

# **SYNTHESE ANTITUMORAKTIVER TRITERPEN- CARBONSÄURE-DERIVATE**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II  
Chemie, Physik, Mathematik

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Michael Kahnt  
geb. am 21.02.1991 in Schkeuditz

Gutachter:

1. Prof. Dr. René Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Dieter Schinzer (Otto von Guericke Universität Magdeburg)

Halle (Saale), den 19.06.2019

Datum der Verteidigung: 27.11.2019

## **Vorwort**

Diese vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurde im Zeitraum von November 2015 bis Juni 2019 am Institut für Chemie im Bereich für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. René Csuk angefertigt und durch die Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt finanziell unterstützt. Die Arbeit wurde kumulativ angefertigt und basiert auf wissenschaftlichen Artikeln in internationalen „peer-reviewed“ Fachzeitschriften, in denen die Forschungsergebnisse publiziert wurden.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. R. Csuk für die Überlassung des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und den damit verbundenen Freiraum zur Verwirklichung eigener Ideen. Vielen Dank für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge und die Möglichkeit zur Teilnahme an diversen internationalen Tagungen.

Ein weiterer Dank richtet sich an die gesamte Arbeitsgruppe sowie ehemalige Mitglieder für die schöne gemeinsame Zeit und die entgegengebrachte Unterstützung. In diesem Zusammenhang sei besonders Fr. Dr. L. Fischer für die langjährige Unterstützung, die unvergessliche Laborzeit und die stetige Hilfsbereitschaft in jeglichen Fragestellungen gedankt. Des Weiteren möchte ich mich bei Fr. Dr. J. Wiemann, Fr. Dr. A. E. Kramell, Fr. M.Sc. A. Loesche, Hr. M.Sc. I. Serbian und Hr. M.Sc. O. Kraft für die stetige Diskussionsbereitschaft, die vielen freudigen Momente sowie für die mehr oder weniger fachlichen Gespräche in den Kaffee- und Mittagspausen bedanken. Dabei möchte ich Fr. M.Sc. A. Loesche für die angenehme Zeit in verschiedenen Praktika, die Begleitung auf diverse Fachtagungen sowie die kurze aber sehr hilfreiche Büronachbarschaft besonders danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Fr. Dr. Lucie Fischer und Fr. Dipl. LMChem. Sophie Hoenke für die Durchführung der biologischen Evaluierung und ihrer Unterstützung bei der Auswertung der biologischen Daten bedanken. Für die Aufnahme der zahlreichen ESI-Massenspektren danke ich Herrn Dr. R. Kluge. Ein großer Dank gilt auch dem Team um Hr. Dr. D. Ströhl, Fr. Y. Schiller und Fr. B.Sc. S. Ludwig für die Aufnahme der NMR Spektren. Fr. B.Sc. V. Simon danke ich für die Messung der IR- und UV-Spektren und Drehwerte. Bei Fr. Dr. R. Schäfer möchte ich mich zudem für ihre Hilfsbereitschaft und die aufschlussreichen Gespräche bedanken.

Weiterhin danke ich Fr. B.Sc. S. Ludwig, Fr. Dipl. LMChem. E. Zimmermann, Hr. C. Schulz, Hr. T. Denner und Hr. N. Heise, die ich während ihrer Abschlussarbeiten begleiten durfte, für die angenehme Zusammenarbeit im Labor.

Die finanzielle Unterstützung während der Zeit als Doktorand durch die Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt sei ebenfalls dankend erwähnt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für das entgegengebrachte Verständnis sowie die ermutigenden und motivierenden Worte. Speziell meiner Frau Saskia danke ich für ihre unendliche Geduld, die stetige Unterstützung und den nötigen Rückhalt.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Geschichte der Naturheilkunde .....	1
1.2	Die Krankheit Krebs .....	2
1.2.1	Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen .....	2
1.2.2	Entstehung maligner Tumore.....	3
1.2.3	Behandlung von Krebserkrankungen.....	3
1.2.3.1	Diagnostik malignen Gewebes .....	3
1.2.3.2	Mögliche Therapieansätze.....	4
1.2.3.3	Entwicklung naturstoffbasierter Chemotherapeutika .....	5
1.2.3.4	Aktuelle Fortschritte im Kampf gegen Krebs .....	6
1.3	Terpenoide Naturstoffe als Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe .	8
1.3.1	Einführung – Grundlagen der Wirkstoffentwicklung.....	8
1.3.2	Klassifizierung und Geschichte der Terpene .....	8
1.3.3	Platansäure .....	9
1.3.4	Weitere Triterpenoide Carbonsäuren.....	10
2	Zielstellung .....	12
3	Diskussion und Einordnung der Forschungsergebnisse .....	13
3.1	Derivatisierung von Platansäure .....	13
3.1.1	Amino Substituierte Platansäure-Derivate.....	13
3.1.2	Weiterführende Untersuchungen zur Selektivität.....	15
3.2	Derivate weiterer triterpenoider Leitstrukturen .....	17
3.2.1	Selektivitätsuntersuchungen am Beispiel der Asiasäure .....	17
3.2.2	Ethylendiamin-abgeleitete Amide von Triterpencarbonsäuren .....	18
3.2.3	DOTA-Konjugate der Ursolsäure .....	22
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	25
5	Literaturverzeichnis .....	28

Anhang.....	A-1
Publikationen.....	A-1
Publikation P1 .....	A-2
Publikation P2 .....	A-3
Publikation P3 .....	A-4
Publikation P4 .....	A-5
Publikation P5 .....	A-6
Lebenslauf .....	A-8
Publikationsliste .....	A-9
Posterbeiträge .....	A-10
Selbstständigkeitserklärung.....	A-11

## Abkürzungsverzeichnis

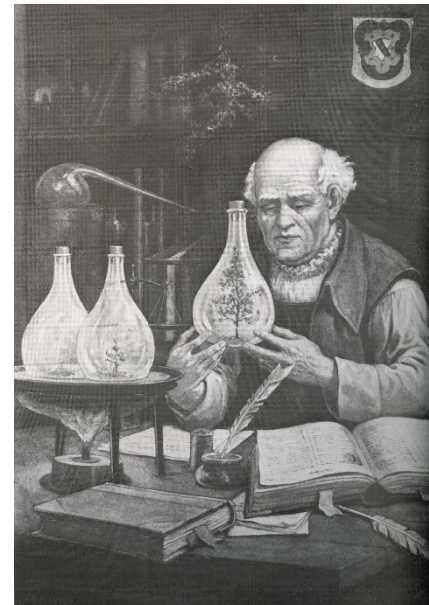
AA	Asiasäure
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
BA	Betulinsäure
BChE	Butyrylcholinesterase
CA	Carboanhydrase
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EMA	European Medicines Agency
et al.	und andere
FDA	U.S. Food and Drug Administration
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
MA	Maslinsäure
n.l.	nicht löslich
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triacetat
MRT	Magnetresonanztomographie
OA	Oleanolsäure
PA	Platansäure
PD-1	Programmed cell death protein 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMBCL	primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom
SI	Selektivitätsindex
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SRB	Sulforhodamin B
UA	Ursolsäure

