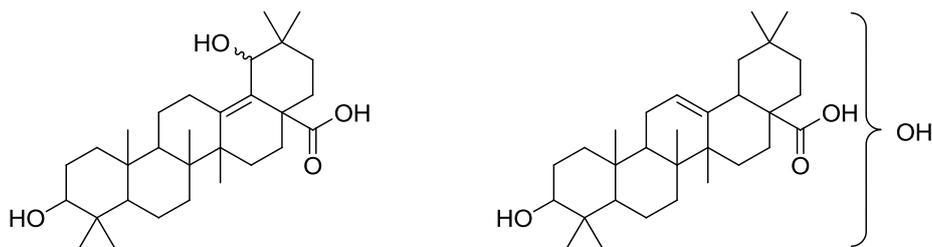


Abbildung 4: Strukturvorschlag von TSCHESCHE für Crataegolsäure aus dem Jahr 1951 (links) und 1958 (rechts)

Aufgrund der falschen Positionierung der Doppelbindung im D-Ring vollzog TSCHESCHE eine Reihe falscher Schlussfolgerungen an deren Ende er sogar die von RUZICKA^{15,16} entwickelte Struktur der α -Amyrine in Frage stellte.

Ebenfalls 1951 identifizierten BERSIN und MÜLLER die Hauptkomponente des Crataegosäure-Gemisches als Ursolsäure und postulierten nur ein Jahr später, dass es sich um ein Gemisch aus Ursolsäure, Oleanolsäure und β -Sitosterin handele.^{17,18} Sie bezweifelten sogar die Existenz der von TSCHESCHE isolierten Crataegolsäure und verwiesen auf die Schmelzpunkt-Äquivalenz eines 4:1 Gemisches von Ursolsäure und Oleanolsäure mit Crataegolsäure. Daraufhin verteidigte TSCHESCHE¹⁹ 1953 zunächst die Existenz „seiner“ Crataegolsäure durch die erfolgreiche Reindarstellung des Methylesters und den Vergleich der Schmelzpunkte der entsprechenden Ursol- und Oleanolsäureester. Dennoch musste er im Jahr 1959 erkennen, dass es sich bei der gesuchten Struktur doch um einen β -Amyrin Typ mit der Doppelbindung zwischen C-12 und C-13 handelte.²⁰ Die Position der fehlenden OH-Gruppe konnte dem Grundgerüst dennoch nicht zugeordnet werden (Abbildung 4).

Eine endgültige Aufklärung der Konstitution gelang erst 1961 durch CAGLIOTI und CAINELLI.²¹ Sie isolierten aus Oliventrester eine Substanz, deren molekulare Zusammensetzung und Struktur identisch zur Crataegolsäure zu sein schien und gaben ihr den Namen Maslinsäure. Ein Jahr später bestätigten CAGLIOTI und CAINELLI²² die $2\alpha,3\beta$ -Konfiguration von Maslinsäure durch eine Partialsynthese ausgehend von Oleanolsäure und stellten die Übereinstimmung mit einer Probe von TSCHESCHE's Crataegolsäure fest.

1.3.1 Vorkommen

Mit wachsendem Interesse in Bezug auf pentacyclische Triterpene wurden im Laufe der Jahre zahlreiche Pflanzenarten entdeckt, die zum Teil erhebliche Mengen an Maslinsäure enthalten. Bereits CAGLIOTI und CAINELLI²¹ isolierten Maslinsäure aus Olivenschalen von *Olea europaea* – einem immergrünen Baum, der vorrangig im Mittelmeerraum heimisch ist (Abbildung 5). Auch im Olivenöl lässt sich Maslinsäure (19 – 251 mg/kg) nachweisen. Der Gehalt variiert jedoch nicht nur nach Sorte, vielmehr scheint der Erntezeitraum eine entscheidende Rolle zu spielen. Obwohl

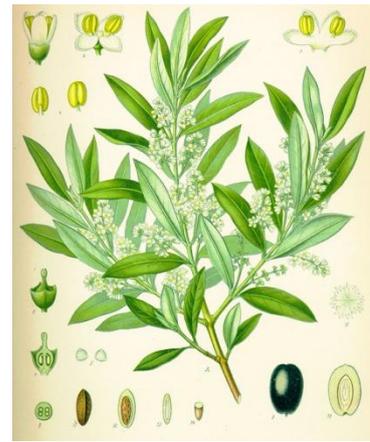


Abbildung 5: Olivenzweig mit Frucht und Blüte²³

das Erntedatum teilweise nur einen Monat auseinander lag, konnten PEREZ-CAMINO und CERT²³ nachweisen, dass der Maslinsäure-Gehalt des resultierenden Olivenöls gegen Jahresende um den Faktor 3 abnimmt. Bei dem Versuch der Funktion von Maslinsäure als sekundärem Pflanzenmetaboliten nachzugehen, haben KOMBARGI *et al.*²⁴ eine erstaunliche Schutzwirkung nachweisen können. Sie konnten zeigen, dass Früchte von *Olea europaea* gegen die Eiablage der Oliven-Fruchtfliege immun werden, wenn sie vorher mit Maslinsäure-Lösung behandelt wurden. Solche Abwehrmechanismen gegen Fraßfeinde können einen entscheidenden evolutionären Vorteil darstellen und sind wahrscheinlich u.a. der Grund für die weitläufige Verbreitung von pentacyclischen Triterpenen wie der Maslinsäure im Mittelmeerraum.

Auch in anderen Obstsorten wie in Äpfeln^{25,26}, Birnen²⁷ oder in Mandarinen²⁸ ist Maslinsäure zu finden, darüber hinaus auch in gängigen Gemüsesorten wie dem Spinat²⁹, der Aubergine²⁹ oder in bestimmten Kartoffelsorten³⁰. Höhere Konzentrationen werden vor allem in verschiedenen Gewürzen und Kräutern wie dem Senf³¹, Pfeffer³² und Salbei^{33,34}, aber auch in der Gewürznelke³⁵ gefunden. Des Weiteren sind verschiedene Walnussgewächse³⁶⁻³⁸, Lippenblütler^{39,40} und diverse Baumarten⁴¹⁻⁴⁵ als natürliche Quelle von Maslinsäure zu nennen.

1.3.2 Allgemeine Pharmakologische Wirkung

Basierend auf den BÄCHLERSchen Forschungsergebnissen wurden bereits 1952 Untersuchungen der Crataegus-Wirkstoffe auf den Kreislauf durchgeführt. SCHIMERT und BLÖMER⁴⁶ führten dazu Analysen an gemischtrassigen mittelgroßen Hunden durch. Dabei injizierten sie den Versuchstieren 1 – 2 cm³ einer 1 %-igen Lösung verschiedener Triterpensäuren (u.a. die zu dieser Zeit noch als Crataeguslaktone bezeichnete Maslinsäure) und stellten eine Steigerung der Herzkranzgefäßdurchblutung fest. Eine Überprüfung der Ergebnisse von DÖRNER und KUSCHKE⁴⁷ im Jahr 1954 zeigte aber, dass es sich bei den Beobachtungen lediglich um die toxischen Folgen von Lungenschädigungen handelte, die durch den 96 %-igen Alkohol und die im Blut ausgefallenen Triterpensäuren hervorgerufen wurden.

Abgesehen von dieser tragischen Fehlinterpretation belegen jedoch diverse Studien das breitgefächerte pharmakologische Spektrum von Maslinsäure. Das große Potential als Antioxidans erkannten erstmals MONTILLA *et al.*⁴⁸ im Jahr 2003. Seit dem haben auch andere Arbeitsgruppen Belege zur antioxidativen Wirkung von Maslinsäure als Radikalfänger gesammelt.⁴⁹⁻⁵¹

Darüber hinaus wirkt Maslinsäure als Glykogen Phosphorylase Inhibitor bei Ratten mit Diabetes Typ 2 und kann somit Nervenschädigungen vorbeugen.⁵² Ein ähnliches Target verfolgten QIU *et al.*⁵³ und identifizierten Maslinsäure als Inhibitor der Protein Tyrosin Phosphatase 1B. Durch Derivatisierung konnten sie somit potentielle Therapeutika gegen Diabetes und Fettleibigkeit

entwickeln. Ein sehr ungewöhnliches Anwendungsgebiet entdeckten FERNÁNDEZ-NAVARRO *et al.*^{54,55}, als sie den Einfluss von Maslinsäure als Nahrungsergänzungsmittel bei Forellen untersuchten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung des Gesamtkörpergewichts um durchschnittlich 29,2 % erzielt wurde, wenn den Forellen eine tägliche Dosis von 250 mg/kg Maslinsäure über einen Zeitraum von 225 Tagen verabreicht wurde (Abbildung 6). Eine gesteigerte Protein-Synthese sowie eine Zunahme des Gesamtgehaltes an DNA und RNA wurden ebenso nachgewiesen wie ein erhöhtes Gewicht der Leber. Da die Leber eine zentrale Rolle bei dem Proteinmetabolismus einnimmt, führten RUFINO-PALOMERAS *et al.*⁵⁶ eine Studie unter ähnlichen Bedingungen bei Doraden durch. Sie konnten 19 Proteine identifizieren deren Expression durch die Zugabe von Maslinsäure als Futtermittelzusatz

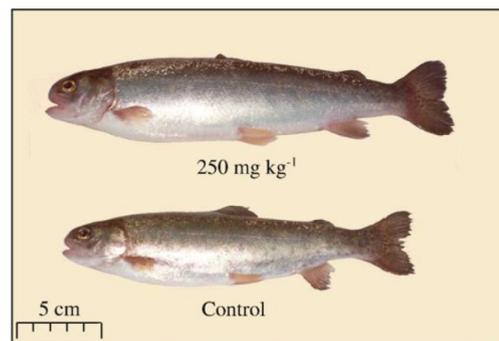


Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Forellen mit (250 mg/kg, oben) und ohne (unten) Maslinsäure als Futtermittelzusatz. Abbildung aus FERNÁNDEZ-NAVARRO *et al.*⁵⁵

reguliert wurden. In diesem Jahr konnten die gleiche Arbeitsgruppe Maslinsäure als Stimulans für die NADPH Produktion bei Goldbrassen identifizieren.⁵⁷ Darüber hinaus konnte Maslinsäure neben einer schwachen antimikrobiellen Wirkung⁵⁸ auch eine Aktivität gegen Malaria⁵⁹ und HIV⁶⁰ zugeschrieben werden. In Tierversuchen konnte sogar eine schmerzunterdrückende Wirkung von Maslinsäure bei Mäusen festgestellt werden.⁶¹ Die allgemeine Verabreichung von Maslinsäure ist in Studien von SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*⁶² als unbedenklich einzustufen. Sie konnten bei einer einmaligen Verabreichung von 1000 mg/kg sowie einer täglichen Dosis von 50 mg/kg Maslinsäure keine toxischen Effekte bei der Untersuchung an Mäusen feststellen.

1.3.3 Zytotoxische Wirkung von Maslinsäure

Hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials wurde Maslinsäure erstmals von YAMAGISHI *et al.*⁶³ im Jahr 1988 untersucht. Sie analysierten den methanolischen Extrakt von *Hyptis capitata*, fanden jedoch bei fünf verschiedenen Krebszelllinien keine Aktivität für Maslinsäure in dem von Ihnen untersuchten Bereich bis 21 µM. Bei der Untersuchung der einzelnen Komponenten von Goreshi, einer als antitumoraktiv bekannten traditionellen chinesischen Medizin, ordneten NUMATA *et al.*⁶⁴ der Maslinsäure 1989 erstmals einen EC₅₀-Wert (EC₅₀ = 27,5 µM, P-388) zu. Erst 17 Jahre später schilderten REYES *et al.*⁶⁵ und JUAN *et al.*^{66,67} zeitgleich die zytotoxischen Auswirkungen von Maslinsäure auf zellulärer Ebene und erkannten u.a. die Apoptose auslösende Wirkung sowie eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Effektor-Caspase 3. In den darauffolgenden Jahren beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Untersuchung der zellulären Effekte, die von Maslinsäure hervorgerufen wurden. Bis ins Jahr 2016 existieren 14 Veröffentlichungen, die nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt sind und sich zusammenfassend damit beschäftigen, den Wirkmechanismus für Maslinsäure zu entschlüsseln. Die Ergebnisse schienen sich jedoch teilweise widersprüchlich zu verhalten. Die Untersuchungen von JUAN *et al.*^{67,68} und REYES *et al.*^{65,69,70} an

HT29 Zellen ließen durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) sowie der Aktivierung von Caspase 9 eher auf eine intrinsisch, mitochondrial ausgelöste Apoptose schließen. Im Gegensatz dazu fanden BAI *et al.*⁷¹ bei ihren Untersuchungen an A549 Zellen eine Aktivierung der Caspase 8 – einer Initiator-Caspase, die eine wichtige Rolle bei der Todesrezeptor vermittelten Induzierung von Apoptose spielt. Das Rätsel wurde schlussendlich von REYES *et al.*⁷² im Jahr 2016 gelöst. Die Ergebnisse belegen, dass Maslinsäure bei unterschiedlichen Zelllinien ebenfalls unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen kann. Bei der HT29 Zelllinie verläuft die Induktion der Apoptose durch einen intrinsischen Weg über mitochondriale Aktivierung, während bei Caco-2 Zellen die zytotoxische Wirkung von Maslinsäure über einen intrinsisch apoptotischen Mechanismus abläuft (Abbildung 7).

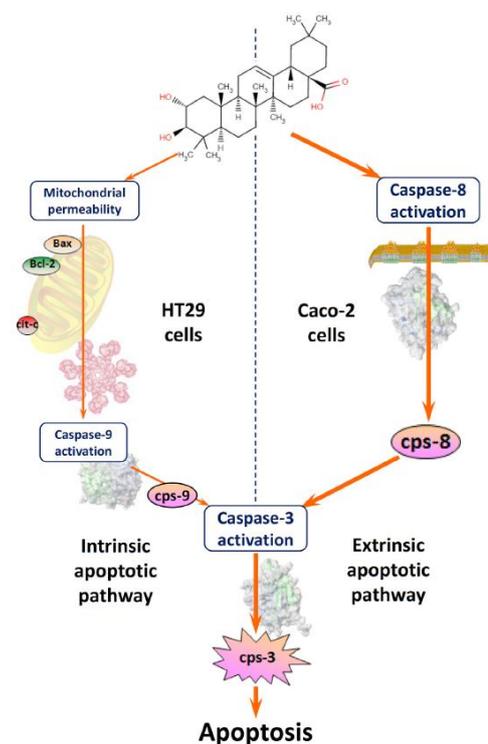


Abbildung 7: Unterschiedliche Wirkmechanismen von Maslinsäure. Abbildung von REYES *et al.*⁷²

Tabelle 1: Bei der Untersuchung von Maslinsäure verwendete Zelllinien und gewonnener Erkenntnisstand;
 ↑ erhöhte Aktivität, ↓ verringerte Aktivität