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte der Naturheilkunde

Bereits in prähistorischen Zeiten bedienten sich die Menschen nicht nur auf der Suche nach Nahrung, Baumaterialien oder Kleidung, sondern auch nach Heilung in der Natur.<sup>[1]</sup> Die ersten medizinischen Anwendungen von Pflanzen beruhten dabei auf den Erfahrungen und Beobachtungen unserer Vorfahren.<sup>[2]</sup> Dieses Wissen wurde in Form von mündlichen oder schriftlichen Überlieferungen weitergegeben, was u.a. mesopotamische Keilschrifttexte mit ca. 15 pflanzlichen Rezepturen aus der Zeit um 3000 v.Chr. belegen.<sup>[3]</sup> Der erste schriftliche Beleg über die praktizierende Ärztin und Pflanzenheilkundlerin Merit Ptah aus Ägypten reicht bis in die Zeit um 2700 v.Chr. zurück.<sup>[2, 4]</sup> Etwa 700 Jahre später entstanden die ersten Überlieferungen der indischen Heilkunde (Ayur-Veda) gefolgt von den auf ca. 1600 v.Chr. datierten Funden aus ägyptischen Königsgräbern. Der Papyrus Ebers<sup>[5]</sup> zählt dabei zu den berühmtesten und mit 877 Rezepten auch zu den umfangreichsten schriftlichen Überlieferungen.<sup>[2]</sup> Als die wissenschaftlich anspruchsvollste schriftliche Arzneimittellehre des Altertums zählt das Werk „De Materia Medica“ des griechischen Arztes Pedanios Dioskurides (1. Jh n.Chr.). In dem fünfbändigen Buch sind u.a. Beschreibungen von ca. 800 arzneilichen Pflanzen enthalten.<sup>[6]</sup> Damit war der Grundstein für die Entwicklung der Pflanzenheilkunde gelegt, welche im Mittelalter ihre Blütezeit erreichen sollte.

Berühmte Persönlichkeiten, wie Hildegard von Bingen (1098-1179), deren Werke wie z.B. die „Physika der Heilpflanzen“ auch heute noch als Standardwerke der Pflanzenheilkunde gelten, trieben die Entwicklung signifikant voran. Dabei waren die Gründe für die Wirksamkeit verschiedener Heilpflanzen und Naturstoffe zunächst noch unbekannt und deren Verwendung basierte hauptsächlich auf empirischen Untersuchungen.<sup>[2]</sup> Einer der Ersten, der Heilpflanzen nicht nur medizinisch verwendete sondern sie auch chemisch aufbereitete, war der Arzt und Alchemist Paracelsus



**Abb. 1:** Arzt und Alchemist Paracelsus.<sup>[7]</sup>

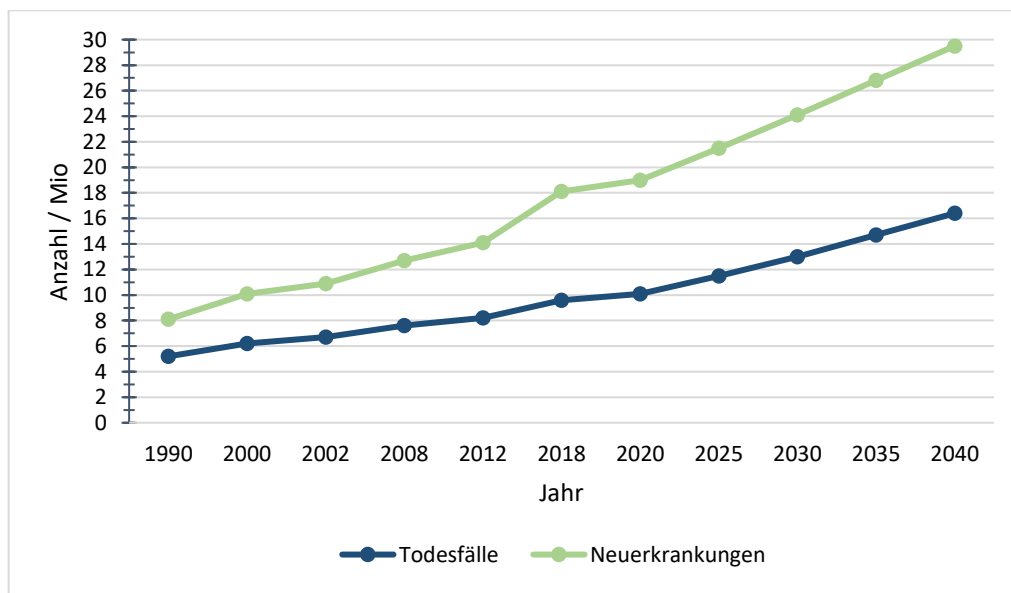
(1493/4-1541, Abb. 1<sup>[7]</sup>).<sup>[8]</sup> Mit seiner alchemistischen Arzneizubereitung (Spagyrik) wird er auch als Pionier chemisch hergestellter Arzneimittel angesehen. Er war auch der

Erste, der die Wirkung von Heilpflanzen auf deren Inhaltsstoffe zurückführte.<sup>[6]</sup> Damit waren die Grundsteine für pflanzliche Naturstoffe und davon abgeleitete Wirkstoffe gelegt. In der heutigen Forschung bilden Naturstoffe den Großteil der Inspirationsquellen für die Entwicklung neuer Arzneimittel und Wirkstoffe.<sup>[9]</sup> Die statistischen Untersuchungen nach NEWMAN und CRAGG<sup>[10]</sup> belegen diese Aussage ebenfalls. Etwa 50% aller im Zeitraum von 1981 bis 2014 neuzugelassenen Wirkstoffe sind demnach Naturstoffe bzw. naturstoffabgeleitete Derivate.

## 1.2 Die Krankheit Krebs

### 1.2.1 Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen

Trotz bahnbrechender medizinischer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten ist Krebs weiterhin eine der tödlichsten Krankheiten weltweit. Im Jahr 2018 sind von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) weltweit 9.6 Millionen Krebstote sowie insgesamt 18.1 Millionen Neuerkrankungen geschätzt worden.<sup>[11]</sup> Im Vergleich zur letzten Schätzung im Jahr 2012 entspricht das einer Steigerung der Mortalität um etwa 17% sowie in etwa 28% mehr Neuerkrankungen.<sup>[12]</sup> In Abb. 2 ist die Entwicklung dieser Schätzungen seit dem Jahr 1990 sowie die Prognosen für die kommenden Jahre graphisch dargestellt.



**Abb. 2:** Entwicklung der Anzahl krebsbedingter Todesfälle sowie Neuerkrankungen weltweit im Zeitraum von 1990–2018<sup>[11-15]</sup> sowie Prognosen bis 2040 nach IARC<sup>[16]</sup>.

Darin zu erkennen ist das stetige Ansteigen sowohl der Todesfälle als auch der Neuerkrankungen. Weiterhin zeigen die Prognosen, dass diese Zahlen bis zum Jahr 2040



auf 16.4 Millionen krebsbedingte Todesfälle und etwa 29.5 Millionen Neuerkrankungen ansteigen können. Dies verdeutlicht die Dringlichkeit weiterer Forschungen sowohl auf den Gebieten der Behandlung als auch der Diagnose von Krebs.

Deutschlandweit lagen die Schätzungen für die Anzahl an krebsbedingten Todesfällen sowie Neuerkrankungen im Jahr 2018 bei ca. 247462 bzw. 608742.<sup>[17]</sup> Dabei zählte Lungenkrebs mit einer Mortalität von 50560 (20%) zu den häufigsten Todesursachen. Die Krebsart mit den meisten Neuerkrankungen im Jahr 2018 in Deutschland ist Brustkrebs (71888, 11.8%) dicht gefolgt von Lungenkrebs (66749, 11%). Wie eine weitere Statistik des Statistischen Bundesamtes Destatis zeigt, war Krebs im Jahr 2016 wie auch schon in den Vorjahren neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache.<sup>[18]</sup>

## **1.2.2 Entstehung maligner Tumore**

Als Tumor wird in der Medizin eine abnorme Gewebeneubildung bezeichnet, die durch Defekte in der zellulären Wachstumskontrolle, der Ausdifferenzierung sowie Störungen des programmierten Zelltodes ausgelöst werden kann. Auf Grundlage der Wachstumseigenschaften eines Tumors erfolgt die Einteilung in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Formen. Benigne Tumore zeichnen sich durch ein langsames und verdrängendes Wachstum aus. Sie sind nicht zur Invasion umliegendes Gewebes befähigt und lassen sich häufig mittels therapeutischer Maßnahmen vollständig heilen.<sup>[19]</sup> Maligne Tumore hingegen sind durch ein schnelles, invasiv-destruierendes Wachstum geprägt. Sie besitzen zudem die Fähigkeit zur Metastasierung in benachbartes Gewebe.<sup>[19, 20]</sup> Die Entstehung maligner Tumore kann u.a. genetisch oder umweltbedingt sein oder durch chemische, biologische und physikalische Karzinogene verursacht werden, wobei alle Ursachen von Krebs auf eine Schädigung der Erbsubstanz bzw. Mutation von Zellen zurückgeführt werden können.<sup>[21, 22]</sup>

## **1.2.3 Behandlung von Krebserkrankungen**

### **1.2.3.1 Diagnostik malignen Gewebes**

Ebenso wichtig wie die Therapie von Tumoren ist deren Diagnostik sowie die exakte Lokalisierung des betroffenen Gewebes. Je früher ein Tumor diagnostiziert wird und je genauer die Krebszellen lokalisiert werden können, desto besser kann eine Behandlung

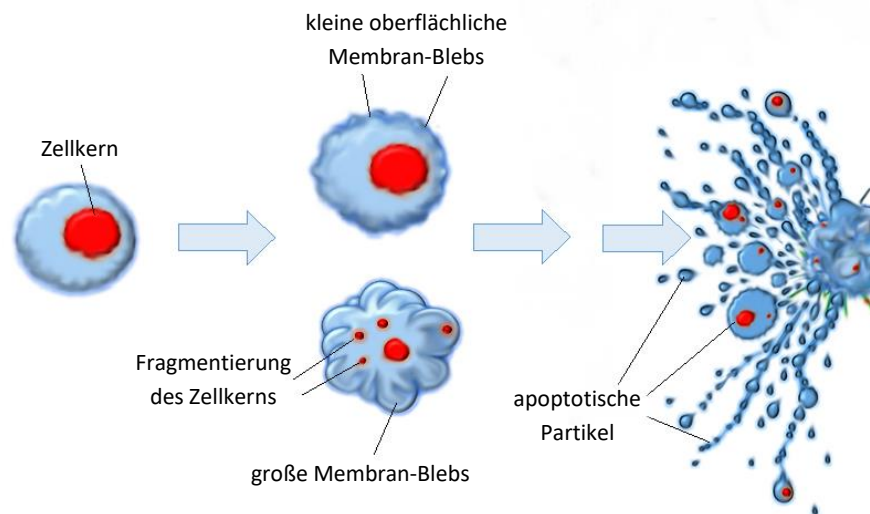
mittels geeigneter Therapieformen geplant und durchgeführt werden und desto höher sind die Chancen auf Heilung.<sup>[23]</sup> Zur Diagnose von Tumoren können neben der Anamnese mit klinischer Untersuchung, Laboranalysen oder Gewebeentnahmen eine Reihe bildgebender Verfahren angewendet werden. Durch die moderne Bildgebung lassen sich heutzutage viele wichtige Informationen zu Tumorart, -ausdehnung und -infiltration auf minimalinvasivem Weg gewinnen.<sup>[24]</sup> Zu den häufig angewandten Methoden zählen dabei die Magnetresonanztomographie (MRT), die Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), bei denen diverse Kontrastmittel oder Tracer zum Einsatz kommen.<sup>[25]</sup>

### 1.2.3.2 Mögliche Therapieansätze

Im Wesentlichen sind drei wichtige Methoden zur Therapie maligner Tumore in Anwendung. Neben den beiden lokal wirkenden Therapieformen der Strahlentherapie und der onkologischen Chirurgie, stellt die systemisch wirksame zytostatische Chemotherapie eine weitere wichtige Methode der Tumorbehandlung dar.<sup>[26]</sup> Daneben gibt es weitere klinisch relevante Therapieansätze wie z.B. die Hormontherapie oder die Immuntherapie (Kapitel 1.2.3.4) sowie einige derzeit untersuchte Methoden, wie z.B. Hyperthermie, Kryochirurgie oder Laserchirurgie.<sup>[27]</sup> Je nach Art des malignen Gewebes und Fortschrittsstadium des Tumors wird eine Methode bzw. geeignete Kombinationen zur Behandlung gewählt. Der medikamentöse Therapieansatz ist dabei in der Lage sowohl den Primärtumor als auch lymphogen oder hämatogen streuende Tumorzellen, also Metastasen zu bekämpfen.<sup>[28]</sup> Die zytostatische Chemotherapie ist durch eine Reihe an Zielpunkten gekennzeichnet. Viele Zytostatika wirken stärker auf schnell proliferierendes Gewebe (z.B. Tumore) als auf Zellen mit normalem Wachstum.<sup>[27]</sup> Daraus resultiert eine begrenzte Spezifität bezüglich bestimmter Tumorzellen.<sup>[26]</sup> Um ein Anwachsen des malignen Gewebes einzudämmen soll deren Proliferation weitestgehend gehemmt werden. Weiterhin sollen in den Tumorzellen zytotoxische Effekte wie der programmierte Zelltod (Apoptose) oder der Zelltod (Nekrose) ausgelöst und gleichzeitig deren Neubildung (Tumorangiogenese) oder Migration (Metastase) verhindert werden.<sup>[28]</sup>