Autor, Jahr	Zelllinie, EC₅₀	Ergebnisse der Untersuchungen
YAMAGISHI <i>et al.</i> ⁶³ 1988	u.a. A549 (> 21 µM) HCT-8 (> 21 µM)	/
NUMATA <i>et al.</i> ⁶⁴ 1989	P-388 (28 µM, 72 h)	/
JUAN <i>et al.</i> ⁶⁷ 2006	HT29 (74 µM, 72 h, Rohextrakt)	Apoptose; ↑ Caspase 3; Bildung von ROS
REYES <i>et al.</i> ⁶⁵ 2006	HT29 (61 µM, 72 h) Caco-2 (85 µM, 72 h)	Apoptose; ↑ Caspase 3; Zellzyklus Arrest; ↑ alkalische Phosphatase
MARTIN <i>et al.</i> ⁷³ 2007	1321N1 Astrozytom (25 µM, 24 h)	Apoptose; ↑ Caspase 3; Bildung von ROS; ↓ Mitochondrien-Potential
JUAN <i>et al.</i> ⁶⁸ 2008	HT29 (101 µM, 72 h)	Apoptose; ↑ Caspase 3; Bildung von ROS
REYES <i>et al.</i> ⁶⁹ 2009	HT29 (61 µM, 72 h)	Apoptose; ↓ Bcl-2; ↑ Bax; ↑ Cytochrom-c; ↑ Caspase 9; ↑ Caspase 3
LI <i>et al.</i> ⁷⁴ 2010	Panc-28 (50 µM, 42 h) AsPC-1 (> 50 µM, 42 h) BxPC-3 (> 50 µM, 42 h)	↑ TNFα; ↓ Tumorwachstum
HSUM <i>et al.</i> ⁷⁵ 2011	Raji B Lymphom	↑ COX-2
REYES <i>et al.</i> ⁷⁰ 2011	HT29 (61 µM, 72 h)	↑ JNK; ↑ p53; ↓ Bcl-2; ↑ Bid; ↑ Bax; ↑ Cytochrom-c; ↑ Caspase 3; ↑ Caspase 7; ↑ Caspase 8; ↑ Caspase 9
WU <i>et al.</i> ⁷⁶ 2011	ACC-2 (44 µM, 24 h) ACC-M (46 µM, 24 h)	Apoptose; ↑ Caspase 3; Zellzyklus Arrest
MOOI <i>et al.</i> ⁷⁷ 2012	Raji B Lymphom	↓ Protein Kinase C
PARK <i>et al.</i> ⁷⁸ 2013	DU-145	↓ Tumorzellmigration, ↓ -invasion, ↓ -adhäsion; ↓ HIF-1α; ↓ VEGF; ↓ MMP; ↓ uPA; ↓ uPAR; ↓ E-cadherin; ↓ ICAM; ↓ VCAM
ZHANG <i>et al.</i> ⁷⁹ 2014	Verschiedene Blutkrebszelllinien u.a. T24 (33 µM, 48 h) RT4 (43 µM, 48 h)	Apoptose; ↑ p-38-mitogenaktivierte Proteinkinase
HSIA <i>et al.</i> ⁸⁰ 2014	A549 (~12 µM, 72 h, normoxisch), (~32 µM, 72 h, hypoxisch)	Auswirkungen von hypoxische bzw. normoxische Bedingungen auf Apoptose
VILLAR <i>et al.</i> ⁸¹ 2014	SW 982 (45 µM, 24 h) SK-UT-1 (59 µM, 24 h)	↓ MRP-1 bei Coinkubation mit Doxorubicin
BAI <i>et al.</i> ⁷¹ 2015	A549 (15 µM, 24 h)	Apoptose; ↑ Spaltung von Caspase 8, Caspase 3 und Caspase 9; ↑ Smac; ↓ c-IAP1; ↓ c-IAP2; ↓ XIAP; ↓ Survivin
REYES <i>et al.</i> ⁷² 2016	Caco (41 µM, 72 h)	Apoptose; ↑ Caspase 8; ↑ Caspase 3

1.3.4 Zytotoxische Wirkung von Maslinsäure-Derivaten

Über die antitumoraktive Wirkung von Maslinsäure-Derivaten wurde erstmals im Jahr 2011 von PARRA *et al.*⁸² ausführlich berichtet. Dabei konzentrierten sie sich primär auf Derivatisierungsreaktionen des A-Rings sowie an Position C-28. Zusammen mit Verbindungen aus früheren Publikationen (u.a. C- und E-Ring Oxidationen) wurden insgesamt 40 Derivate der Maslinsäure hinsichtlich ihres Apoptose auslösenden Potentials bei B16F10 Maus-Melanom Zellen untersucht. Krebszellen, die beispielsweise mit dem primären Maslinsäure-Amid behandelt wurden, befanden sich nach 48 Stunden zu 97 % im Stadium der Apoptose.

Mit Derivatisierungsreaktionen an Position C-28 beschäftigten sich 2013 auch SIEWERT *et al.*⁸³ und synthetisierten insgesamt 28 Ester und Amide der Maslinsäure. Sie untersuchten die Verbindungen auf ihre zytotoxische Aktivität hinsichtlich sechs Tumorzelllinien mit Hilfe eines photometrischen Sulforhodamin-B-Assays (SRB-Assay) und konnten ein erhöhtes zytotoxisches Potential für kurzkettige, lipophile Ester nachweisen. Die langkettigen Ester der Maslinsäure sowie die Amide wiesen nur eine geringe biologische Aktivität auf.

Ein Jahr später veröffentlichten SIEWERT *et al.*⁸⁴ eine weitere Studie über C-Ring modifizierte Triterpenoide. Die entsprechend modifizierten Maslinsäure-Derivate besaßen jedoch keine signifikante Steigerung des zytotoxischen Potentials im Vergleich zur Maslinsäure. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei PARRA *et al.*⁸⁵ 2014 bei der Untersuchung verschiedener acylierter Maslinsäure-Derivate bzw. derer Benzylester ab.

Eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Wirkung konnten SIEWERT *et al.*⁸⁶ erstmalig im Jahr 2014 verzeichnen. Bei der biologischen Evaluierung von weiteren Maslinsäure-Estern sowie Amidn entdeckten sie das Benzylamid der zweifach acetylierten Maslinsäure („EM2“, Abbildung 8). Es zeigte mit einem $EC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$ bezüglich der Eierstock-Krebszelllinie A2780 ein außerordentlich hohes zytotoxisches Potential, bei einem gleichzeitig hohen EC_{50} -Wert für die nicht maligne Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 ($EC_{50} = 33,8 \mu\text{M}$). EM2 scheint demnach um den Faktor 68 selektiver die Tumorzellen anzugreifen als die nicht malignen Zellen der NIH 3T3. Darüber hinaus konnten SIEWERT *et al.*⁸⁶ nachweisen, dass EM2 Apoptose auslöst und über einen Caspasen unabhängigen Mechanismus wirkt.

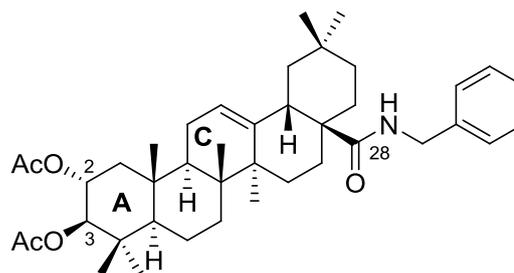


Abbildung 8: Struktur von EM2

Ebenfalls im Jahr 2014 synthetisierten PARRA *et al.*⁸⁷ eine Reihe bifunktionalisierter Maslinsäure-Derivate durch Festphasen-Peptidsynthese und konnten somit bei einigen Verbindungen eine Steigerung des zytotoxischen Potentials gegenüber Maslinsäure um den Faktor 23 erzielen.

Neueste Forschungen von MEDINA-O'DONNELL *et al.*⁸⁸ zeigten, dass eine Steigerung des antiproliferativen Potentials von Maslinsäure durch Verknüpfung mit Polyethylenglycol-Fragmenten möglich ist.

1.4 Apoptose – der kontrollierte Zelltod

Zelltod kann auf unterschiedliche Art und Weise eintreten, wobei eine grobe Einteilung in Apoptose und Nekrose getroffen werden kann – doch existieren auch Zwischenstufen, wie z.B. die sekundäre Nekrose.⁸⁹ Der Prozess der Nekrose wird als ein von Umweltstörungen ausgelöster zufälliger Zelltod bezeichnet. Durch eine Störung der Ionenpumpen kommt es zu einer gesteigerten Osmose, wodurch sich die Zelle immer weiter vergrößert bis sie letztlich platzt. Die unkontrollierte Freisetzung der zellulären Bestandteile kann anschließend zu Entzündungserscheinungen führen.^{90,91}

Die Apoptose beschreibt den kontrollierten Zelltod und unterscheidet sich von der Nekrose in vielerlei Hinsicht. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es bei der Apoptose zunächst zu einem Schrumpfen der Zelle. Der Prozess führt zu einem Anstieg des pH-Wertes und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials.⁹²⁻⁹⁴ Außerdem ist die Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas zu beobachten.^{95,96} Im weiteren Verlauf bilden sich zunächst Ausstülpungen, die anschließend als sogenannte apoptotische Körperchen von der Zelle abgetrennt und im Endeffekt von Phagozyten kontrolliert abgebaut werden.⁹⁷ Dieser Vorgang wird als Phagozytose⁹⁸ bezeichnet. Dabei transferieren die sterbenden Zellen Phosphatidylserin⁹⁹ von der innenliegenden Seite der Membran auf die Außenseite der Membran. Dies begünstigt die Erkennung von apoptotischen Zellen und beschleunigt somit den Prozess der Apoptose. Bei der Therapie von Krebserkrankungen ist demnach der Apoptose induzierte Zelltod ein erstrebenswertes Ziel, um im Endeffekt das Maß an ungewünschten Begleiterscheinungen auf ein Minimum zu reduzieren.

1.5 Carboanhydrasen als Ziel von Antitumorthherapie

Enzyme nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung des Metabolismus aller Organismen ein. Als eine große Gruppe von Enzymen spielen die α -Carboanhydrasen (CA) nicht nur bei Mensch und Tier, sondern vielmehr bei der Gesamtheit aller Wirbeltiere, eukariotischer Einzeller und grünen Pflanzen eine übergeordnete Rolle.¹⁰⁰⁻¹⁰² Im menschlichen Körper regulieren die CAs beispielsweise die pH-Homöostase^{103,104} durch Katalyse der zweistufigen Hydrierung von Kohlenstoffdioxid.^{105,106} Mittlerweile ist die Existenz von 16 CA Isozymen bekannt, die zahlreiche Funktionen im menschlichen Körper einnehmen.¹⁰⁷ Studien belegen eine Überexprimierung bestimmter CAs (u.a. CA IX und CA XII) bei einer Vielzahl von menschlichen Tumoren und ziehen eine Verbindung zu dem aggressiven Verhalten und der Entwicklung von tumorösem Gewebe.¹⁰⁸⁻¹¹¹ CA IX ist ein transmembranes Protein von dem vermutet wird, dass es unter anderem einen Einfluss auf die Anpassung von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen ausübt.¹¹²⁻¹¹⁴ Diese Tatsache macht die CA IX zu einem interessanten Ausgangspunkt für die Entwicklung von selektiven Antitumorthapien.^{115,116} Ein Nachteil bei dieser Überlegung ist jedoch der Fakt, dass die CA IX vergleichsweise instabil und darüber hinaus sehr kostenintensiv ist. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits nachgewiesen, dass effektive Inhibitoren der CA IX in den meisten Fällen auch die weitaus stabilere und kostengünstigere CA II inhibieren.¹¹⁷⁻¹²¹ Es ist demnach als sinnvoll zu betrachten, potentielle aktive Verbindungen zunächst hinsichtlich ihrer Inhibierung von CA II zu untersuchen um somit ein effizienteres Screening gewährleisten zu können.

Die Carboanhydrase Isozym II zählt zu den am besten untersuchten Isozymen und besitzt unter den CAs die höchste katalytische Produktivität ($k_{\text{kat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$). Der Hohlraum ihres aktiven Zentrums besitzt einen Durchmesser sowie eine Tiefe von 15 Å und beinhaltet ein Zink (II)-Ion, das tetraedrisch von drei Histidin-Resten und einem Wasser Liganden koordiniert wird (Abbildung 9).¹²²

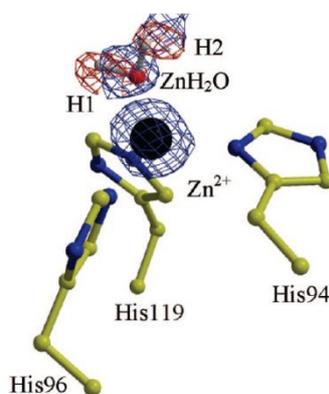


Abbildung 9: Ausschnitt von dem aktiven Zentrum der hCA II mit Zink (II)-Ion (schwarz).
Abbildung aus SILVERMAN und MCKENNA¹²²

2 Zielstellung

Das Interesse an der Synthese und der wirkmechanistischen Aufklärung von antitumoraktiven Triterpen-Carbonsäuren und derer Derivate erlebte zweifelsfrei innerhalb der letzten Jahre eine wahre Renaissance. Während Oleanolsäure mittlerweile kostengünstig erworben werden kann und somit ein breites Spektrum an Forschung möglich ist, verbleibt der Preis von Maslinsäure weiterhin auf einem konstant hohen Niveau. Für weiterführende Tierversuche eines in unserer Arbeitsgruppe synthetisierten und vielversprechend antitumoraktiven Maslinsäure-Derivates (EM2) wurden größere Mengen an Maslinsäure benötigt. Ein Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung eines neuen Syntheseweges für Maslinsäure ausgehend von kostengünstiger Oleanolsäure, möglichst ohne die Verwendung von aufwendigen chromatographischen Methoden.

In Vorbereitung weiterer Derivatisierungen sollen die drei Isomere der Maslinsäure, die sich in den Konfigurationen der beiden OH-Gruppen am A-Ring unterscheiden, synthesechemisch ebenfalls ausgehend von Oleanolsäure zugänglich gemacht werden. Über Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Maslinsäure-Derivaten ist bisher in der Fachliteratur wenig bekannt. Durch gezielte strukturelle Modifikationen soll das Portfolio an antitumoraktiven Verbindungen ausgehend von Maslinsäure ausgebaut werden. Die synthetisierten Verbindungen sollen im Anschluss u.a. auf Basis eines photometrischen Sulforhodamin-B-Assays (SRB-Assay) hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials evaluiert werden. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei nicht nur der Steigerung der Antitumoraktivität sondern vielmehr dem selektiven zytotoxischen Verhalten gegenüber den humanen Krebszelllinien im Vergleich mit der nicht malignen Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3.

Weiterhin soll aufgeklärt werden, inwiefern sich eine Sulfamat-Gruppe als Target für die Carboanhydrase II eignet, um selektives Verhalten gegenüber Krebszellen hervorzurufen.

3 Zusammenfassung und Einordnung der Forschungsergebnisse

3.1 Sulfamate von Triterpenmethylestern als Inhibitoren von Carboanhydrase II und deren zytotoxische Wirkung

Von 2-Methoxyestradiol-*bis*-sulfamaten ist bekannt, dass sie eine antiproliferative und antiangiogene Wirkung besitzen und Apoptose vor allem bei der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF-7¹²³⁻¹²⁵ sowie in Brustkrebs Xenotransplantationen^{126,127} auslösen. Dieser Effekt basiert primär auf der Inhibierung von Enzymen der Carboanhydrase-Familie bzw. der Tubulin-Polymerisation. Im Gegensatz dazu ist über die biologische Aktivität und das Antitumorpotential von Triterpen-Sulfamaten wenig bekannt. Bisher wurde nur für das 3,28-Disulfamat des Betulins eine Inhibierung der Carboanhydrasen hCA II und hCA IX beschrieben.¹²¹ Um einen genauen

Eindruck von der Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Triterpen-Grundkörper zu bekommen, wurden zunächst die Methylester verschiedener Triterpen-Carbonsäuren (Oleanolsäure, Ursolsäure, Betulinsäure, Glycyrrhetinsäure, Platansäure und Maslinsäure) synthetisiert. Anschließend wurden die Methylester mit Sulfamoylchlorid¹²⁸ umgesetzt. Im Vergleich zu den restlichen Triterpen-Methylestern trägt der Maslinsäuremethylester zwei OH-Gruppen am A-Ring. Trotz Verwendung eines Überschusses an Sulfamoylchlorid konnten aufgrund des sterischen Einflusses jeweils nur

die an Position C-2 oder C-3 monosubstituierten Derivate erhalten werden (Abbildung 10). Das Potential der Verbindungen als Inhibitoren der Carboanhydrase II wurde anschließend in einem photometrischen Assay unter Verwendung von Carboanhydrase II aus Rinder-Erythrocyten und 4-Nitrophenylacetat als Substrat bestimmt.¹²⁹ Als Standard wurde in diesem Assay Acetazolamid verwendet – ein Sulfonamid mit breiter klinischer Anwendung¹³⁰ und einer Inhibierungskonstante von $K_i = 0,137 \mu\text{M}$ (kompetitiver Inhibitor). Unter allen

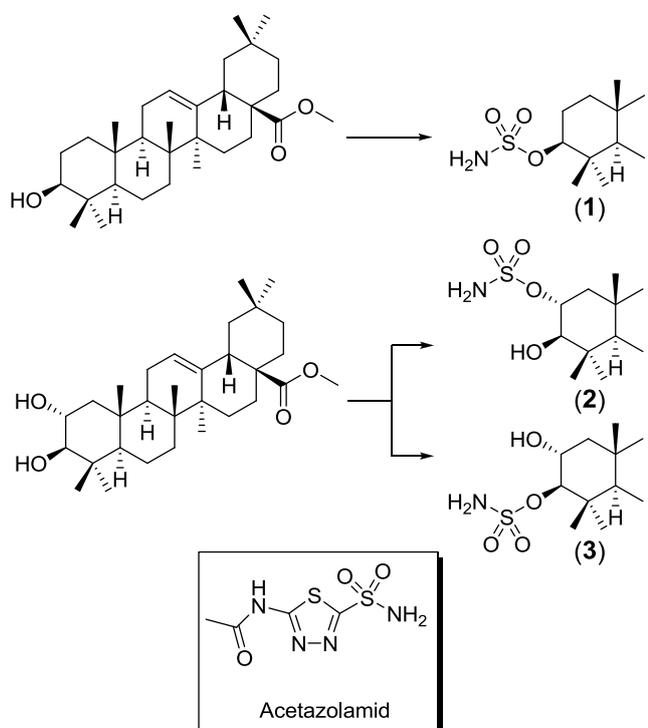


Abbildung 10: Syntheschema zur Darstellung der Triterpen-Sulfamate; Struktur der Referenzsubstanz Acetazolamid

getesteten Triterpen-Sulfamaten besitzt das Oleanolsäure-Derivat **1** mit einer Inhibierungskonstante von $K_i = 0,308 \mu\text{M}$ das größte Potential. Verbindung **1** ist somit halb so aktiv wie die Referenzsubstanz Acetazolamid und wirkt ebenfalls als kompetitiver Inhibitor der CA II. Interessanterweise tritt bei dem Maslinsäure-Derivat **3**, mit dem Sulfamat-Rest an Position C-3 und der freien OH-Gruppe an Position C-2, eine bereits deutlich verminderte Enzymaktivität ($K_i = 1,41 \mu\text{M}$) auf. Bei dem Maslinsäure-Derivat **2**, verschlechtert sich die Aktivität so weit, dass man mit einer Inhibierungskonstante von $K_i > 20 \mu\text{M}$ bereits an die Löslichkeitsgrenze gelangt. Es genügen demnach kleinste strukturelle Veränderungen am Triterpen um die Aktivität der Carboanhydrase II drastisch zu beeinflussen. Um die beobachteten Ergebnisse zu erklären, wurden Docking-Studien auf molekularer Ebene durchgeführt. Hierbei lässt sich für das aktive Oleanolsäure-Sulfamat **1** eine ähnliche Konformation ermitteln wie für das Acetazolamid. In der Enzymtasche sind beide Verbindungen weniger als 3 \AA von dem Zn^{2+} -Ion des aktiven Zentrums entfernt und können somit koordinative Wechselwirkungen ausbilden. Darüber hinaus sind weitere positive H- π -Wechselwirkungen mit Phe130 (Entfernung H- π kleiner $3,5 \text{ \AA}$) zu vermuten. Im Gegensatz dazu führt eine C-2 Substitution bei Verbindung **2** zu einer deutlichen Umorientierung – das Sulfamat dreht sich von dem Zn^{2+} -Ion weg (Distanz $4,6 \text{ \AA}$). Die dadurch resultierenden schwächeren koordinativen Wechselwirkungen spiegeln sich letztlich in den erheblich schlechteren Inhibierungskonstanten wider.