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, welcher dazu dient, einzelne alte und defekte Zellen gezielt zu entfernen. Dabei laufen eine Reihe biochemischer Prozesse ab, die letztlich im Tod der Zellen enden. Im Gegensatz zur Nekrose werden

diese Abläufe nicht von Reaktionen des Immunsystems wie Entzündung oder Schwellung des Gewebes begleitet.<sup>[29]</sup> Eine apoptotische Zelle durchläuft dabei verschiedene morphologische Veränderungen. Dabei kommt es unter anderem zur Bildung von Ausbuchtungen bzw. Blasen (Blebs) an der Zellmembran, was auch als „Blebbing“ bezeichnet wird (Abb. 3).<sup>[30]</sup> Der Prozess der Apoptose wird zudem begleitet von einer Schrumpfung des Zellkerns, dessen Fragmentierung sowie dem Abbau von DNA und endet im Zerfall der Zelle in apoptotische Partikel.<sup>[31]</sup> Durch geeignete biologische Assays lassen sich diese Merkmale apoptotischer Zellen nachweisen bzw. beobachten.



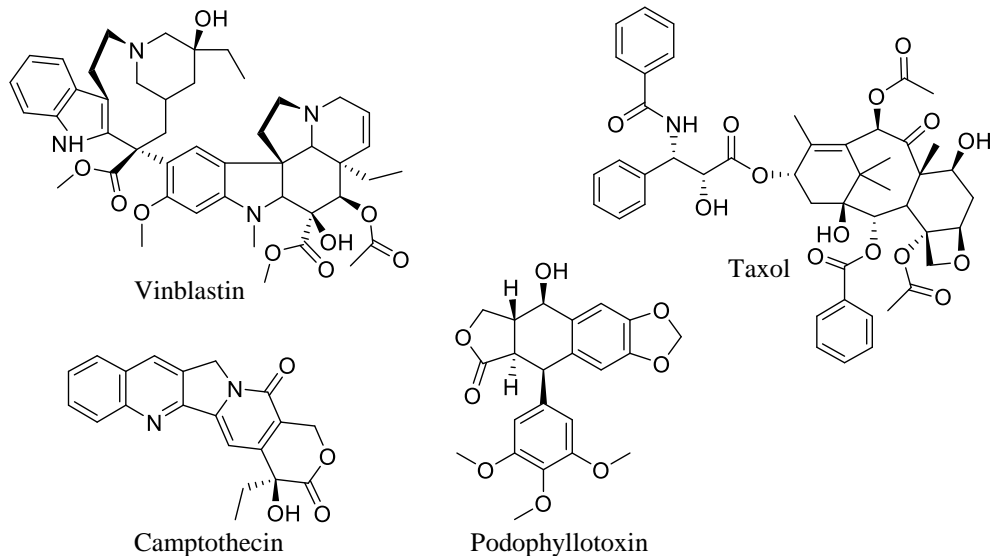
**Abb. 3:** Bildung von Ausbuchtungen der Zellmembran (Blebbing) sowie Fragmentierung des Zellkerns während der Apoptose und Zerfall der Zelle in apoptotische Partikel. Abbildung bearbeitet nach SMITH et al.<sup>[32]</sup>

Die Chemotherapie ist auch heute noch eine der bedeutendsten Methoden zur Behandlung malignen Gewebes und eine Vielzahl an Antitumorthapeutika findet bereits klinische Anwendung.<sup>[33]</sup> Ein Großteil der auf dem Markt erhältlichen antitumoralen Substanzen sind dabei Naturstoffe oder Naturstoffderivate.

### 1.2.3.3 Entwicklung naturstoffbasierter Chemotherapeutika

Die Verwendung von pflanzlichen Naturstoffen zur Entwicklung neuer Krebsmedikamente begann in den 1950er Jahren mit der Entdeckung der Vincaalkaloide wie z.B. Vinblastin sowie der Isolierung der Podophyllotoxine (Abb. 4). Daraufhin wurden im Rahmen eines im Jahr 1960 von dem United States National Cancer Institute (NCI) initiierten Forschungsprogrammes eine Reihe neuer Naturstoffe mit vielversprechenden cytotoxischen Eigenschaften entdeckt.<sup>[34]</sup> Dazu zählen u.a. die

Naturstoffe Paclitaxel<sup>[35]</sup> oder Camptothecin<sup>[36]</sup> (Abb. 4), welche von den Chemikern MONROE E. WALL und MANSUKH C. WANI erstmals isoliert und untersucht wurden und heute klinische Anwendung zur Behandlung von malignen Tumoren finden. Darauf aufbauend, ist ein Großteil der heute bekannten antitumoraktiven Wirkstoffe abgeleitet von natürlich vorkommenden Molekülen. Im Zeitraum von 1981 bis 2014 wurden 174 neue Krebsmedikamente zugelassen. Davon waren 85 Substanzen Naturstoffe bzw. davon abgeleitete Derivate.<sup>[10]</sup>

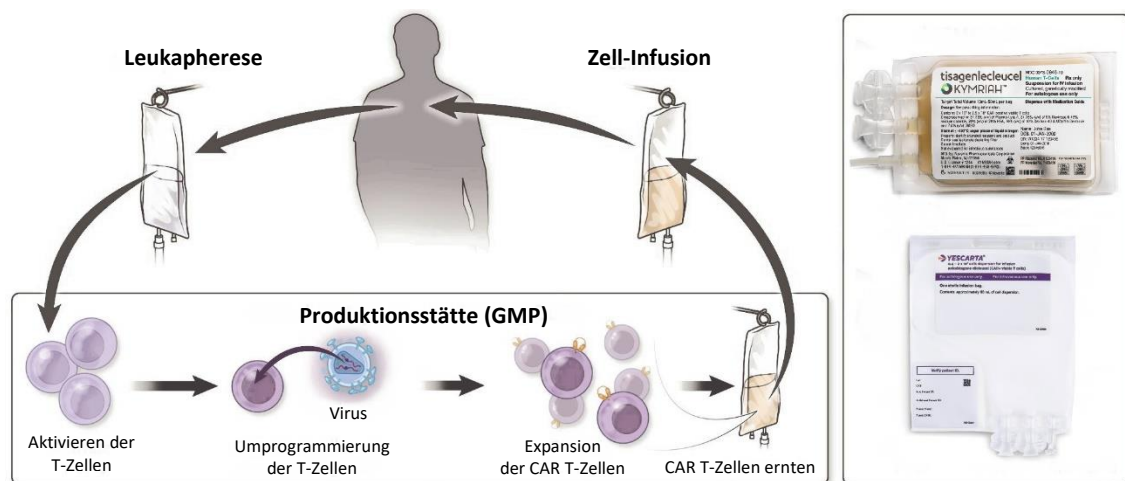


**Abb. 4:** Strukturformeln der naturstoffbasierten Chemotherapeutika Vinblastin, Taxol, Camptothecin und Podophyllotoxin.

#### 1.2.3.4 Aktuelle Fortschritte im Kampf gegen Krebs

In den vergangenen Jahren konnten in der Entwicklung neuer Therapieformen zur Behandlung von Krebs einige bahnbrechende Fortschritte erzielt werden. Im August 2017 wurden die beiden ersten adoptiven Immuntherapien, sogenannte CAR-T-Zell-Therapien von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen.<sup>[37]</sup> Etwa ein Jahr später erfolgte auch die europaweite Zulassung dieser Therapie durch die Europäischen Kommission.<sup>[38]</sup> Diese von der European Medicines Agency (EMA) als Gentherapien eingestuft Methoden beruhen auf der Modifizierung körpereigener Abwehrzellen. Dabei werden vom Patienten stammende T-Lymphozyten (T-Zellen) gentechnisch modifiziert und mit einem Chimären Antigen-Rezeptor (CAR) verknüpft, welcher in der Lage ist, spezielle Moleküle an der Oberfläche maligner Zellen zu erkennen und damit Tumore aufzuspüren. Diese modifizierten T-Zellen werden nach Vermehrung und anschließender Qualitätskontrolle dem Patienten injiziert (Abb. 5, links). Dort binden sie

an die entsprechenden Tumorzellen und lösen deren programmierten Tod aus.<sup>[37, 39]</sup> Der von Novartis entwickelte Wirkstoff Tisagenlecleucel (Abb. 5, rechts) ist unter dem Handelsnamen Kymriah® auf dem Markt und kann dabei zur Therapie von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) oder diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) eingesetzt werden. Das Immunonkologikum Yescarta® der Firma Kite Pharma (Abb. 5, rechts) enthält den Wirkstoff Axicabtagencicloreucel und dient ebenfalls zur Behandlung von Patienten mit DLBCL sowie primär mediastinalem großzelligem B-Zell-Lymphom (PMBCL).



**Abb. 5:** Ablauf der Chimären Antigen-Rezeptor T-Zelltherapie bearbeitet nach TRAN et al.<sup>[39]</sup> und Infusionslösungen der beiden CAR-T-Zell-Therapeutika Kymriah® (Tisagenlecleucel)<sup>[40]</sup> und Yescarta® (Axicabtagencicloreucel)<sup>[41]</sup>.

Das Konzept der Behandlung von Krebserkrankungen durch Aktivierung des Immunsystems des Patienten ist keine Erfindung der letzten Jahre. Aufbauend auf früheren Beobachtungen, bei denen ein Rückgang von Krebs nach einer Infektion festgestellt wurde, versuchte der New Yorker Chirurg WILLIAM COLE bereits 1891 durch Injektion von Bakterien in Tumore eine Immunreaktion auszulösen, die den Tumor angreifen würde.<sup>[42]</sup> Seitdem wurden viele therapeutische Ansätze verfolgt, um Tumore durch das körpereigene Immunsystem zu bekämpfen.<sup>[43]</sup> Zum ersten Mal berichtete 1955 die Forschungsgruppe um MITCHISON über ein spezifisches Targeting von Tumorzellen durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten in Mausmodellen.<sup>[44]</sup> Viele dieser Untersuchungen, wie spezielle Impfstoffe zur Anregung des Immunsystems, schlugen jedoch fehl oder führten zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Die Schwierigkeit dieser Methoden liegt in den tumoreigenen Defensivmechanismen gegen die zur Immunabwehr ausgesendeten T-Lymphozyten. Durch sie können sich Tumore vor den T-Zellen verbergen oder durch Expression bestimmter Enzyme sogar deren Wirkung inhibieren.

<sup>[42]</sup> Ein Durchbruch in der Immuntherapie gelang erst im Jahr 2011 mit Zulassung des Medikaments Yervoy (Ipilimumab) zu Behandlung von Melanomen.<sup>[45]</sup> Dieser Wirkstoff fungiert als Inhibitor des Checkpoint-Enzyms CTLA-4, welches normalerweise die Aktivierung der immungeigenen T-Zellen verhindert bzw. steuert. Anschließend können die T-Zellen das Tumorgewebe ungehindert angreifen und bekämpfen. Dadurch rückten neue Inhibitoren für diverse Checkpoint-Proteine, wie z.B. PD-1 in den Fokus weiterer Forschungen und trieben die Entwicklung neuer immunbasierter Therapieformen gegen Krebs voran.<sup>[42]</sup> Im Jahr 2018 wurden die beiden Wissenschaftler JAMES P. ALLISON und TASUKU HONJO für ihre bahnbrechenden Forschungen auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.<sup>[46]</sup>

### **1.3 Terpenoide Naturstoffe als Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe**

#### **1.3.1 Einführung – Grundlagen der Wirkstoffentwicklung**

Als Ausgangsstoffe für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dienen oftmals Substanzen, die bereits selbst pharmakologische Aktivität im Hinblick auf einen bestimmten therapeutischen Einsatz zeigen. Diese als Leitstrukturen bezeichneten Verbindungen werden durch gezielte chemische Modifizierungen derivatisiert, um deren inhärente pharmakologische Eigenschaften zu optimieren und dadurch den Einsatz als Therapeutika zu ermöglichen. Die Optimierungen beziehen sich dabei auf Wirkdauer, Selektivität sowie Wirkstärke bei gleichzeitiger Minimierung der Toxizität und der Nebenwirkungen.<sup>[6]</sup> Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt bilden Naturstoffe den Großteil der zur Entwicklung potentieller Wirkstoffe verwendeter Leitstrukturen.

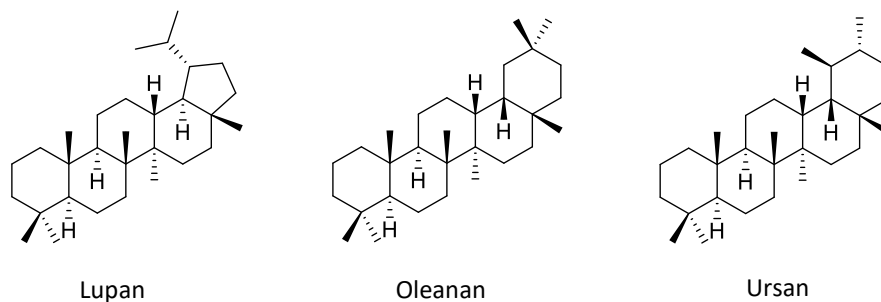
#### **1.3.2 Klassifizierung und Geschichte der Terpene**

Eine bedeutende Klasse von Naturstoffen, überwiegend pflanzlicher Herkunft, sind Terpene, welche sich aus Isopren Untereinheiten zusammensetzen.<sup>[47]</sup> Je nach Anzahl der Isopren-Einheiten bzw. Anzahl der Kohlenstoff Atome lässt sich eine Einteilung in Hemi- (C<sub>5</sub>), Mono- (C<sub>10</sub>), Sesqui- (C<sub>15</sub>), Di- (C<sub>20</sub>), Sester- (C<sub>25</sub>), Tri- (C<sub>30</sub>), Tetra- (C<sub>40</sub>) oder Polyterpene (>C<sub>40</sub>) vornehmen, wobei jede Gruppe wiederum in azyklische und zyklische Verbindungen unterteilt werden kann.<sup>[48]</sup>