Wenn nun effektiv ein Zusammenhang zwischen der Inhibierung der Carboanhydrase II und einer gesteigerten Antitumoraktivität besteht, sollte das Oleanolsäure-Sulfamat **1** das größte zytotoxische Potential aufweisen. Die Verbindungen wurden daraufhin mit einem SRB-Assay hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber sechs humanen Tumorzelllinien und einer nicht malignen Mausfibroblasten-Zelllinie untersucht. Erstaunlicherweise zeigen ausgerechnet die beiden Maslinsäure-Sulfamate die geringsten EC_{50} -Werte und somit die beste zytotoxische Wirkung.

Es kann also angenommen werden, dass die Inhibierung der Carboanhydrase II zumindest für die Methylester von Triterpen-Sulfamaten kein relevantes Target bezüglich der Antitumoraktivität darstellt. Eine detailliertere Beschreibung aller synthetisierter Verbindungen, deren Inhibierungskonstanten und Docking-Studien für die Carboanhydrase II sowie die Zelltestuntersuchungen können den Veröffentlichungen „*Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II*“ und „*Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates*“ entnommen werden.

3.2 „Large-Scale“-Synthese von Maslinsäure und Augustussäure

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.3.3.1 und 1.3.3.2) weisen Maslinsäure und deren Derivate vielversprechende Eigenschaften für die Bekämpfung von Tumorerkrankungen auf. Dies führte zwangsweise zu einem gesteigertem Bedarf an reiner Maslinsäure als Ausgangsstoff für weitere Untersuchungen sowie Derivatisierungen. Im Jahr 2014 wurde in unserer Arbeitsgruppe durch SIEWERT *et al.*⁸⁶ eine aussichtsreiche Verbindung (EM2, das diacetylierte Benzylamid der Maslinsäure) synthetisiert, die eine sehr hohe Zytotoxizität für menschliche Eierstock-Krebszellen ($EC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) aufwies, während die Zytotoxizität für nicht maligne Mausfibroblasten ($EC_{50} = 33,8 \mu\text{M}$) sehr niedrig war.

Für weiterführende Untersuchungen von EM2 in Tierversuchen wurden größere Mengen an Maslinsäure als Ausgangsmaterial benötigt. Die Isolierung aus Pflanzenmaterial oder Synthesen nach literaturbekannten Methoden waren in größeren Maßstäben schwer zu reproduzieren – u.a. weil zwingend notwendige Schritte zur chromatographischen Aufreinigung stets einen limitierenden Faktor darstellten. Daher entwickelten wir ausgehend von kommerziell leicht zugänglicher und kostengünstiger Oleanolsäure eine Chromatographiefreie Synthese von Maslinsäure über vier Stufen in einer Gesamtausbeute von 41,2 % (Abbildung 11). Eine detail-

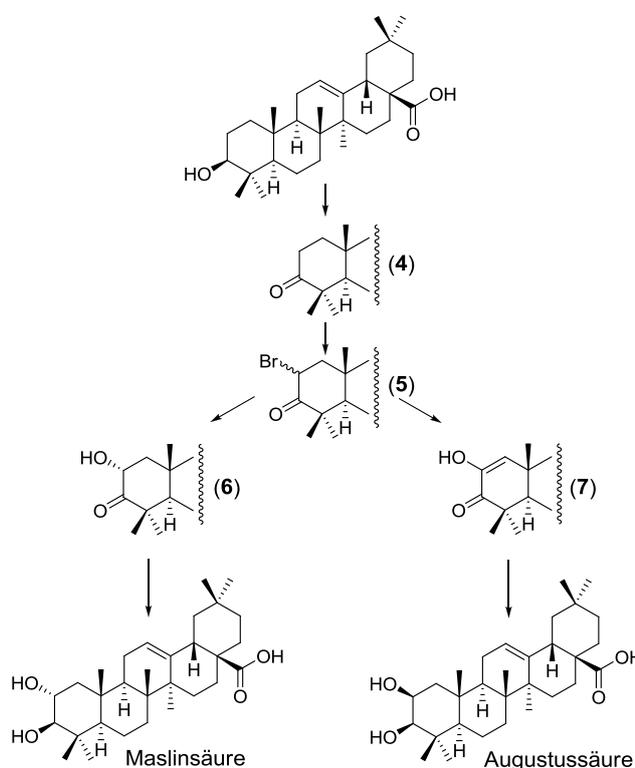


Abbildung 11: Syntheschema zur Darstellung von Maslinsäure (links) und Augustussäure (rechts)

liertere Beschreibung der Vorgehensweise ist in der Veröffentlichung „Convenient and chromatography-free partial synthesis of maslinic acid and augustic acid“ zu finden und soll daher nachfolgend nur kurz erläutert werden.

Der erste Reaktionsschritt beinhaltete die Oxidation von Oleanolsäure an Position C-3 mit JONES-Reagenz¹³¹ in Gegenwart von Kieselgel.¹³² Das Reaktionsprodukt 4 wurde dabei in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten und im Anschluss mit Pyridiniumtribromid in Essigsäure zu einem Gemisch der Bromide 5 umgesetzt.^{53,133} Diese reagierten mit Natronlauge in DMF bei 0 °C innerhalb von 30 min zu der hydroxylierten Verbindung 6.¹³³

Durch anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid bei 0 °C, wurde ein Gemisch von Maslinsäure mit 3-*epi*-Maslinsäure in einem Verhältnis von 4:1 erhalten.¹³⁴ Dank TSCHESCHE *et al.*¹³⁵ ist bekannt, dass die equatorial-axial ständigen OH-Gruppen der 3-*epi*-Maslinsäure in einem Gemisch aus Aceton und Schwefelsäure selbst bei 0 °C augenblicklich zu dem entsprechenden Acetonid reagieren. Die Maslinsäure mit equatorial-equatorial ständigen OH-Gruppen reagiert hingegen unter diesen Bedingungen nicht und konnte durch Umkristallisation in Ethylacetat abgetrennt werden.

Durch eine geringe Abwandlung der Reaktionsbedingungen (Umsetzung von **5** unter Zutritt von Luftsauerstoff), konnte auf diesem Weg ausgehend vom Enol **7**¹³⁶ außerdem die 2 β 3 β -konfigurierte Augustussäure in einer sehr guten Ausbeute von 71,9 % erhalten werden. Obwohl in diesem Fall nur als Nebenprodukt erhalten, scheint dieses C-2 Epimer der Maslinsäure jedoch ein enormes pharmakologisches Potential aufzuweisen. Es ist unter anderem bekannt, dass Augustussäure Apoptose in B16F10 Zellen von Maus-Melanomen⁸² auslösen kann und als Inhibitor der Tyrosin Phosphatase 1B GST sowie der Glykogen Phosphorylase¹³⁴ wirkt. Darüber hinaus hat es einen gefäßerweiternden Effekt¹³⁷ und wirkt antiproliferativ bei Raji-Zellen¹³⁸ sowie entzündungshemmend¹³⁸.

3.3 Synthesen der vier diastereomeren 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-28-säuren

Basierend auf den hochinteressanten biologischen Eigenschaften der Maslinsäure und dem in unserer Arbeitsgruppe synthetisierten selektiv antitumorwirksamen Derivat EM2 entschlossen wir uns zur Synthese aller vier Diastereomeren der 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-28-säure ausgehend von Oleanolsäure. Die Ergebnisse sind in der Veröffentlichung „*Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid*“ zusammengefasst.

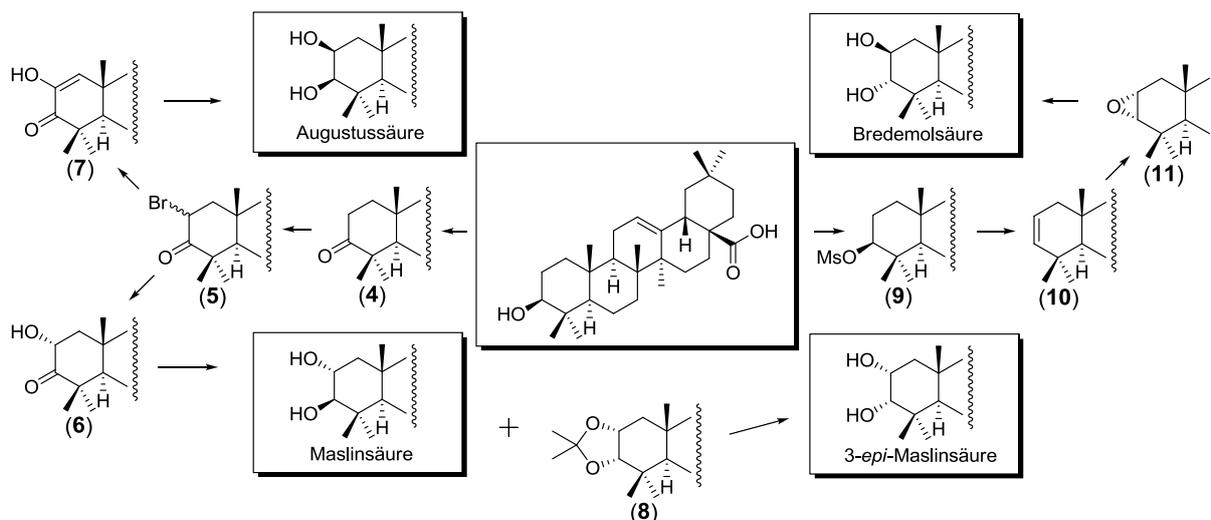


Abbildung 12: Syntheschema zur Darstellung der 4 diastereomeren 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-28-säuren ausgehend von Oleanolsäure

Die Synthesen von Maslinsäure und Augustussäure wurden bereits im Abschnitt 3.2 beschrieben und finden daher im Folgenden keine weitere Betrachtung. Aus Abbildung 12 und aus den vorhergehenden Beschreibungen kann entnommen werden, dass 3-*epi*-Maslinsäure durch Spaltung des Acetonides **8** erhalten wurde, welches als Nebenprodukt der Synthese von Maslinsäure angefallen war. Dieser Reaktionsschritt konnte entweder unter Verwendung von Säure oder Ionenaustauscher (z.B. IR 120 H⁺) durchgeführt werden sowie durch längeren Kontakt mit Kieselgel. Bisher wurde 3-*epi*-Maslinsäure nur durch Extraktion von z.B. *Potentilla chinensis*¹³⁹, *Centella asiatica*¹⁴⁰, *Prunella vulgaris*^{141,142} und *Salvia officinalis*¹⁴³ isoliert oder durch eine vergleichbar längere Partialsynthese¹³⁴ ebenfalls ausgehend von Oleanolsäure. Außerdem ist 3-*epi*-Maslinsäure ein Inhibitor der Muskel Glykogen Phosphorylase.¹³⁴

Die Partialsynthese von Bredemolsäure startete mit der Mesylierung von Oleanolsäure mit nahezu quantitativer Ausbeute an Verbindung **9**. Durch anschließende basische Eliminierung mit Lithiumcarbonat in DMF¹⁴⁴ wurde das Alken **10** erhalten, welches durch Umsetzung mit

*m*CPBA¹⁴⁵ zum Epoxid **11** reagierte. Die Epoxidöffnung in Gegenwart von wässriger Perchlorsäure lieferte das Zielmolekül Bredemolsäure. Diese Verbindung wurde erstmals von TSCHESCHE und SENGUPTA beschrieben und kann in kleinen Mengen aus *Bredemeyera floribunda* isoliert werden.¹⁴⁶ Eine vergleichbar längere Synthese des entsprechenden Methylesters wurde von der gleichen Arbeitsgruppe im Jahr 1963 beschrieben.¹⁴⁷ Im Jahr 2008 wurde dann auch die Synthese der freien Säure über sechs Stufen (ausgehend von Augustussäure) von CHENG *et al.*¹⁴⁸ beschrieben. Eine Inhibierung der Muskel Glykogen Phosphorylase ist von der Bredemolsäure ebenso bekannt.¹⁴⁸

Im Anschluss an die Synthese der vier isomeren Triterpensäuren folgte deren biologische Evaluierung mit Hilfe des SRB-Assays. Die zytotoxische Aktivität aller Verbindungen bezüglich fünf humaner Tumorzelllinien war jedoch allgemein als gering einzustufen. Die niedrigsten EC₅₀-Werte (EC₅₀ = 13,7 µM) wurden für Maslinsäure hinsichtlich der Melanom-Zelllinie 518 A2 ermittelt.

3.4 Harnstoff-Derivate der Maslinsäure

Das Ziel dieser Publikation bestand darin, eine Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR) ausgehend von EM2 aufzubauen, um eine möglichst gesteigerte Antitumoraktivität bei gleichbleibender oder verbesserter Selektivität bezüglich der nicht malignen Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 zu erhalten. Dafür wurden zahlreiche strukturelle Modifikationen durchgeführt, die nachfolgend kurz erläutert werden sollen.

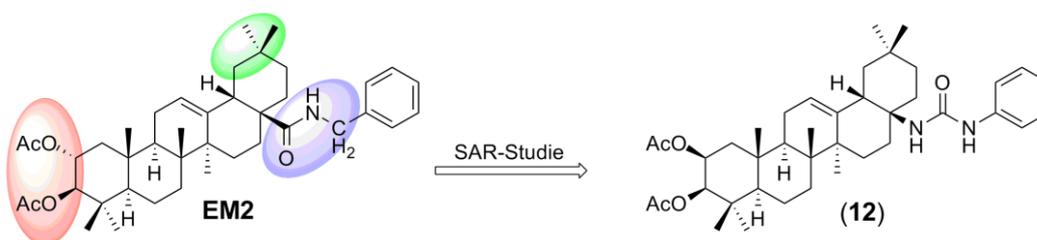


Abbildung 13: Farblich hervorgehobene Bereiche bei EM2, die während der SAR-Studie untersucht wurden

In der Literatur ist bereits bekannt, dass ein Verlust der Acetyl-Gruppen am A-Ring zu einem Abfall der Antitumoraktivität um den Faktor 4 führt.⁸⁶ Zunächst wurden also die „Schutzgruppen“ der OH-Gruppen am A-Ring (Abbildung 13, rot markiert) variiert und die resultierenden Verbindungen mit Hilfe des SRB-Assay hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Acetyl-Gruppen bereits einen optimalen Selektivitätsfaktor F_{SI} ($F_{SI} = EC_{50, NIH\ 3T3} / EC_{50, Tumor-Zelllinie}$) hervorrufen. Darüber hinaus wurden mit der Synthese

der vier diastereomeren 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-28-säuren die idealen Ausgangsmaterialien geschaffen, um den Einfluss der Konfiguration der stereogenen Zentren an C-2 und C-3 zu untersuchen. Die Zelltestuntersuchungen der Konfigurationsisomere des EM2 zeigten eindeutig, dass eine hohe Antitumoraktivität bei gleichzeitig hohen F_{SI} nur mit einer 3β -Konfiguration erhalten wurde. Interessanterweise führte die $2\beta,3\alpha$ -Konfiguration des Bredemolsäure-Derivates sogar zu einer Verringerung der Antitumoraktivität sowie einem Einbruch der Selektivität um den Faktor 10.