Entscheidende Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Terpene leisteten die beiden Chemiker OTTO WALLACH und LEOPOLD RUŽIČKA.<sup>[49]</sup> Bereits im Jahr 1885 begann

WALLACH mit der Erforschung der Triterpene<sup>[50]</sup> und veröffentlichte in den folgenden Jahren zahlreiche wissenschaftliche Publikationen.<sup>[49]</sup> Anhand seiner Untersuchungen wurde das Isopren als Untereinheit der Terpene identifiziert, was die Grundlage der von RUŽIČKA veröffentlichten „Isopren-Regel“ bildete.<sup>[51]</sup> Für seine fundamentalen Beiträge auf dem Gebiet der Terpene wurde WALLACH im Jahr 1910 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. LEOPOLD RUŽIČKA trieb die Forschung an Triterpenen weiter voran und postulierte 1920 erstmals den strukturellen Zusammenhang zwischen Terpenen und Steroiden. 1930 gelang ihm zudem die Isolierung von Androsteron aus Urin, welches er neun Jahre später erfolgreich in Testosteron umwandeln konnte. Auch er wurde 1939 für seine Forschungen an Terpenen mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.<sup>[49]</sup> Die fundamentalen Forschungen von WALLACH und RUŽIČKA dienen als Grundlagen zahlreicher fortführender Forschungen an terpenoiden Strukturen. Neben der Strukturaufklärung gewannen auch zunehmend Untersuchungen bezüglich pharmakologischer Eigenschaften an Bedeutung.

Eine wichtige Gruppe der Terpene, die bereits großes Potenzial hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften zeigte, stellen die Triterpene, speziell pentazyklische Triterpene dar.<sup>[52]</sup> Etwa 4000 der bekannten Triterpene leiten sich dabei vom Squalan, bzw. dem strukturverwandten Squalen ab.<sup>[53]</sup> Wichtige Grundgerüste der pentazyklischen Triterpene sind z.B. Lupan, Oleanan und Ursan (Abb. 6).

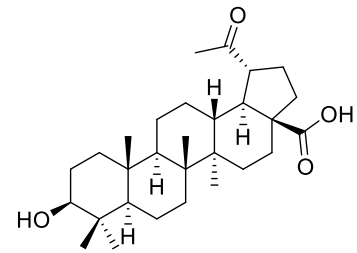


**Abb. 6:** Strukturformeln einiger wichtiger pentazyklischer Triterpen-Grundgerüste.

### 1.3.3 Platansäure

Platansäure ist ein bisher nur wenig untersuchtes pentazyklisches Triterpen, welches im Jahr 1963 durch die Forschungsgruppe um APLIN et al.<sup>[54]</sup> erstmals in der Rinde von *Platanus x hybrida* nachgewiesen wurde und auf dem Lupan-Grundgerüst basiert (Abb. 7). Nur wenige Quellen belegen die inhärenten pharmakologischen Eigenschaften der Platansäure. Im Jahr 1994 untersuchten FUJIOKA et al.<sup>[55]</sup> die Inhaltsstoffe der Blätter von

*Syzygium claviflorum*, wobei sie Betulinsäure und die strukturverwandte Platansäure isolieren konnten. Bei pharmakologischen Untersuchungen wurden bei beiden Triterpenen inhibitorische Eigenschaften bezüglich der Replikation des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) nachgewiesen. Weiterhin besitzt Platansäure bzw. abgeleitete Derivate die Fähigkeit zur Inhibierung der Enzyme Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE).<sup>[56]</sup> Seit der Postulierung der cholinergen Hypothese durch DAVIES und MALONEY<sup>[57]</sup>



**Abb. 7:** Strukturformel der Platansäure.

gewinnen Cholinesterase-Inhibitoren zunehmend an Bedeutung als Wirkstoffe zur symptomatischen Behandlung der Alzheimer Krankheit. Weiterhin konnten SOMMERWERK et al.<sup>[58]</sup> durch Modifikation von Platansäure und anderen Triterpenen am A-Ring des Grundgerüsts eine Inhibierung der Carboanhydrase II beobachten. Ähnliche Carboanhydrasen, wie CA IX bzw. deren Überexprimierung wird in der Literatur häufig in Zusammenhang mit der Entwicklung tumorösen Gewebes gebracht.<sup>[59-62]</sup> Weiterhin gibt es eine Reihe an Publikationen, welche die zytotoxischen Eigenschaften von Platansäure-Derivaten untersuchen.<sup>[63-67]</sup>

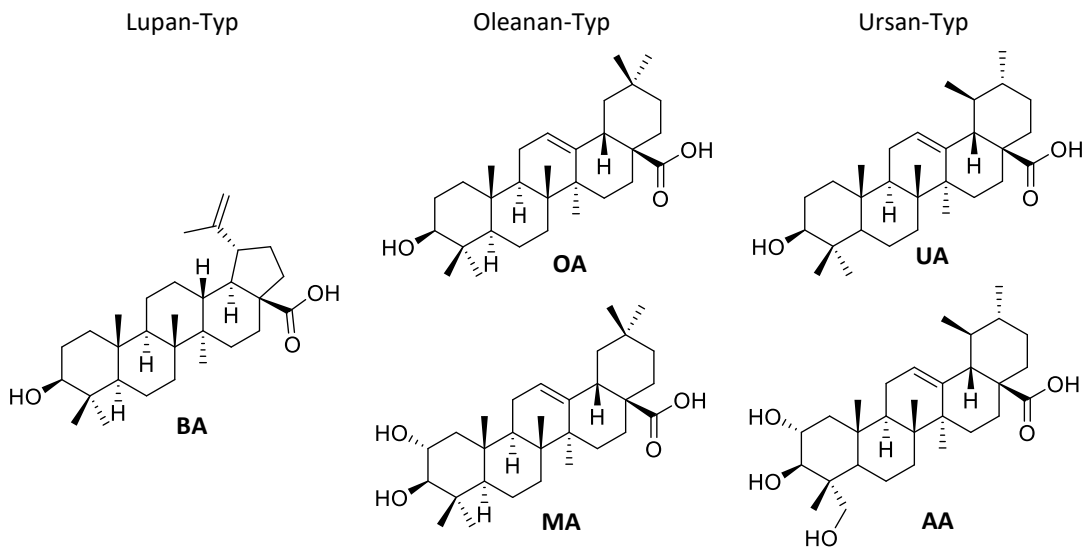
### 1.3.4 Weitere Triterpenoide Carbonsäuren

Zahlreiche Vertreter aus der Klasse der pentazyklischen Triterpene waren bereits Inhalte umfassender Forschungen u.a. hinsichtlich ihrer biologischen Aktivitäten. Weit vorangeschritten ist dabei die Erforschung der auf dem Lupan-Grundgerüst basierenden Betulinsäure (Abb. 8). In der Literatur finden sich zahlreiche Belege für zytotoxische sowie apoptose-induzierende Eigenschaften.<sup>[68-70]</sup> Einige Forschungen konzentrierten sich dabei auf die Untersuchung des Wirkmechanismus<sup>[71-73]</sup>, wobei bisher noch keine vollständige Aufklärung erreicht werden konnte.<sup>[70]</sup>

Weitere wichtige pentazyklische Triterpene abgeleitet vom Ursan oder Oleanan Grundgerüst sind z.B. Ursol- sowie Oleanol- und Maslinsäure (Abb. 8). Diese Naturstoffe sowie deren Derivate sind bereits vielfach hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht worden, wobei zahlreiche interessante pharmakologische Eigenschaften, wie z.B. antioxidative, antivirale oder antitumorale Effekte beobachtet werden konnten.<sup>[74-81]</sup> Auch für Maslin-, Oleanol- oder Ursolsäure wurden analog zur Betulinsäure apoptose-induzierende Eigenschaften gegenüber verschiedenen Tumorzellen festgestellt.<sup>[82, 83]</sup>



Ein bisher weniger untersuchtes pentazyklisches Triterpen ist die Asiasäure (Abb. 8), welche z.B. in *Centella asiatica* (Indischer Wassernabel) enthalten ist.<sup>[84]</sup> Bisher wurde Asiasäure in mehr als 50 verschiedenen Pflanzen als ein wichtiger bioaktiver Bestandteil nachgewiesen. In der Literatur werden verschiedene Ansätze zur Isolierung bzw. Extraktion der Asiasäure aus dem entsprechenden Pflanzenmaterial beschrieben, wobei Extraktionsmethoden unter Verwendung von superkritischen Fluiden als mögliche Alternativen zur herkömmlichen flüssigen Lösungsmittelextraktion zunehmend an Bedeutung gewinnen.<sup>[85-87]</sup> Asiasäure bietet eine Vielzahl an inhärenten pharmakologischen Eigenschaften. Neben antioxidativen, anti-inflammatorischen, hepato-, cardio-, neuro- oder gastroprotektiven sowie antitumor Aktivitäten zeigte sich zudem die Fähigkeit zur Modulation diverser Enzyme, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder apoptotischer Proteine.<sup>[85, 88-90]</sup>



**Abb. 8:** Strukturformeln verschiedener pentazyklischer Triterpene unter Angabe des zugrundeliegenden Gerüsts (BA = Betulinsäure, OA = Oleanolsäure, UA = Ursolsäure, MA = Maslinsäure, AA = Asiasäure).

## 2 Zielstellung

Triterpene gelten aufgrund ihrer umfangreichen inhärenten pharmakologischen Eigenschaften weiterhin als wichtige Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe, wobei die Erforschung der verschiedenen pentazyklischen Triterpene unterschiedlich stark vorangeschritten ist. Die pharmakologischen Aktivitäten einiger Vertreter, wie Betulin-, Ursol oder Oleanolsäure sind bereits umfassend untersucht und durch eine Vielzahl an Quellen belegt worden. Andere Triterpene, wie Platan- oder Asiasäure hingegen sind in der Literatur bisher deutlich weniger vertreten.

Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit, u.a. bisher weniger intensiv erforschte Triterpene umfassender untersucht werden. Hauptziel bildet dabei die Identifizierung geeigneter struktureller Modifizierungen zur Verbesserung der zytotoxischen Eigenschaften. Am Beispiel der Platansäure sollen dabei Struktur-Aktivitäts-Beziehungen übertragen bzw. evaluiert werden, die auf früheren Erkenntnissen der Erforschung anderer Triterpen-Grundgerüste basieren. Dabei sollen hauptsächlich Amino-Substituenten eine entscheidende Rolle spielen. Neben der Verbesserung der biologischen bzw. zytotoxischen Aktivität *in vitro* soll auch die Optimierung des Selektivitätsverhaltens Ziel der Derivatisierungen sein. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Selektivität zwischen malignen und nicht-malignen Zellen sollen auch am Beispiel der Asiasäure durchgeführt werden. Auch hier gilt es, die Übertragbarkeit der Ergebnisse früherer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu prüfen.

Untersuchung an weiteren pentazyklischen Triterpenen, wie Oleanol-, Ursol-, Maslin- und Betulinsäure sollen weitestgehend auf der Synthese von Aminocarboxamiden basieren und ebenfalls eine Verbesserung der zytotoxischen Aktivität zum Ziel haben. Hierbei soll weiterhin der Einfluss verschiedener Substituenten sowohl an der Amid-Einheit als auch am Grundgerüst auf die zytotoxischen Eigenschaften betrachtet werden. Einige der hergestellten Carboxamide sollen zudem mit dem in der medizinischen Diagnostik angewandten DOTA verknüpft werden. Ziel dieser Verknüpfung soll die Erhaltung bzw. Verbesserung zytotoxischer Eigenschaften unter möglicher Erweiterung des Anwendungsgebietes auf die Diagnostik von Tumorgewebe sein.

### 3 Diskussion und Einordnung der Forschungsergebnisse

#### 3.1 Derivatisierung von Platansäure

##### 3.1.1 Amino Substituierte Platansäure-Derivate

Ausgehend von der Platansäure wurden eine Reihe an Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht. Dabei stand die Einführung von diversen Stickstoff-Substituenten im Fokus der Untersuchungen. Dazu zählten neben Oximen, Isocyanaten oder Carbonsäureamiden hauptsächlich Aminogruppen. Grundlage dieser Modifikation waren Forschungen, welche verbesserte zytotoxische Eigenschaften nach Anbringen einer Aminogruppe am A-Ring diverser Triterpencarbonsäuren feststellen konnten.<sup>[91-94]</sup> Anhand der Platansäure wurde zunächst versucht diese Beobachtungen zu reproduzieren. Weiterhin wurde in SRB-Assays untersucht, welchen Einfluss die Position des Amino-Substituenten am Grundgerüst auf die Antitumoraktivität haben kann. Platansäure bildet einen idealen Ausgangspunkt für diese Untersuchung, da sie drei strukturelle Ansatzpunkte für die Einführung von Aminogruppen aufweist (Abb. 9).