Weitere Veränderungen an dem Strukturelement des Benzylamids (Abbildung 13, blau markiert) haben gezeigt, dass ein Optimum an Zytotoxizität sowie ein möglichst hoher F_{SI} erreicht werden können, wenn einerseits die Amid-Struktur durch eine Harnstoff-Struktur ersetzt wird und der Benzyl-Rest durch einen Phenyl-Rest substituiert wird. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten wir ebenfalls feststellen, dass bei einem Einsatz der analogen Verbindungen vom Ursan-Typ (Abbildung 13, grün markiert) stets eine verringerte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu den Derivaten des Olean-Typs festzustellen war. Durch die angesprochenen Variationen konnte das Derivat **12** als hochaktive antitumorwirksame Verbindung mit einem im Vergleich zu EM2 nochmals verbessertem Selektivitätsverhalten (**12**: $F_{SI} = 133$; EM2: $F_{SI} = 70$) identifiziert werden. In weiterführenden Zelltestuntersuchungen, u.a. basierend auf einem Annexin V/Propidiumiodid Assay, Zell-Zyklus Untersuchungen sowie Fluoreszenzmikroskopie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Verbindung **12** Apoptose auslöst ohne dabei die Caspase 3 zu aktivieren. Eine detailliertere Beschreibung der synthetisierten Verbindungen und deren biologische Evaluierung sind in der Veröffentlichung „*Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines*“ beschrieben.

3.5 Selektive Antitumoraktivität bei Chinolin-substituierten Triterpen-Carbonsäure-Amiden

Im Zuge weiterer Struktur-Wirkungs-Beziehungen basierend auf EM2 konzentrierten wir uns auf die Synthese von stickstoffhaltigen heterocyclischen Triterpen-Carbonsäure-Amiden. Untersucht wurden dabei der Einfluss des Substitutionsmusters des aromatischen Rests respektive die Anzahl der am A-Ring befindlichen Acetyl-Gruppen bezüglich der Antitumoraktivität und des Selektivitätsverhaltens. Alle von uns synthetisierten Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer antitumoraktiven Wirkung mittels SRB-Assay untersucht.

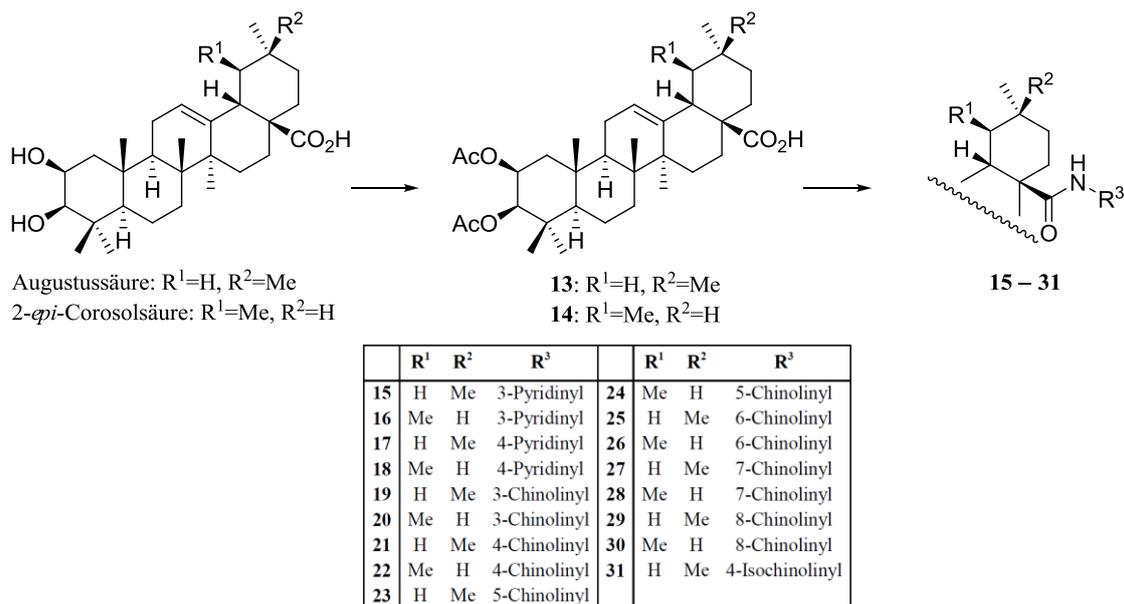


Abbildung 14: Syntheschema für die Darstellung der Pyridinyl- und Chinolinyl-Amide

Die Derivatisierung erfolgte zunächst auf Basis der dihydroxylierten Vertreter, der Augustussäure bzw. der 2-*epi*-Corosolsäure. Nach Acetylierung erfolgte über SCHOTTEN-BAUMANN die Darstellung der entsprechen heterocyclisch substituierten Amide (**15 – 31**), wobei der Fokus auf der Synthese von Pyridinyl- sowie Chinolinyl-Amiden lag (Abbildung 14). Die Pyridin-analogen Verbindungen (**15 – 18**) zeigten eine gute Antitumoraktivität (**5**: EC₅₀ = 0,9 µM für Eierstockkrebs A2780) im Vergleich zu den acetylierten freien Säuren (**13**, **14**). Signifikante Unterschiede im Selektivitätsverhalten bezüglich der nicht malignen Mausfibroblasten NIH 3T3 sind jedoch nicht zu erkennen. Die Chinolin-analogen Verbindungen zeigten größtenteils ein ähnliches Aktivitätsprofil. Eine Ausnahme stellten die 5-Chinolinyl-Derivate dar – sie wiesen sehr gute EC₅₀-Werte (**23**: EC₅₀ = 0,7 µM für Eierstockkrebs A2780) auf, bei gleichzeitiger Selektivität bezüglich der NIH 3T3. Um einen möglichen Zusammenhang der Antitumoraktivität mit der Orientierung des aromatischen Systems zu untersuchen, wurde ein 4-Isochinolinyl-Derivat (**31**) synthetisiert. Dieses unterscheidet sich vom 3-Chinolinyl-Derivat (**19**) formal in der Umorientierung des aromatischen Rests. Abbildung 15 zeigt die erstaunlichen Ergebnisse. Die Umorientierung steigert nicht nur die allgemeine zytotoxische Wirkung gegenüber den Krebszellen, sondern ruft darüber hinaus einen drastischen Anstieg des Selektivitätsverhaltens hervor. Bezüglich der Brustkrebszelllinie MCF-7 und den nicht malignen Mausfibroblasten NIH 3T3 fand eine Steigerung der Selektivität um den Faktor 258 statt.

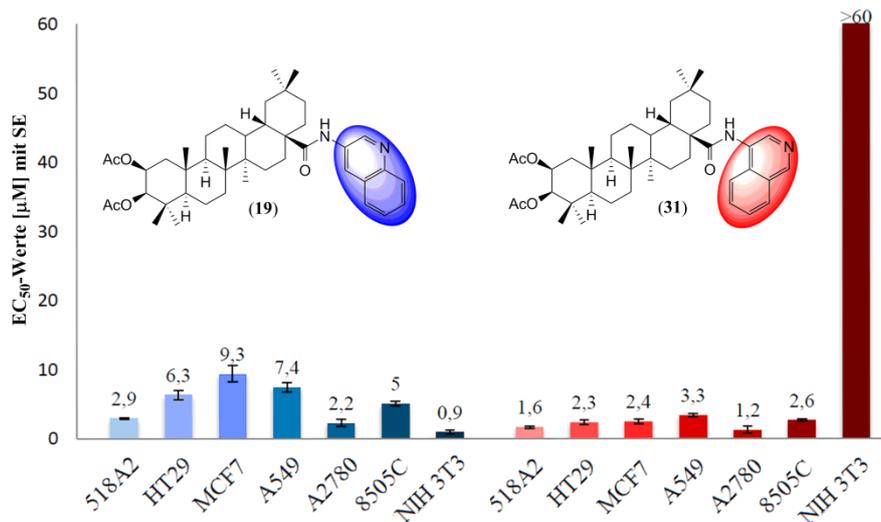


Abbildung 15: Vergleich der zytotoxischen Aktivität der Chinolin- bzw. Isochinolin-Derivate bezüglich sechs Krebszelllinien und der embryonalen Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3

Es konnte weiterhin belegt werden, dass ein Vorhandensein von drei Acetoxy-Gruppen am A-Ring die zytotoxische Wirkung der Derivate um den Faktor 4 steigert. Es scheinen demnach zwei Faktoren für eine antitumoraktive und zugleich selektiv wirkende Verbindung besonders wichtig zu sein. Der Isochinolinyl-Rest an Position C-28 sowie mindestens drei acetylierte OH-Gruppen am A-Ring. Durch Kombination dieser Faktoren erhielten wir das 4-Isoquinolinyl-Derivat der Asiasäure (**32**, siehe Abbildung 18, S. 26). Es gelang uns somit die Synthese eines Triterpen-Derivates mit EC₅₀-Werten im teilweise zweistelligen nanomolaren Bereich (EC₅₀ = 80 nM für Eierstockkrebs A2780). Mit einem EC₅₀ = 3,23 μM für die NIH 3T3 weist die Verbindung einen Selektivitätsfaktor von $F_{SI} = 40$ zwischen den Tumorzelllinien und den nicht malignen Mausfibroblasten auf.

In weiterführenden Zelltestuntersuchungen, u.a. basierend auf einem Annexin V/Propidium-iodid Assay, Zell-Zyklus Untersuchungen sowie Fluoreszenzmikroskopie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die synthetisierten Verbindungen Apoptose auslösen. Eine detailliertere Beschreibung der synthetisierten Verbindungen sowie deren biologische Evaluierung sind in der Veröffentlichung „*Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides – the substantial role of aromatic moiety alignment*“ beschrieben.

3.6 Maslinsäure-Rhodamin B-Konjugate

Das Ziel dieser Publikation war ein fluoreszierendes Maslinsäure-Derivat zu synthetisieren, um durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen genauere Vorstellungen über die Wirkweise solcher Verbindungen auf zellulärer Ebene zu erhalten. Dafür sollte acetylierte Maslinsäure über verschiedene Spacer mit Rhodamin B verknüpft werden. Wurde Piperazin als Spacer verwendet, erhielt man wie vermutet eine tief violettfarbene und stark fluoreszierende Verbindung (**33**) mit einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute (**33**: 60 %, Rhodamin B: 80 %). Wenn aber die Verknüpfung über Ethylendiamin hergestellt wurde, erhielt man einen weißen Feststoff (**34**), der keine nennenswerten fluoreszierenden Eigenschaften aufwies.

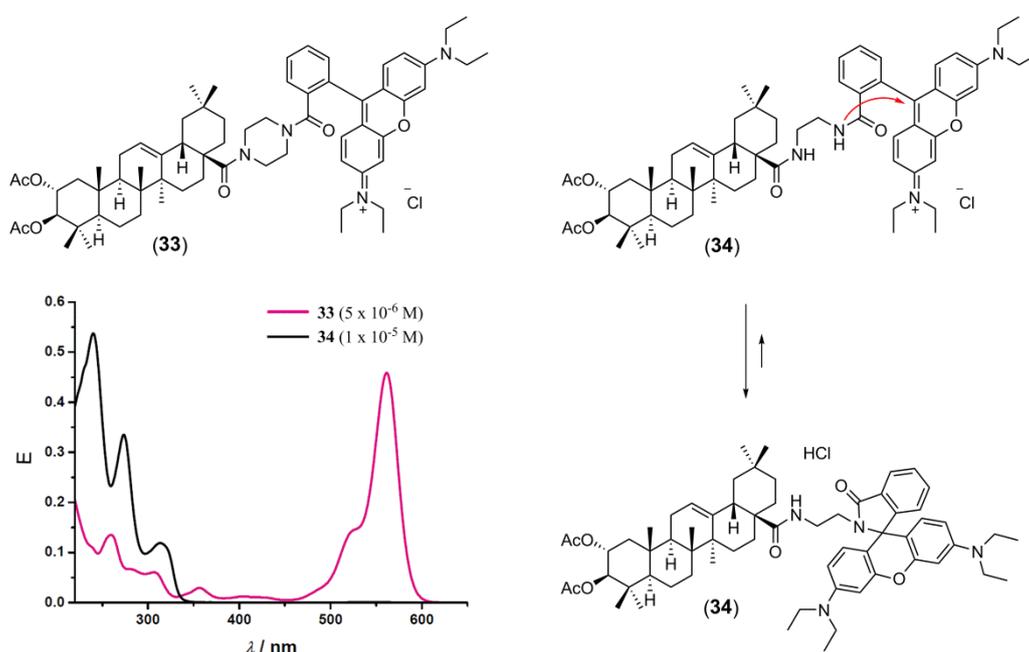


Abbildung 16: Strukturen und UV/Vis-Spektren von **33** und **34**

Verbindung **34** gehört zu den Spiro-Rhodaminen und lässt sich durch eine intramolekulare Lactam-Bildung bei sekundären Amidnen des Rhodamin B erklären (Abbildung 16).¹⁴⁹ Die UV/Vis-spektroskopischen Auswirkungen der strukturellen Änderung sind ebenfalls in Abbildung 16 dargestellt. Das zytotoxische Potential der Verbindungen wurde anschließend mit Hilfe des SRB-Assay untersucht. Erst hier wurden die enormen Auswirkungen dieser kleinen strukturellen Änderung sichtbar. Während für die Verbindung mit einem Ethylendiamin-Spacer (**34**) kein messbares zytotoxisches Potential nachzuweisen war, konnten für das Derivat mit einem Piperazin-Spacer (**33**) EC_{50} -Werte im teilweise einstelligen nanomolarem Bereich gemessen werden. In Tabelle 2 werden die EC_{50} -Werte vergleichend mit Maslinsäure, EM2 und Rhodamin B dargestellt. Hier wird deutlich, dass gegenüber der

Maslinsäure das zytotoxische Potential von **33** um einen durchschnittlichen Faktor von 1000 angestiegen ist, wobei der Selektivitätsfaktor vergleichbar mit dem von EM2 ist.

Tabelle 2: EC_{50} -Werte in μM sowie der maximale Selektivitätsfaktor
($F_{SI} = EC_{50, \text{NIH 3T3}}/EC_{50, \text{Tumor-Zelllinie}}$)

EC_{50} (μM)	518A2	HT29	MCF-7	A549	A2780	NIH 3T3	F_{SI} (max)
Maslinsäure	13,7 ± 0,9	28,8 ± 0,5	>30	23,4 ± 0,5	19,5 ± 0,8	21,1 ± 0,2	1,5
EM2	1,5 ± 0,2	4,7 ± 0,2	7,7 ± 0,5	2,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	33,8 ± 3,0	67,6
33	0,011 ± 10 ⁻⁴	0,057 ± 0,015	0,028 ± 5*10 ⁻³	0,186 ± 0,028	0,007 ± 10 ⁻⁴	0,334 ± 0,061	47,7
34	>30	>30	>30	>30	>30	>30	n.d.
Rhodamin B	>30	>30	>30	>30	>30	>30	n.d.

Unserem Wissen nach ist die Verbindung **33** nicht nur das bisher aktivste Maslinsäure-Derivat, sondern vielmehr auch das aktivste Triterpen-Derivat, das jemals hergestellt wurde. Das zytotoxische Potential gegenüber den humanen Tumorzelllinien liegt sogar im Bereich von kommerziell erhältlichen Chemotherapeutika wie Doxorubicin^{150,151} oder Paclitaxel^{152,153}. Auf zellulärer Ebene wirkt die Verbindung aller Wahrscheinlichkeit nach als sogenanntes Mitocan. Mitocane sind alle antitumoraktiven Verbindungen, deren Wirkmechanismus das Mitochondrium zum Ziel hat.¹⁵⁴ Sie lassen sich grundsätzlich in acht verschiedene Kategorien einteilen – eine davon beschreibt die Wirkung von lipophilen Kationen auf die innere Membran von Mitochondrien.¹⁵⁵ Studien zufolge besitzen Krebszellen in diesem Fall ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential im Vergleich zu nicht malignen Zellen.^{156,157} Da eine Erhöhung dieser Potentialdifferenz zu einer gesteigerten Akkumulation von kationischen Verbindungen führt, ließe sich die gesteigerte Antitumoraktivität von **33** sowie die Selektivität bezüglich der nicht malignen NIH 3T3 Zelllinie erklären.

In fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden A2780 Zellen zunächst mit **33** und gleichzeitig mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 sowie Rhodamine 123 behandelt. Da sich die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden Fluoreszenzfarbstoffe und **33** hinreichend unterscheiden, können Areale in denen eine Anreicherung innerhalb der Tumorzelle stattfindet durch geeignete Filtereinstellungen am Fluoreszenzmikroskop exakt voneinander unterschieden werden. Hoechst 33342 bindet selektiv an die DNA, besitzt dabei ein Maximum der Anregungswellenlänge bei 350 nm und emittiert bei einem Emissionsmaximum von 461 nm. Im Gegensatz dazu wird Rhodamin 123 zum Anfärben der Mitochondrien verwendet, absorbiert um 505 nm und emittiert bei einer Wellenlänge um 560 nm. Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass **33** die gleichen Areale innerhalb der

Zelle anfärbt wie der Mitochondrien-selektive Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123. Darüber hinaus kann eine Lokalisierung im Zellkern durch den Vergleich mit Hoechst 33342 nahezu ausgeschlossen werden.

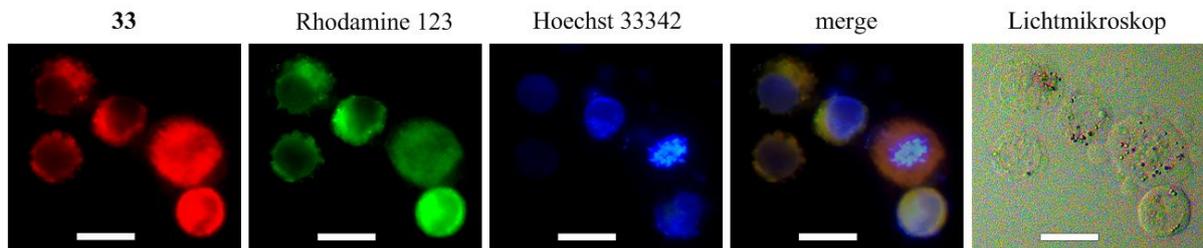


Abbildung 17: A2780 Eierstockkrebszellen wurden mit **33**, Rhodamin 123 sowie Hoechst 33342 inkubiert und anschließend fluoreszenz- und lichtmikroskopisch untersucht (Maßstabsbalken: 20 μm).

Weitere fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen sowie eine genauere Beschreibung der Versuche können der Veröffentlichung *„Rhodamin B conjugates of triterpenoic acids are mitocans and cytotoxic even at nanomolar concentrations“* entnommen werden.

4 Zusammenfassung der Dissertation

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Synthese und der biologischen Evaluierung von Triterpen-Sulfamaten. Dabei sollte der Einfluss unterschiedlicher Triterpen-Grundgerüste auf die effektive Inhibierung der Carboanhydrase II (CA II) untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Oleanolsäure-Sulfamat **1** einen $K_i = 0,308 \mu\text{M}$ besitzt und somit bereits halb so aktiv ist wie die Referenzsubstanz Acetazolamid ($K_i = 0,137 \mu\text{M}$) (Abbildung 18).

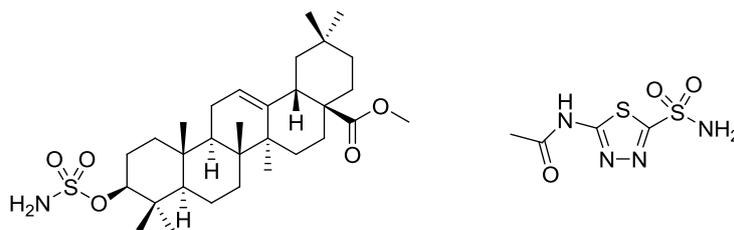


Abbildung 18: Struktur des aktiven Oleanolsäure-Sulfamat **1** (links) und der Referenzsubstanz Acetazolamid (rechts)

Maslinsäure-Derivate mit Sulfamat-Gruppen an Position C-2 oder C-3 zeigen im Vergleich dazu eine deutlich geringere Inhibierung der CA II (Sulfamat an C-2: $K_i = 1,41 \mu\text{M}$; Sulfamat an C-3: $K_i > 20 \mu\text{M}$). Eine Abhängigkeit der Enzym-Aktivität vom Grundgerüst sowie der Position der Sulfamat-Gruppe am A-Ring konnte u.a. belegt werden. Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die Inhibierung der CA II mit der zytotoxischen Aktivität gegenüber verschiedenen Krebszelllinien korreliert. Dazu wurden die Sulfamate mit Hilfe eines photometrischen Sulforhodamin-B-Assays (SRB-Assay) untersucht. Die Ergebnisse zeigten für die nur mäßig Enzym inhibierenden Maslinsäure-Derivate die geringsten EC_{50} -Werte und somit die besten Antitumoraktivitäten. Auch bei den restlichen Triterpen-Sulfamaten konnte keine Korrelation zwischen der Enzym-Inhibierung und dem zytotoxischen Potential festgestellt werden. Zumindest für die in diesem Zusammenhang untersuchten Verbindungen scheint die CA II somit kein geeignetes Target für eine gesteigerte Antitumoraktivität darzustellen.

Das in unserem Arbeitskreis von SIEWERT *et al.*⁸⁶ synthetisierte Maslinsäure-Derivat „EM2“ (das Benzylamid der diacetylierten Maslinsäure) besitzt bemerkenswerte zytotoxische Eigenschaften. Um weiterführende Tierversuche gewährleisten zu können, war es notwendig größere Mengen an Maslinsäure möglichst effizient herzustellen. Im Zuge dieser Arbeit konnte eine vierstufige Synthese entwickelt werden, bei der Maslinsäure ausgehend von kostengünstiger Oleanolsäure in einer Gesamtausbeute von 41,2 % dargestellt wurde. Durch Optimierung der Syntheseführung wurde reine Maslinsäure nur durch einfache Umkristal-

lisation und ohne Verwendung chromatographischer Methoden erhalten. Eine geringe Abwandlung der Reaktionsbedingungen erlaubte außerdem die Synthese der 2 β ,3 β -konfigurierten Augustussäure in einer sehr guten Ausbeute von 71,9 %.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es möglich ist alle vier Diastereomere der 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-säure ausgehend von Oleanolsäure zu synthetisieren. Die Syntheserouten für Bredemolsäure sowie für 2-*epi*-Maslinsäure wurden beschrieben.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Suche nach weiteren antitumoraktiven Maslinsäure-Derivaten, die im optimalen Fall niedrige EC₅₀-Werte für die untersuchten Tumorzelllinien aufweisen, dabei aber gleichzeitig keine oder eine verringerte Aktivität gegenüber den embryonalen Mausfibroblasten (NIH 3T3) zeigen. Basierend auf der Struktur von EM2 wurden eine Reihe struktureller Modifikationen durchgeführt um dieses Ziel zu erreichen. Es wurde der Einfluss folgender Faktoren untersucht: die „Schutzgruppen“ am A-Ring, die Konfiguration der OH-Gruppen am A-Ring, die Länge der Amid-Kette, der Grundgerüst-Typ (Oleanol vs. Ursol) und die funktionelle Gruppe an C-17. Das Ergebnis der Optimierung war das Harnstoff-Derivat **12** (Abbildung 19). Es zeigt eine sehr gute Antitumoraktivität (EC₅₀ = 0,9 μ M für Eierstockkrebs A2780), zeichnet sich aber überwiegend durch das überragende Selektivitätsverhalten gegenüber der NIH 3T3 (EC₅₀ > 120 μ M) aus. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Verbindung selektiv Apoptose auslöst.

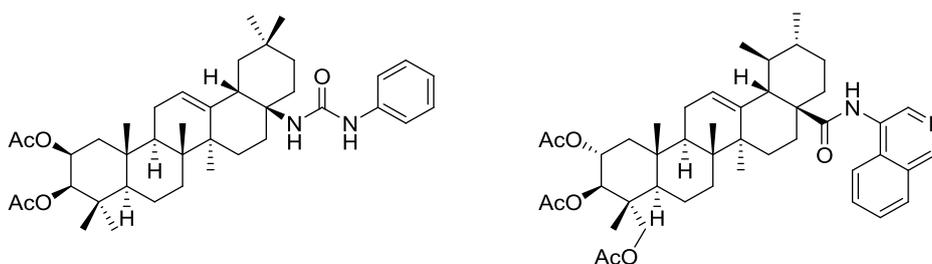


Abbildung 19: Strukturen von Derivat **12** (links) und Derivat **32** (rechts) aus den SAR-Studien

Weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden auf der Basis von Chinolin-substituierten Triterpen-Amiden durchgeführt. Es konnte eindeutig belegt werden, dass einerseits die Antitumoraktivität maßgeblich durch die Anzahl der acetylierten OH-Gruppen am A-Ring und andererseits das Selektivitätsverhalten durch die räumliche Orientierung des aromatischen Rests beeinflusst wird. Durch Kombination dieser Erkenntnisse bei Derivat **32** (Abbildung 19) konnten EC₅₀-Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich (EC₅₀ = 80 nM für A2780) sowie ein Selektivitätsfaktor F_{SI} (F_{SI} = EC_{50, NIH 3T3}/EC_{50, Tumor-Zelllinie}) von 40 erzielt werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschreibt die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von Rhodamin B-verknüpften Maslinsäure-Derivaten und deren biologische Evaluierung. Dafür wurde acetylierte Maslinsäure zum einen über Piperazin (**33**) und zum anderen über Ethylendiamin (**34**) mit Rhodamin B verbunden (Abbildung 20). Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei **34** um ein sekundäres Amid handelt, findet ein intramolekularer Ringschluss statt, die ionische Struktur geht verloren, die Verbindung besitzt keine nennenswerten Fluoreszenzeigenschaften sowie EC_{50} -Werte größer $30 \mu\text{M}$ (Abbildung 16, S. 23). Bei **33** hingegen handelt es sich um eine stark fluoreszierende Verbindung mit einer Quantenausbeute von ca. 60 %. Die Zelltestwerte ergaben EC_{50} -Werte im einstelligen nanomolaren Bereich ($EC_{50} = 7 \text{ nM}$ für Eierstockkrebs A2780) sowie einen Selektivitätsfaktor $F_{SI} = 48$. Die fluoreszierenden Eigenschaften erlaubten darüber hinaus eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der mit **33** inkubierten Krebszellen. Dabei konnte eine mitochondriale Lokalisierung von **33** festgestellt werden.

EC_{50} (μM)	A2780	NIH 3T3	F_{SI} (max)
Maslinsäure	$19,5 \pm 0,8$	$21,1 \pm 0,2$	1,5
EM2	$0,5 \pm 0,1$	$33,8 \pm 3,0$	67,6
33	$0,007 \pm 10^{-4}$	$0,334 \pm 0,061$	47,7
34	>30	>30	n.d.
Rhodamin B	>30	>30	n.d.

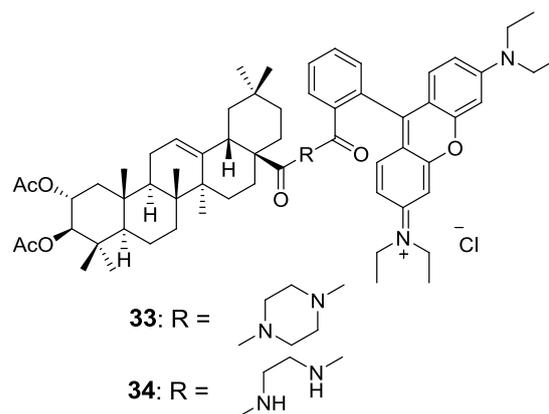


Abbildung 20: Strukturen der Maslinsäure-Rhodamin-B-Konjugate; EC_{50} -Werte (in μM) bezüglich der Krebszelllinie A2780 (Eierstockkrebs) und der nicht malignen Zelllinie NIH 3T3 (embryonale Mausfibroblasten); Selektivitätsfaktor ($F_{SI} = EC_{50, \text{NIH 3T3}}/EC_{50, \text{Tumor-Zelllinie}}$)

Im Verlauf dieser Arbeit konnten ausgehend von EM2 mehrere erfolgreiche Steigerungen der Antitumoraktivität sowie des Selektivitätsverhaltens erzielt werden. Mit **33** ist es gelungen das bisher aktivste literaturbekannte Triterpen-Derivat herzustellen. Vor allem die fluoreszierenden Eigenschaften machen diese Verbindungen zu einem idealen Ausgangspunkt für weitere mechanistische Untersuchungen bei Tumorzelllinien.

5 Literaturverzeichnis

- (1) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- (2) Global Burden of Disease Cancer, C.; Fitzmaurice, C.; Dicker, D.; Pain, A.; Hamavid, H.; Moradi-Lakeh, M.; MacIntyre, M. F.; Allen, C.; Hansen, G.; Woodbrook, R.; Wolfe, C.; Hamadeh, R. R.; Moore, A.; Werdecker, A.; Gessner, B. D.; Te Ao, B.; McMahon, B.; Karimkhani, C.; Yu, C.; Cooke, G. S.; Schwebel, D. C.; Carpenter, D. O.; Pereira, D. M.; Nash, D.; Kazi, D. S.; De Leo, D.; Plass, D.; Ukwaja, K. N.; Thurston, G. D.; Yun Jin, K.; Simard, E. P.; Mills, E.; Park, E. K.; Catala-Lopez, F.; deVeber, G.; Gotay, C.; Khan, G.; Hosgood, H. D., 3rd; Santos, I. S.; Leasher, J. L.; Singh, J.; Leigh, J.; Jonas, J. B.; Sanabria, J.; Beardsley, J.; Jacobsen, K. H.; Takahashi, K.; Franklin, R. C.; Ronfani, L.; Montico, M.; Naldi, L.; Tonelli, M.; Geleijnse, J.; Petzold, M.; Shrimme, M. G.; Younis, M.; Yonemoto, N.; Breitborde, N.; Yip, P.; Pourmalek, F.; Lotufo, P. A.; Esteghamati, A.; Hankey, G. J.; Ali, R.; Lunevicius, R.; Malekzadeh, R.; Dellavalle, R.; Weintraub, R.; Lucas, R.; Hay, R.; Rojas-Rueda, D.; Westerman, R.; Sepanlou, S. G.; Nolte, S.; Patten, S.; Weichenthal, S.; Abera, S. F.; Fereshtehnejad, S. M.; Shiue, I.; Driscoll, T.; Vasankari, T.; Alsharif, U.; Rahimi-Movaghar, V.; Vlassov, V. V.; Marcenes, W. S.; Mekonnen, W.; Melaku, Y. A.; Yano, Y.; Artaman, A.; Campos, I.; MacLachlan, J.; Mueller, U.; Kim, D.; Trillini, M.; Eshrati, B.; Williams, H. C.; Shibuya, K.; Dandona, R.; Murthy, K.; Cowie, B.; Amare, A. T.; Antonio, C. A.; Castaneda-Orjuela, C.; van Gool, C. H.; Violante, F.; Oh, I. H.; Deribe, K.; Soreide, K.; Knibbs, L.; Kereselidze, M.; Green, M.; Cardenas, R.; Roy, N.; Tillmann, T.; Li, Y.; Krueger, H.; Monasta, L.; Dey, S.; Sheikhabaehi, S.; Hafezi-Nejad, N.; Kumar, G. A.; Sreeramareddy, C. T.; Dandona, L.; Wang, H.; Vollset, S. E.; Mokdad, A.; Salomon, J. A.; Lozano, R.; Vos, T.; Forouzanfar, M.; Lopez, A.; Murray, C.; Naghavi, M. *JAMA Oncol* **2015**, *1*, 505-527.
- (3) Reedijk, J. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100*, 3611-3616.
- (4) Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem Rev* **1999**, *99*, 2451-2466.
- (5) Saeidnia, S. *New Approaches to Natural Anticancer Drugs*, Springer-Verlag, 2015.
- (6) Newman, D. J.; Giddings, L. A. *Phytochem Rev* **2014**, *13*, 123-137.
- (7) Salvador, J. A. R. *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*; Nova Science Pub Inc, 2010.
- (8) Habermehl, G.; Hammann, P. E.; Krebs, H. C.; Ternes, W. *Naturstoffchemie Eine Einführung*; Springer-Verlag, 2008.
- (9) Tringai, C. *Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation, Characterization and Biological Properties*; Taylor & Francis, 2001.
- (10) Abe, I. *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 1311-1331.
- (11) Allard, S.; Ourisson, G. *Tetrahedron* **1957**, *1*, 277-283.
- (12) Bächler, L. Dissertation, Basel, 1927.
- (13) Dieterle, H.; Dorner, O. *Arch. Pharmaz.* **1937**, *275*, 427 - 437.

- (14) Tschesche, R.; Fugmann, R. *Chem Ber-Recl* **1951**, *84*, 810-825.
- (15) Ruzicka, L.; Jeger, O.; Volli, E. *Helv Chim Acta* **1945**, *28*, 767-770.
- (16) Ruzicka, L.; Volli, E.; Jeger, O. *Helv Chim Acta* **1945**, *28*, 1628-1635.
- (17) Bersin, T.; Muller, A. *Helv Chim Acta* **1951**, *34*, 1868-1872.
- (18) Bersin, T.; Muller, A. *Helv Chim Acta* **1952**, *35*, 1891-1895.
- (19) Tschesche, R.; Heesch, A.; Fugmann, R. *Chem Ber-Recl* **1953**, *86*, 626-629.
- (20) Tschesche, R.; Poppel, G. *Chem Ber-Recl* **1959**, *92*, 320-328.
- (21) Caglioti, L.; Cainelli, G. *Gazz. Chim. It.* **1961**, *91*, 1387 - 1399.
- (22) Caglioti, L.; Cainelli, G. *Tetrahedron* **1962**, *18*, 1061-1062.
- (23) Perez-Camino, M. C.; Cert, A. *J Agr Food Chem* **1999**, *47*, 1558-1562.
- (24) Kombargi, W. S.; Michelakis, S. E.; Petrakis, C. A. *J Econ Entomol* **1998**, *91*, 993-998.
- (25) He, X. J.; Liu, R. H. *J Agr Food Chem* **2007**, *55*, 4366-4370.
- (26) Waldbauer, K.; Seiringer, G.; Nguyen, D. L.; Winkler, J.; Blaschke, M.; McKinnon, R.; Urban, E.; Ladurner, A.; Dirsch, V. M.; Zehl, M.; Kopp, B. *J Agr Food Chem* **2016**, *64*, 185-194.
- (27) Lia, Z. J.; Wan, C. P.; Cai, L.; Li, S. Q.; Zheng, X.; Qi, Y.; Dong, J. W.; Yin, T. P.; Zhou, Z. X.; Tan, N. H.; Ding, Z. T. *Phytochem Lett* **2015**, *13*, 246-251.
- (28) Li, G. L.; You, J. M.; Song, C. H.; Xia, L. A.; Zheng, J.; Suo, Y. R. *J Agr Food Chem* **2011**, *59*, 2972-2979.
- (29) Lin, C. C.; Huang, C. Y.; Mong, M. C.; Chan, C. Y.; Yin, M. C. *J Agr Food Chem* **2011**, *59*, 755-762.
- (30) Mooi, L. Y.; Wahab, N. A.; Lajis, N. H.; Ali, A. M. *Chem Biodivers* **2010**, *7*, 1267-1275.
- (31) Yin, M. C.; Lin, M. C.; Mong, M. C.; Lin, C. Y. *J Agr Food Chem* **2012**, *60*, 7697-7701.
- (32) Ono, M.; Eguchi, K.; Konoshita, M.; Furusawa, C.; Sakamoto, J.; Yasuda, S.; Ikeda, T.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Yoshimitsu, H.; Nohara, T. *Chem Pharm Bull* **2011**, *59*, 392-396.
- (33) Liu, P.; Hu, P.; Deng, R. X.; Li, R.; Yang, L.; Yin, W. P. *Helv Chim Acta* **2011**, *94*, 136-141.
- (34) Hasan, M. R.; Al-Jaber, H. I.; Al-Qudah, M. A.; Abu Zarga, M. H. *Phytochem Lett* **2016**, *16*, 12-17.

- (35) Babalola, I. T.; Shode, F. O.; Adedokun, E. A.; Opoku, A. R.; Mosa, R. A. *From J Pharmacog Phytochem* **2013**, *1*, 54 -60.
- (36) Wu, Y.; Li, Y. Y.; Wu, X.; Gao, Z. Z.; Liu, C.; Zhu, M.; Song, Y.; Wang, D. Y.; Liu, J. G.; Hu, Y. L. *Biochem Syst Ecol* **2014**, *57*, 216-220.
- (37) Yang, H.; Jeong, E. J.; Kim, J.; Sung, S. H.; Kim, Y. C. *J Nat Prod* **2011**, *74*, 751-756.
- (38) Lin, H.; Zhang, Y. W.; Bao, Y. L.; Wu, Y.; Sun, L. G.; Yu, C. L.; Huang, Y. X.; Wang, E. B.; Li, Y. X. *Biochem Syst Ecol* **2013**, *51*, 184-188.
- (39) Asada, Y.; Li, W.; Terada, T.; Kuang, X. Z.; Li, Q.; Yoshikawa, T.; Hamaguchi, S.; Namekata, I.; Tanaka, H.; Koike, K. *Phytochemistry* **2012**, *79*, 141-146.
- (40) Hossain, M. A.; Ismail, Z. *Arab J Chem* **2013**, *6*, 295-298.
- (41) Sidana, J.; Foley, W. J.; Singh, I. P. *Phytochem Analysis* **2012**, *23*, 483-491.
- (42) Wang, J.; Ren, H.; Xu, Q. L.; Zhou, Z. Y.; Wu, P.; Wei, X. Y.; Cao, Y.; Chen, X. X.; Tan, J. W. *Food Chem* **2015**, *168*, 623-629.
- (43) Dontha, S.; Kamurthy, H.; Mantripragada, B. R. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **2015**, *6*, 1 - 5.
- (44) Wang, D.; Xia, M. Y.; Cui, Z. *Chem Pharm Bull* **2006**, *54*, 775-778.
- (45) Wang, Y.; Zhang, C. L.; Liu, Y. F.; Liang, D.; Luo, H.; Hao, Z. Y.; Chen, R. Y.; Yu, D. Q. *Planta Med* **2014**, *80*, 215-222.
- (46) Schimert, G.; Blomer, H. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Experim Pathol Pharmacol* **1953**, *217*, 337-347.
- (47) Dorner, J.; Kuschke, H. J. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Experim Pathol Pharmacol* **1955**, *224*, 24-43.
- (48) Montilla, M. P.; Agil, A.; Navarro, M. C.; Jimenez, M. I.; Garcia-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M. M. *Planta Med* **2003**, *69*, 472-474.
- (49) Zhang, L.; Cheng, Y. X.; Liu, A. L.; Wang, H. D.; Wang, Y. L.; Du, G. H. *Molecules* **2010**, *15*, 8507-8517.
- (50) Allouche, Y.; Beltran, G.; Gaforio, J. J.; Uceda, M.; Mesa, M. D. *Food Chem Toxicol* **2010**, *48*, 2885-2890.
- (51) Fan, H.; Yang, G. Z.; Zheng, T.; Mei, Z. N.; Liu, X. M.; Chen, Y.; Chen, S. *Molecules* **2010**, *15*, 5547-5560.
- (52) Guan, T.; Qian, Y.-S.; Huang, M.-H.; Huang, L.-F.; Tang, X.-Z.; Li, Y.-M.; Sun, H.-B. *Chinese J Nat Med* **2010**, *8*, 293-297.
- (53) Qiu, W. W.; Shen, Q.; Yang, F.; Wang, B.; Zou, H.; Li, J. Y.; Li, J.; Tang, J. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 6618-6622.

- (54) Fernandez-Navarro, M.; Peragon, J.; Esteban, F. J.; de la Higuera, M.; Lupianez, J. A. *Comp Biochem Phys C* **2006**, *144*, 130-140.
- (55) Fernandez-Navarro, M.; Peragon, J.; Amores, V.; De La Higuera, M.; Lupianez, J. A. *Comp Biochem Phys C* **2008**, *147*, 158-167.
- (56) Rufino-Palomares, E.; Reyes-Zurita, F. J.; Fuentes-Almagro, C. A.; de la Higuera, M.; Lupianez, J. A.; Peragon, J. *Proteomics* **2011**, *11*, 3312-3325.
- (57) Rufino-Palomares, E. E.; Reyes-Zurita, F. J.; Garcia-Salguero, L.; Peragon, J.; de la Higuera, M.; Lupianez, J. A. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2016**, *187*, 32-42.
- (58) Cunha, L. C. S.; Silva, M. L. A. E.; Furtado, N. A. J. C.; Vinholis, A. H. C.; Martins, C. H. G.; da Silva, A. A.; Cunha, W. R. *Naturforsch* **2007**, *62*, 668-672.
- (59) Ma, C. Y.; Zhang, H. J.; Tan, G. T.; Van Hung, N.; Cuong, N. M.; Soejarto, D. D.; Fong, H. H. S. *J Nat Prod* **2006**, *69*, 346-350.
- (60) Parra, A.; Rivas, F.; Lopez, P. E.; Garcia-Granados, A.; Martinez, A.; Albericio, F.; Marquez, N.; Munoz, E. *Bioorgan Med Chem* **2009**, *17*, 1139-1145.
- (61) Nieto, F. R.; Cobos, E. J.; Entrena, J. M.; Parra, A.; Garcia-Granados, A.; Baeyens, J. M. *J Nat Prod* **2013**, *76*, 737-740.
- (62) Sanchez-Gonzalez, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; Garcia-Granados, A.; Planas, J. M. *Mol Nutr Food Res* **2013**, *57*, 339-346.
- (63) Yamagishi, T.; Zhang, D. C.; Chang, J. J.; Mcphail, D. R.; Mcphail, A. T.; Lee, K. H. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3213-3216.
- (64) Numata, A.; Yang, P. M.; Takahashi, C.; Fujiki, R.; Nabae, M.; Fujita, E. *Chem Pharm Bull* **1989**, *37*, 648-651.
- (65) Reyes, F. J.; Centelles, J. J.; Lupianez, J. A.; Cascante, M. *Febs Lett* **2006**, *580*, 6302-6310.
- (66) Juan, M. E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutierrez, V.; Planas, J. M.; Daniel, H. *Faseb J* **2005**, *19*, A996-A996.
- (67) Juan, M. E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Planas, J. M. *J Nutr* **2006**, *136*, 2553-2557.
- (68) Juan, M. E.; Planas, J. M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. *Brit J Nutr* **2008**, *100*, 36-43.
- (69) Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomares, E. E.; Lupianez, J. A.; Cascante, M. *Cancer Lett* **2009**, *273*, 44-54.
- (70) Reyes-Zurita, F. J.; Pachon-Pena, G.; Lizarraga, D.; Rufino-Palomares, E. E.; Cascante, M.; Lupianez, J. A. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 154.

- (71) Bai, X.; Zhang, Y.; Jiang, H. F.; Yang, P.; Li, H.; Zhang, Y.; He, P. *Mol Med Rep* **2016**, *13*, 117-122.
- (72) Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomares, E. E.; Garcia-Salguero, L.; Peragon, J.; Medina, P. P.; Parra, A.; Cascante, M.; Lupianez, J. A. *Plos One* **2016**, *11*.
- (73) Martin, R.; Carvalho, J.; Ilbeas, E.; Hernandez, M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Nieto, M. L. *Cancer Res* **2007**, *67*, 3741-3751.
- (74) Li, C. H.; Yang, Z. F.; Zhai, C. Y.; Qiu, W. W.; Li, D. L.; Yi, Z. F.; Wang, L.; Tang, J.; Qian, M.; Luo, J.; Liu, M. Y. *Mol Cancer* **2010**, *9*.
- (75) Hsum, Y. W.; Yew, W. T.; Hong, P. L. V.; Soo, K. K.; Hoon, L. S.; Chieng, Y. C.; Mooi, L. Y. *Planta Med* **2011**, *77*, 152-157.
- (76) Wu, D.-M.; Zhao, D.; Li, D.-Z.; Xu, D.-Y.; Chu, W.-F.; Wang, X.-F. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Experim Pathol Pharmacol* **2011**, *383*, 321-330.
- (77) Mooi, L. Y.; Yew, W. T.; Hsum, Y. W.; Soo, K. K.; Hoon, L. S.; Chieng, Y. C. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **2012**, *13*, 1177-1182.
- (78) Park, S. Y.; Nho, C. W.; Kwon, D. Y.; Kang, Y. H.; Lee, K. W.; Park, J. H. *Brit J Nutr* **2013**, *109*, 210-222.
- (79) Zhang, S. L.; Ding, D. G.; Zhang, X. S.; Shan, L.; Liu, Z. H. *Mol Cell Biochem* **2014**, *392*, 281-287.
- (80) Hsia, T. C.; Liu, W. H.; Qiu, W. W.; Luo, J.; Yin, M. C. *Molecules* **2014**, *19*, 19892-19906.
- (81) Villar, V. H.; Vogler, O.; Barcelo, F.; Gomez-Florit, M.; Martinez-Serra, J.; Obrador-Hevia, A.; Martin-Broto, J.; Ruiz-Gutierrez, V.; Alemany, R. *J Nutr Biochem* **2014**, *25*, 429-438.
- (82) Parra, A.; Rivas, F.; Martin-Fonseca, S.; Garcia-Granados, A.; Martinez, A. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 5991-6001.
- (83) Siewert, B.; Pianowski, E.; Csuk, R. *Eur J Med Chem* **2013**, *70*, 259-272.
- (84) Siewert, B.; Wiemann, J.; Kowitsch, A.; Csuk, R. *Eur J Med Chem* **2014**, *72*, 84-101.
- (85) Parra, A.; Martin-Fonseca, S.; Rivas, F.; Reyes-Zurita, F. J.; Medina-O'Donnell, M.; Martinez, A.; Garcia-Granados, A.; Lupianez, J. A.; Albericio, F. *Eur J Med Chem* **2014**, *74*, 278-301.
- (86) Siewert, B.; Pianowski, E.; Obernauer, A.; Csuk, R. *Bioorgan Med Chem* **2014**, *22*, 594-615.
- (87) Parra, A.; Martin-Fonseca, S.; Rivas, F.; Reyes-Zurita, F. J.; Medina-O'Donnell, M.; Rufino-Palomares, E. E.; Martinez, A.; Garcia-Granados, A.; Lupianez, J. A.; Albericio, F. *ACS Comb Sci* **2014**, *16*, 428-447.

- (88) Medina-O'Donnell, M.; Rivas, F.; Reyes-Zurita, F. J.; Martinez, A.; Martin-Fonseca, S.; Garcia-Granados, A.; Ferrer-Martin, R. M.; Lupianez, J. A.; Parra, A. *Eur J Med Chem* **2016**, *118*, 64-78.
- (89) Wu, X. W.; Molinaro, C.; Johnson, N.; Casiano, C. A. *Arthritis Rheum* **2001**, *44*, 2642-2652.
- (90) Farber, E. *Modern Pathol* **1994**, *7*, 605-609.
- (91) Lauber, K.; Blumenthal, S. G.; Waibel, M.; Wesselborg, S. *Mol Cell* **2004**, *14*, 277-287.
- (92) Matsuyama, S.; Llopis, J.; Deveraux, Q. L.; Tsien, R. Y.; Reed, J. C. *Nat Cell Biol* **2000**, *2*, 318-325.
- (93) Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115-128.
- (94) Nilsson, C.; Johansson, U.; Johansson, A. C.; Kagedal, K.; Ollinger, K. *Apoptosis* **2006**, *11*, 1149-1159.
- (95) Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. *Nature* **1998**, *393*, 396-396.
- (96) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Brit J Cancer* **1972**, *26*, 239-257.
- (97) Ellis, R. E.; Yuan, J. Y.; Horvitz, H. R. *Annu Rev Cell Biol* **1991**, *7*, 663-698.
- (98) Savill, J.; Fadok, V. *Nature* **2000**, *407*, 784-788.
- (99) Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L.; Henson, P. M. *J Immunol* **1992**, *148*, 2207-2216.
- (100) Hewett-Emmett, D.; Tashian, R. E. *Mol Phylogenet Evol* **1996**, *5*, 50-77.
- (101) Nishimori, I.; Onishi, S.; Takeuchi, H.; Supuran, C. T. *Curr Pharm Design* **2008**, *14*, 622-630.
- (102) Smith, K. S.; Jakubzick, C.; Whittam, T. S.; Ferry, J. G. *P Natl Acad Sci USA* **1999**, *96*, 15184-15189.
- (103) Sly, W. S.; Hu, P. Y. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 375-401.
- (104) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. *Bioorgan Med Chem* **2007**, *15*, 4336-4350.
- (105) Henry, R. P.; Swenson, E. R. *Resp Physiol* **2000**, *121*, 1-12.
- (106) Stabenau, E. K.; Heming, T. *Comp Biochem Phys A* **2003**, *136*, 271-279.
- (107) Supuran, C. T. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 3467-3474.
- (108) Potter, C. P. S.; Harris, A. L. *Brit J Cancer* **2003**, *89*, 2-7.
- (109) Robertson, N.; Potter, C.; Harris, A. L. *Cancer Res* **2004**, *64*, 6160-6165.

- (110) Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M. I.; Sivridis, E.; Pastorek, J.; Wykoff, C. C.; Gatter, K. C.; Harris, A. L. *Cancer Res* **2001**, *61*, 7992-7998.
- (111) Chia, S. K.; Wykoff, C. C.; Watson, P. H.; Han, C.; Leek, R. D.; Pastorek, J.; Gatter, K. C.; Ratcliffe, P.; Harris, A. L. *J Clin Oncol* **2001**, *19*, 3660-3668.
- (112) Lou, Y. M.; McDonald, P. C.; Oloumi, A.; Chia, S.; Ostlund, C.; Ahmadi, A.; Kyle, A.; Keller, U. A. D.; Leung, S.; Huntsman, D.; Clarke, B.; Sutherland, B. W.; Waterhouse, D.; Bally, M.; Roskelley, C.; Overall, C. M.; Minchinton, A.; Pacchiano, F.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Touisni, N.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. *Cancer Res* **2011**, *71*, 3364-3376.
- (113) Chiche, J.; Ilc, K.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouyssegur, J. *Adv Enzyme Regul* **2010**, *50*, 20-33.
- (114) Dorai, T.; Sawczuk, I.; Pastorek, J.; Wiernik, P. H.; Dutcher, J. P. *Cancer Invest* **2006**, *24*, 754-779.
- (115) Neri, D.; Supuran, C. T. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 767-777.
- (116) Winum, J. Y.; Rami, M.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran, C. *Med Res Rev* **2008**, *28*, 445-463.
- (117) Brzozowski, Z.; Slawinski, J.; Vullo, D.; Supuran, C. T. *Eur J Med Chem* **2012**, *56*, 282-291.
- (118) Casini, A.; Mincione, F.; Ilies, M. A.; Menabuoni, L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J Enzym Inhib* **2001**, *16*, 113-123.
- (119) Brzozowski, Z.; Slawinski, J.; Saczewski, F.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Eur J Med Chem* **2010**, *45*, 2396-2404.
- (120) Garaj, V.; Puccetti, L.; Fasolis, G.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 5427-5433.
- (121) Winum, J. Y.; Pastorekova, S.; Jakubickova, L.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Pastorek, J.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 579-584.
- (122) Silverman, D. N.; Mckenna, R. *Accounts Chem Res* **2007**, *40*, 669-675.
- (123) MacCarthy-Morrogh, L.; Townsend, P. A.; Purohit, A.; Hejaz, H. A. M.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Packham, G. *Cancer Res* **2000**, *60*, 5441-5450.
- (124) Leese, M. P.; Jourdan, F. L.; Gaukroger, K.; Mahon, M. F.; Newman, S. P.; Foster, P. A.; Stengel, C.; Regis-Lydi, S.; Ferrandis, E.; Di Fiore, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J Med Chem* **2008**, *51*, 1295-1308.
- (125) Visagie, M. H.; Birkholtz, L. M.; Joubert, A. M. *Cell Biosci* **2015**, *5*.
- (126) Leese, M. P.; Hejaz, H. A. M.; Mahon, M. F.; Newman, S. P.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J Med Chem* **2005**, *48*, 5243-5256.

- (127) Leese, M. P.; Leblond, B.; Smith, A.; Newman, S. P.; Di Fiore, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7683-7696.
- (128) Appel, R.; Berger, G. *Chem Ber-Recl* **1958**, *91*, 1339-1341.
- (129) Pocker, Y.; Stone, J. T. *J Am Chem Soc* **1965**, *87*, 5497-5498.
- (130) Wistrand, P. J. *Ann Ny Acad Sci* **1984**, *429*, 609-619.
- (131) Bowden, K.; Heilbron, I. M.; Jones, E. R. H.; Weedon, B. C. L. *J Chem Soc* **1946**, 39-45.
- (132) Ali, M. H.; Wiggin, C. J. *Synthetic Commun* **2001**, *31*, 1389-1397.
- (133) Ihara, M.; Toyota, M.; Fukumoto, K.; Kametani, T. *J Chem Soc Perk T 1* **1986**, 2151-2161.
- (134) Wen, X. A.; Sun, H. B.; Liu, J.; Cheng, K. G.; Zhang, P.; Zhang, L. Y.; Hao, J.; Zhang, L. Y.; Ni, P. Z.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Alexacou, K. M.; Gimisis, T.; Hayes, J. M.; Oikonomakos, N. G. *J Med Chem* **2008**, *51*, 3540-3554.
- (135) Tschesche, R.; Henckel, E.; Snatzke, G. *Liebigs Ann Chem* **1964**, *676*, 175-187.
- (136) Pettit, G. R.; Melody, N.; Hempenstall, F.; Chapuis, J. C.; Groy, T. L.; Williams, L. *J Nat Prod* **2014**, *77*, 863-872.
- (137) Rodriguez-Rodriguez, R.; Perona, J. S.; Herrera, M. D.; Ruiz-Gutierrez, V. *J Agr Food Chem* **2006**, *54*, 2096-2102.
- (138) Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Higashihara, H.; Ukiya, M.; Watanabe, K.; Kimura, Y.; Hasegawa, J.; Nishino, H. *Biosci Biotech Bioch* **2004**, *68*, 85-90.
- (139) Liu, P.; Duan, H. Q.; Pan, Q.; Zhang, Y. W.; Yao, Z. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2006**, *31*, 1875-1879.
- (140) Yoshida, M.; Fuchigami, M.; Nagao, T.; Okabe, H.; Matsunaga, K.; Takata, J.; Karube, Y.; Tsuchihashi, R.; Kinjo, J.; Mihashi, K.; Fujioka, T. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 173-175.
- (141) Kojima, H.; Ogura, H. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 729-733.
- (142) Du, D. S.; Cheng, Z. H.; Chen, D. F. *Nat Prod Commun* **2012**, *7*, 501-505.
- (143) Brieskorn, C. H.; Kapadia, Z. *Planta Med* **1980**, *38*, 86-90.
- (144) Parra, A.; Lopez, P. E.; Garcia-Granados, A. *Nat Prod Res* **2010**, *24*, 177-196.
- (145) Hussain, H.; Al-Harrasi, A.; Green, I. R.; Ahmed, I.; Abbas, G.; Rehman, N. U. *Rsc Adv* **2014**, *4*, 12882-12917.
- (146) Tschesche, R.; Sengupta, A. K. *Chem Ber-Recl* **1960**, *93*, 1903-1913.

- (147) Tschesche, R.; Henckel, E.; Snatzke, G. *Tetrahedron Lett* **1963**, 613-617.
- (148) Cheng, K. G.; Zhang, P.; Liu, J.; Xie, J.; Sun, H. B. *J Nat Prod* **2008**, *71*, 1877-1880.
- (149) Knauer, K. H.; Gleiter, R. *Angew Chem Int Edit* **1977**, *16*, 113-113.
- (150) Kim, K. K.; Lange, T. S.; Singh, R. K.; Brard, L.; Moore, R. G. *BMC cancer* **2012**, *12*.
- (151) Vasconcelos, I. B.; da Silva, T. G.; Militao, G. C. G.; Soares, T. A.; Rodrigues, N. M.; Rodrigues, M. O.; da Costa, N. B.; Freire, R. O.; Junior, S. A. *Rsc Adv* **2012**, *2*, 9437-9442.
- (152) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J Am Chem Soc* **1971**, *93*, 2325-2327.
- (153) Liebmann, J. E.; Cook, J. A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchell, J. B. *Brit J Cancer* **1993**, *68*, 1104-1109.
- (154) Panda, V.; Khambat, P.; Patil, S. *International Journal of Clinical Medicine* **2011**, *2*, 515-529.
- (155) Modica-Napolitano, J. S.; Aprile, J. R. *Adv Drug Deliver Rev* **2001**, *49*, 63-70.
- (156) Davis, S.; Weiss, M. J.; Wong, J. R.; Lampidis, T. J.; Chen, L. B. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 3844-3850.
- (157) Modicanapolitano, J. S.; Aprile, J. R. *Cancer Res* **1987**, *47*, 4361-4365.
- (158) Breitmaier, E., *Terpene, Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*, 2. Auflage, Wiley-VCH; Verlag, W., 2005, S. 2. **2005**, 2. Auflage.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Triterpen Grundgerüst-Typen</i>	2
Abbildung 2: <i>Biosynthese von Oleanolsäure ausgehend von 2,3-Oxidosqualen</i>	2
Abbildung 3: <i>Struktur von Maslinsäure</i>	3
Abbildung 4: <i>Strukturvorschlag von TSCHESCHE für Crataegolsäure aus dem Jahr 1951 (links) und 1958 (rechts)</i>	4
Abbildung 5: <i>Olivenzweig mit Frucht und Blüte</i> ²³	5
Abbildung 6: <i>Vergleichende Darstellung der Forellen mit (250 mg/kg, oben) und ohne (unten) Maslinsäure als Futtermittelzusatz. Abbildung aus FERNÁNDEZ-NAVARRO et al.</i> ⁵⁵	6
Abbildung 7: <i>Unterschiedliche Wirkmechanismen von Maslinsäure. Abbildung von REYES et al.</i> ⁷²	8
Abbildung 8: <i>Struktur von EM2</i>	10
Abbildung 9: <i>Ausschnitt von dem aktiven Zentrum der hCA II mit Zink (II)-Ion (schwarz). Abbildung aus SILVERMAN und MCKENNA</i> ¹²³	12
Abbildung 10: <i>Syntheschema zur Darstellung der Triterpen-Sulfamate; Struktur der Referenzsubstanz Acetazolamid</i>	14
Abbildung 11: <i>Syntheschema zur Darstellung von Maslinsäure (links) und Augustussäure (rechts)</i>	16
Abbildung 12: <i>Syntheschema zur Darstellung der 4 diastereomeren 2,3-Dihydroxy-olean-12-en-28-säuren ausgehend von Oleanolsäure</i>	18
Abbildung 13: <i>Farblich hervorgehobene Bereiche bei EM2, die während der SAR-Studie untersucht wurden</i>	19
Abbildung 14: <i>Syntheschema für die Darstellung der Pyridinyl- und Chinolinyl-Amide</i>	21
Abbildung 15: <i>Vergleich der zytotoxischen Aktivität der Chinolin- bzw. Isochinolin-Derivate bezüglich sechs Krebszelllinien und der embryonalen Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3</i> .	22
Abbildung 16: <i>Strukturen und UV/Vis-Spektren von 33 und 34</i>	23
Abbildung 17: <i>A2780 Eierstockkrebszellen wurden mit 33, Rhodamin 123 sowie Hoechst 33342 inkubiert und anschließend fluoreszenz- und lichtmikroskopisch untersucht (Maßstabsbalken: 20 µm)</i>	25
Abbildung 18: <i>Struktur des aktiven Oleanolsäure-Sulfamat 1 (links) und der Referenzsubstanz Acetazolamid (rechts)</i>	26
Abbildung 19: <i>Strukturen von Derivat 12 (links) und Derivat 32 (rechts) aus den SAR-Studien</i>	27

Abbildung 20: *Strukturen der Maslinsäure-Rhodamin-B-Konjugate; EC₅₀-Werte (in μM) bezüglich der Krebszelllinie A2780 (Eierstockkrebs) und der nicht malignen Zelllinie NIH 3T3 (embryonale Mausfibroblasten); Selektivitätsfaktor ($F_{SI} = EC_{50, NIH\ 3T3} / EC_{50, Tumor-Zelllinie}$)*..... 28

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: *Bei der Untersuchung von Maslinsäure verwendete Zelllinien und gewonnener Erkenntnisstand; ↑ erhöhte Aktivität, ↓ verringerte Aktivität* 9

Tabelle 2: *EC₅₀-Werte in μM sowie der maximale Selektivitätsfaktor ($F_{SI} = EC_{50, NIH\ 3T3} / EC_{50, Tumor-Zelllinie}$)* 24

8 Anhang

Die für diese Arbeit relevanten Publikationen sind wie folgt gegliedert:

Publikation 1: „Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II“

Schwarz, S.; Sommerwerk, S.; Lucas, S.D.; Heller, L.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 95-102.

Publikation 2: „Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Csuk, R., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2015**, *348*, 46-54.

Publikation 3: „Convenient and chromatography-free partial syntheses of maslinic acid and augustic acid“

Sommerwerk, S.; Csuk, R., *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5156-5158.

Publikation 4: „Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Serbian, I.; Csuk, R., *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8528-8534.

Publikation 5: „Urea derivates of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 1-16.

Publikation 6: „Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464.

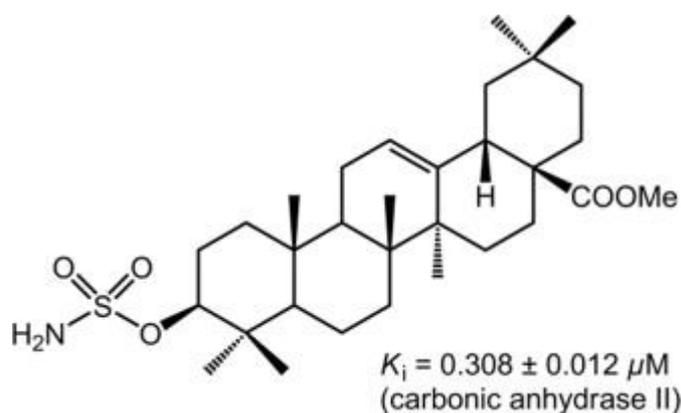
Publikation 7: „Rhodamin B conjugates of triterpenoic acids are mitocans and cytotoxic even at nanomolar concentrations“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kerzig, C.; Kramell A.E.; Csuk, R.; *Europ. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 1-9.

8.1 Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II

Schwarz, S.; Sommerwerk, S.; Lucas, S.D.; Heller, L.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 95-102.

Graphical abstract:



Abstract:

Carbonic anhydrase II, belonging to one of the most important enzyme groups of the human body, is a well-studied isozyme from the family of the carbonic anhydrases. Since it is involved in several physiological processes, it has been a pharmaceutical target for many years. In this study we synthesized a number of sulfamates derived from pentacyclic methyl triterpenoates, and we demonstrate their potential as carbonic anhydrase II inhibitors using the well-established photometric 4-nitrophenyl acetate assay. Inhibition constants, as an indicator of their inhibition strength, were in the micromolar range; one compound (**10**, methyl (3 β) 3-(aminosulfonyloxy)-oleanoate) showed a K_i value as low as 0.3 μM . This K_i value is comparable to that of acetazolamide which is a potent carbonic anhydrase inhibitor and a drug for the treatment of glaucoma.

Keywords:

Carbonic anhydrase II; Triterpenoic acids; Enzyme Inhibition; Sulfamates

DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.08.051

8.2 Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Csuk, R., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2015**, *348*, 46-54.

Abstract:

Methyl triterpenoates derived from oleanolic, ursolic, betulinic, glycyrrhetic, platanic, or maslinic acid were converted into their corresponding sulfamates and carbamoylsulfamates. The sulfamates were screened in photometric sulforhodamine assays for cytotoxic activity employing several human tumor cell lines. Many of the compounds showed EC₅₀ values in one-digit μ M concentration. Of special interest seems methyl (3 β) 3-(aminosulfonyloxy)-11-oxo-oleanoate (**18**) showing good cytotoxicity for the human adenocarcinomic alveolar basal epithelial cell line A549 while being less toxic for non-malignant NIH 3T3 mouse fibroblasts.

Keywords:

Carbamoylsulfamates; Cytotoxic activity; Triterpenoids; Sulfamates

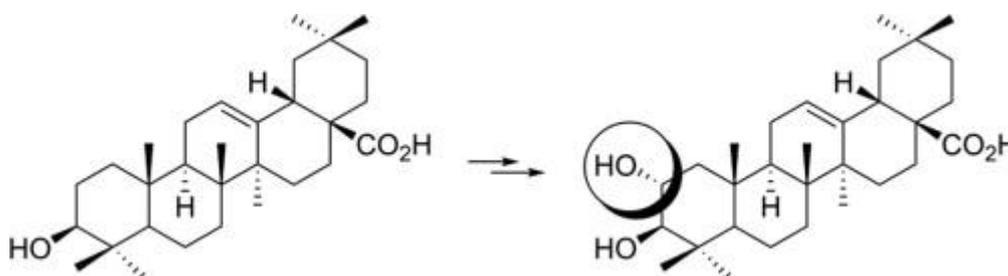
DOI: 10.1002/ardp.201400297

8.3 Convenient and chromatography-free partial syntheses of maslinic acid and augustic acid

Sommerwerk, S.; Csuk, R., *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5156-5158.

Graphical abstract:

A convenient and chromatography-free route has been developed for a partial synthesis of maslinic acid and augustic acid from oleanolic acid.



Abstract:

A convenient and chromatography-free 4-step synthesis of analytically pure maslinic acid (**1**, 41.2%) from oleanolic acid has been developed. Slight variations in the final steps gave an excellent yield of isomeric augustic acid (**7**, 71.9%).

Keywords:

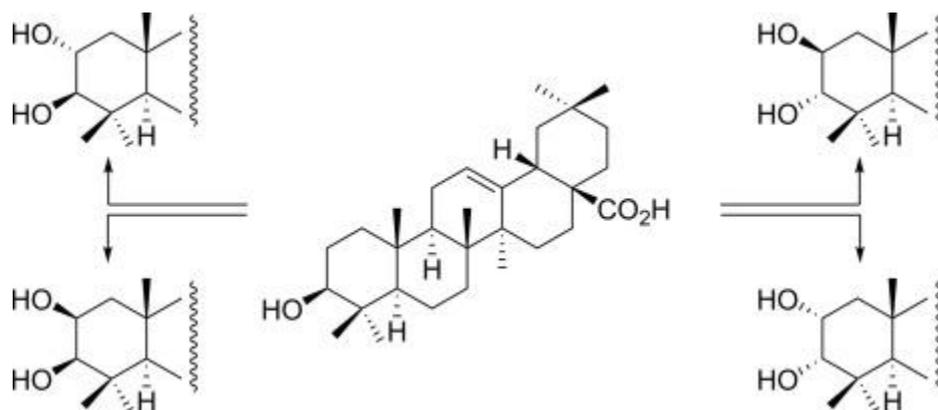
Triterpenes; Maslinic acid; Augustic acid; Oleanolic acid; Synthesis

DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.07.074

8.4 Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Serbian, I.; Csuk, R., *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8528-8534.

Graphical abstract:



Abstract:

The four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids (maslinic, augustic, bredemolic and 3-*epi*-maslinic acid) were easily accessed from one single starting material, oleanolic acid. The procedures allow the medium-to-large scale preparation of these valuable starting materials. Except for maslinic acid, the triterpenoic acids showed only a low cytotoxicity towards several human tumor cell lines.

Keywords:

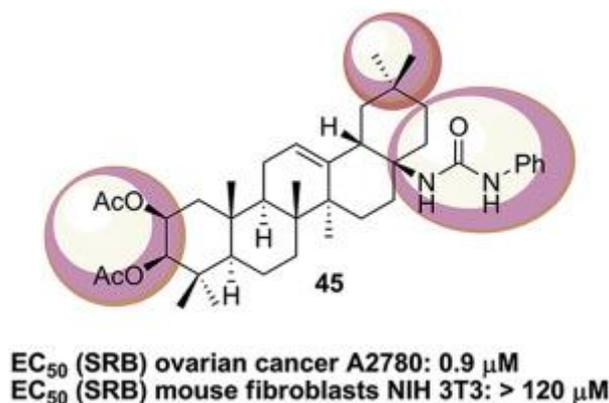
Maslinic acid; Augustic acid; Bredemolic acid; 3-*epi*-Maslinic acid; Cytotoxicity

DOI: 10.1016/j.tet.2015.09.037

8.5 Urea derivates of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 1-16.

Graphical abstract:



Abstract:

2,3-Di-*O*-acetyl-maslinic acid benzylamide (**5**) has previously been shown to possess high cytotoxicity for a variety of human tumor cell lines while being of low cytotoxicity to non-malignant cells. Structural modifications performed on **5** revealed that the presence of these acetyl groups in **5** and the presence of (2 β ,3 β)-configured centers seems necessary for obtaining high cytotoxicity combined with best selectivity between malignant cells and non-malignant mouse fibroblasts. Compounds carrying an ursane skeleton showed weaker cytotoxicity than their oleanane derived analogs. In addition, the benzylamide function in compound **5** should be replaced by a phenylurea moiety to gain better cytotoxicity while retaining and improving the selectivity. Thus, maslinic acid derived *N*-[2 β ,3 β -di-*O*-acetyl-17 β -amino-28-norolean-12-en-17-yl]phenylurea (**45**) gave best results showing EC_{50} = 0.9 μ M (for A2780 ovarian cancer cells) with EC_{50} > 120 μ M for fibroblasts (NIH 3T3) and triggered apoptosis while caspase-3 was not activated by this compound.

Keywords:

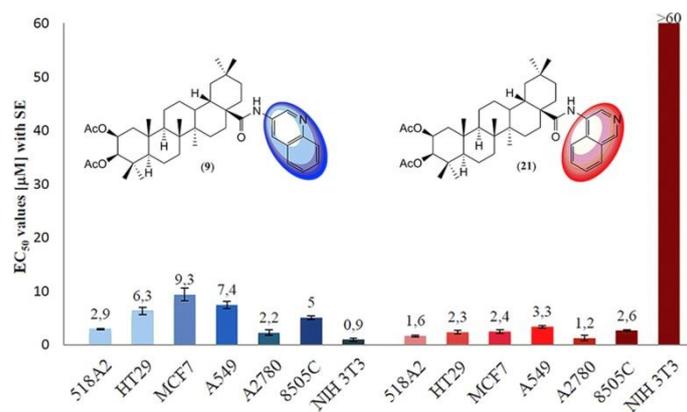
Ursolic acid; Oleanolic acid; Maslinic acid; Tumor cells; SRB assay; Apoptosis

8.6 Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464.

Graphical abstract:

A small structural difference (3-quinolinyl/4-isoquinolinyl) has a strong impact on cytotoxicity and malignant/non-malignant cell selectivity.



Abstract:

2,3-Di-*O*-acetyl-triterpenoic acid derived amides possessing a (2 β , 3 β) configuration in ring A and two acetyl groups were previously shown to possess high cytotoxicity for human tumor cell lines but to exhibit low cytotoxicity for non-malignant mouse fibroblasts. In this study, augustic acid (**1**) and 2-*epi*-corosolic acid (**2**) were chosen as starting points for the synthesis of analogs. While augustic acid derived 3-quinolinyl amide **9** gave low EC₅₀ values in SRB assays but was cytotoxic for all lines, the isomeric 4-isoquinolinyl amide **21** was very cytotoxic for the tumor cell lines but significantly less cytotoxic for the mouse fibroblasts NIH 3T3. In addition, a triacetylated 4-isoquinolinyl derivative of asiatic acid (**28**) gave EC₅₀ = 80 nM (for A2780 ovarian cancer cells). As shown by additional experiments (acridine orange/propidium iodide staining, fluorescence spectroscopy and cell cycle investigations) these compounds act mainly by apoptosis.

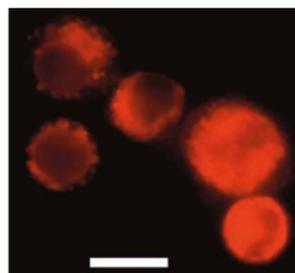
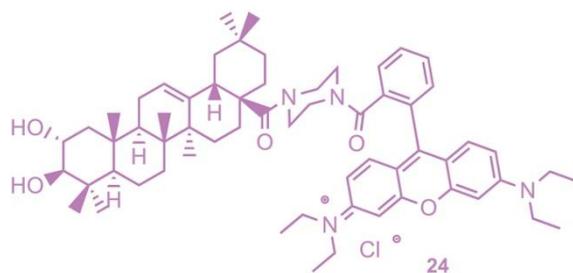
Keywords:

Maslinic acid; Oleanolic acid; Asiatic acid; Tumor cells; SRB assay; Apoptosis

8.7 Rhodamin B conjugates of triterpenoic acids are mitocans and cytotoxic even at nanomolar concentrations

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kerzig, C.; Kramell A.E.; Csuk, R.; *Europ. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 1-9.

Graphical abstract:



EC₅₀ = 7 nM (A2780 ovarian carcinoma)

Abstract:

Triterpenoic acids **1–6** exhibited very low or no cytotoxicity at all, but their corresponding 2,3-di-*O*-acetyl-piperazinyl amides **13–18** showed low EC₅₀ values for several human tumor cell lines. Their cytotoxicity, however, was also high for the non-malignant mouse fibroblasts NIH 3T3. A significant improvement was achieved by preparing the rhodamine B derivatives **19–24**. While rhodamine B is not cytotoxic (up to a concentration of 30 μM – cut-off of the assay), the triterpenoid piperazine-spacered rhodamine B derivatives were cytotoxic in nanomolar concentration. Compound **24** (a diacetylated maslinic acid derivative) was most toxic for several human tumor cell lines but less toxic for mouse fibroblasts NIH 3T3. Staining and double-staining experiments revealed **24** to act as a mitocan.

Keywords:

Triterpenes; Maslinic acid; Mitocan; Cytotoxicity; Rhodamine B; Betulinic acid; Oleanolic acid; Ursolic acid; Platanic acid; Glycyrrhetic acid

DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.040

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Sven Sommerwerk
Geburtsdatum	25.03.1987
Geburtsort	Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsweg

10/2010 – 09/2012	Master of Science Chemie (1,5) MLU Halle-Wittenberg (Institut für Chemie)
10/2007 – 10/2010	Bachelor of Science Chemie (2,3) MLU Halle-Wittenberg (Institut für Chemie)
08/2001 – 03/2006	Allgemeine Hochschulreife (1,8) Melanchthon-Gymnasium Lutherstadt-Wittenberg

Praxiserfahrung

07/2016 – heute	Research Chemist for Organic Synthesis Projektleitender Chemiker ChiroBlock GmbH Wolfen
06/2013 – 06/2016	Wissenschaftlicher Mitarbeiter MLU Halle-Wittenberg (Institut für Chemie)
04/2015 – 09/2015	Wissenschaftliche Hilfskraft MLU Halle-Wittenberg (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften)
06/2013 – 11/2013	Wissenschaftliche Hilfskraft MLU Halle-Wittenberg (Institut für Technische Biochemie)
06/2007 – 08/2007	Aushilfskraft Polymer-Technik Elbe GmbH
02/2007 – 04/2007	Praktikum SKW-Piesteritz
04/2006 – 12/2006	Grundwehrdienst

Sven Sommerwerk

Publikationsliste

„Isolation, structure, synthesis and cytotoxicity of an unprecedented flupirtine dimer“

Csuk, R.; **Sommerwerk, S.**; Wiese, J.; Wagner, C.; Siewert, B.; Kluge, R.; Ströhl, D., *Z. Naturforsch.* **2012**, *67*, 1297-1304.

„Synthesis of a maradolipid without using protecting groups“

Csuk, R.; Schultheiss, A.; **Sommerwerk, S.**; Kluge, R., *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2274-2276.

„Amino derivatives of glycyrrhetic acid as potential inhibitors of cholinesterases“

Schwarz, S.; Lucas, S.D.; **Sommerwerk, S.**; Csuk, R., *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3370-3378.

„Convenient and chromatography-free partial syntheses of maslinic acid and augustic acid“

Sommerwerk, S.; Csuk, R., *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5156-5158.

„Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II“

Schwarz, S.; **Sommerwerk, S.**; Lucas, S.D.; Heller, L.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 95-102.

„First total synthesis of piperodione and analogs“

Sommerwerk, S.; Kern, S.; Heller, L.; Csuk, R., *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6243-6244.

„Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Csuk, R., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2015**, *348*, 46-54.

„Chemoenzymatic synthesis and cytotoxicity of oenanthotoxin and analogues“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Siewert, B.; Csuk, R., *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5595-5602.

„Converting maslinic acid into an effective inhibitor of acylcholinesterases“

Schwarz, S.; Loesche, A.; Lucas, S.D.; **Sommerwerk, S.**; Serbian, I.; Siewert, B.; Pianowski, E.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 438-445.

„Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Serbian, I.; Csuk, R., *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8528-8534.

„First Occurrence of a Furano-glycyrrhetoate and Its Cytotoxicity“

Heller, L.; **Sommerwerk, S.**; Tzschoeckell, F.; Wiemann, J.; Schwarz, S.; Siewert, B.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2015**, *348*, 889-896.

„Synthesis, characterization and cytotoxicity of new piplartine dimers“

Sommerwerk, S.; Kluge, R.; Ströhl, D.; Heller, L.; Kramell, A.E.; Ogiolda, S.; Liebing, P.; Csuk, R., *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1447-1454.

„Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 1-16.

„Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464.

„5-epi-Incensole: synthesis, X-ray crystal structure and absolute configuration by means of ECD and VCD studies in solution and solid state“

Avula, S.K.; Hussain, H.; Csuk, R.; **Sommerwerk, S.**; Liebing, P.; Gorecki, M.; Pescitelli, G.; Al-Rawahi, A.; Ur, R.N.; Green, I.R., *Tetrahedron Asymm.* **2016**, *27*, 829-833.

„Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides“

Heller, L.; Knorrscheidt, A.; Flemming, F.; Wiemann, J.; **Sommerwerk, S.**; Pavel, I.Z.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R., *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137-151.

„Repurposing N,N'-bis-(arylamidino)-1,4-piperazinedicarboxamidines: An unexpected class of potent inhibitors of cholinesterases“

Loesche, A.; Wiese, J.; **Sommerwerk, S.**; Simon, V.; Brandt, W.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 430-434.

„Drotaverine – a Concealed Cytostatic“

Pavel, I.Z.; Heller, L.; **Sommerwerk, S.**; Loesche, A.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2016**, *349*, 1-5.

„The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis”

Miettinen, K.; Pollier, J.; Buyst, D.; Arendt, P.; Csuk, R.; **Sommerwerk, S.**; Moses, T.; Mertens, J.; Sonowane, P.; Pauwels, L.; Aharoni, A.; Martins, J; Nelson, D.; Goossens A., *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1-13.

„Rhodamine B conjugates of triterpenoic acids are cytotoxic mitocans even at nanomolar concentrations “

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kerzig, C.; Kramell, A. E.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2017**, 127, 1-9.

Erklärung über Autorenanteil

Publikation 1: „Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II“

Schwarz, S.; Sommerwerk, S.; Lucas, S.D.; Heller, L.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 95-102.

Die Synthese der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. Darüber hinaus wurden die Messungen der IR- und UV/Vis-Spektren sowie die Bestimmung des spezifischen Drehwertes von mir durchgeführt. Die Anfertigung und Auswertung des Enzymassays übernahm S. Schwarz. Die Untersuchungen zum molekularen Docking wurden von S.D. Lucas vorgenommen. Die Bestimmung der EC₅₀-Werte wurde von L. Heller durchgeführt. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Publikation 2: „Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Csuk, R., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2015**, *348*, 46-54.

Die Synthese der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. Darüber hinaus wurden die Messungen der IR- und UV/Vis-Spektren sowie die Bestimmung des spezifischen Drehwertes von mir durchgeführt. Die Bestimmung der EC₅₀-Werte wurde von L. Heller vorgenommen. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Publikation 3: „Convenient and chromatography-free partial syntheses of maslinic acid and augustic acid“

Sommerwerk, S.; Csuk, R., *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5156-5158.

Die Synthese der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Publikation 4: „Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Serbian, I.; Csuk, R., *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8528-8534.

Der Großteil der Synthesen der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. Die Bestimmung der EC₅₀-Werte wurde von L. Heller durchgeführt. Teile der Synthese wurden von I. Serbian unter meiner Betreuung durchgeführt. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Publikation 5: „Urea derivates of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 1-16.

Der Großteil der Synthesen der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. Sämtliche Zelltest relevanten Untersuchungen wurden von L. Heller durchgeführt. Teile der Synthese wurden von J. Kuhfs unter meiner Betreuung durchgeführt. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Publikation 6: „Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R., *Europ. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464.

Der Großteil der Synthesen der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. Sämtliche Zelltest relevanten Untersuchungen wurden von L. Heller durchgeführt. Teile der Synthese wurden von J. Kuhfs unter meiner Betreuung durchgeführt. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Publikation 7: „Rhodamin B conjugates of triterpenoic acids are mitocans and cytotoxic even at nanomolar concentrations“

Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kerzig, C.; Kramell A.E.; Csuk, R.; Manuskript eingereicht in *Europ. J. Med. Chem.*

Die Synthese der Verbindungen sowie die Auswertung der spektroskopischen Daten wurde von mir vorgenommen. Die photochemischen Untersuchungen wurden von C. Kerzig vorge-

nommen. Bei der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen half A.E. Kramell. R. Csuk betreute die Arbeit in praktischen sowie theoretischen Aspekten.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle (Saale), 04.09.2017

Sven Sommerwerk