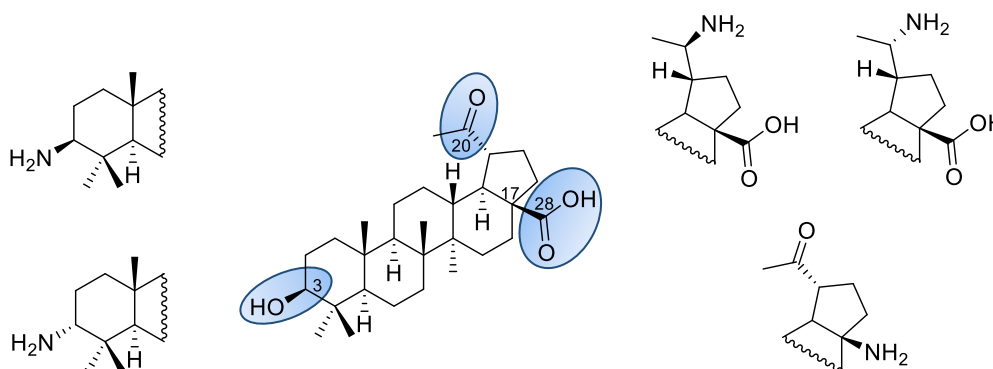
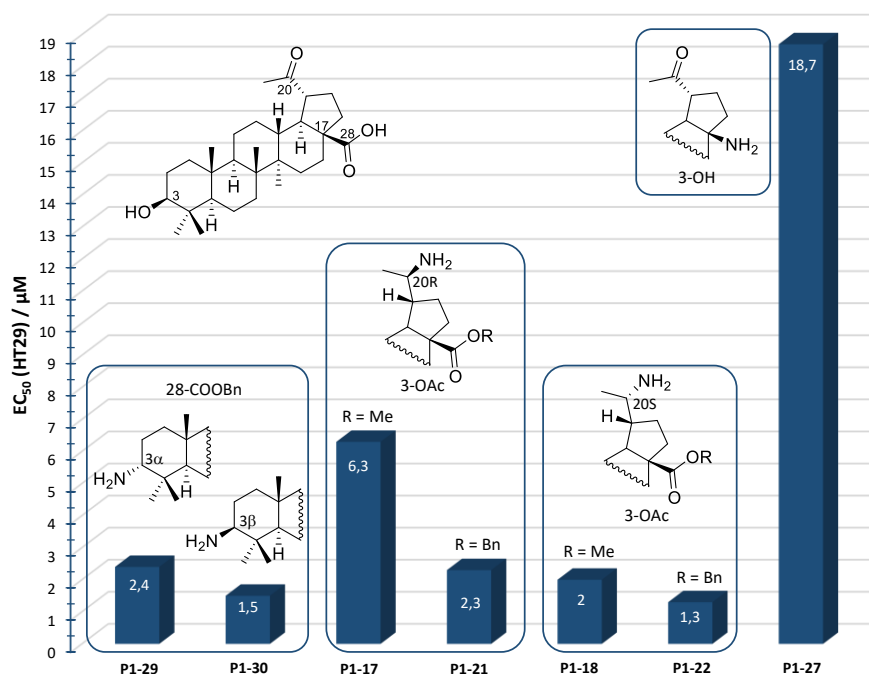


Abb. 9: Mögliche Ansatzpunkte zur Einführung von Amino-Substituenten am Beispiel der Platansäure.

Neben der in der Literatur bereits untersuchten Position C-3 am A-Ring eignen sich dafür ebenfalls die Positionen C-20 sowie C-17 bzw. C-28 am E-Ring des Grundgerüsts. Die Untersuchungen dahingehend konnten die Beobachtungen der Literatur bestätigen. Für 3-Amino-substituierte Platansäure-Derivate (**P1-29** und **P1-30**) wurden niedrige  $EC_{50}$  Werte im Bereich zwischen 1.5 und 3.6  $\mu\text{M}$  festgestellt. Das  $3\beta$ -Derivat **P1-30** zeigte dabei eine deutlich höhere zytotoxische Aktivität als das analoge  $3\alpha$ -Derivat **P1-29** (Abb. 10). Durch Einführung der Amino-Funktion an Position 20 des Grundgerüsts konnte die Zytotoxizität bis zu Spitzenwerten von  $EC_{50} = 1.3 \mu\text{M}$  weiter gesteigert werden. Dabei zeigten Substituenten an C-28 zusätzlichen Einfluss auf die zytotoxischen Eigenschaften. 20-Amino substituierte Platansäure-Derivate mit einer Benzylester-Funktion an Position

28 (**P1-21** und **P1-22**) zeigten deutlich bessere Zytotoxizitäten als entsprechende Methylester-Derivate (**P1-17** und **P1-18**). Weiterhin scheint auch an Position C-20 die Konfiguration des Stereozentrums einen entscheidenden Einfluss auf die Zytotoxizität zu haben. Die 20*R* konfigurierten Derivate (**P1-17** und **P1-21**) zeigen signifikant höhere  $EC_{50}$ -Werte als die entsprechenden 20*S* konfigurierten Verbindungen (**P1-18** und **P1-22**). Das durch Curtius-Abbau der C-28 Carbonylgruppe hergestellte 17-Amino-Derivat **P1-27** wurde als inaktiv eingestuft, da in den SRB-Assays  $EC_{50}$ -Werte größer als 30  $\mu$ M für die meisten der getesteten Tumorzelllinien festgestellt wurden. In Abb. 10 sind die Ergebnisse der Amino-substituierten Platansäure-Derivate am Beispiel der HT-29 Tumorzelllinie vergleichend dargestellt.



**Abb. 10:**  $EC_{50}$ -Werte der Amino-substituierten Platansäure-Derivate und Einfluss der Position des Amino-Substituenten auf die Zytotoxizität gegenüber HT29 Tumorzellen.

Weiterhin zeigten vom Ethylendiamin abgeleitete Amide der Platansäure vielversprechende Ergebnisse in den biologischen Untersuchungen ( $EC_{50} = 1.4\text{--}5.1 \mu$ M) und bestätigten damit einen weiteren in der Literatur<sup>[95]</sup> beobachteten Trend, der zugleich auch Grundlage für weitere Untersuchungen sein sollte (vgl. Kapitel 3.2.2). Zusätzlich wurden pro-apoptotische Screenings durchgeführt, um den Wirkmechanismus der aktiven Substanzen **P1-17** und **P1-38** zu untersuchen. Dabei konnten bei der Behandlung von A2780 Tumorzellen mit Verbindung **P1-17** Anzeichen für eine apoptotische Wirkung festgestellt werden (vgl. Kapitel 1.2.3.2).

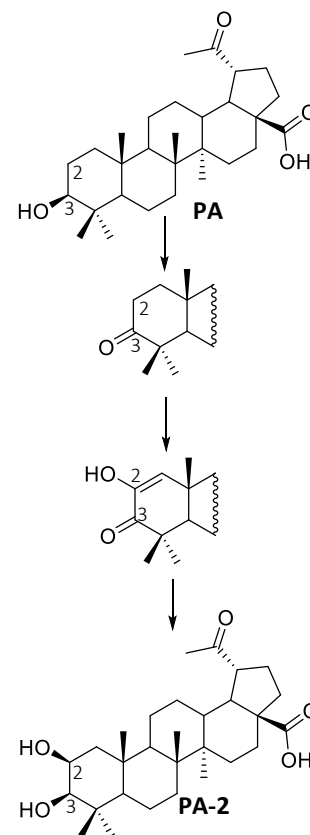
Detaillierte Synthesevorschriften, ausführliche Beschreibungen zur Vorgehensweise bei allen biologischen Untersuchungen sowie Übersichten aller  $EC_{50}$ -Werte und Ergebnisse sind in der Publikation P1 „*Platanic acid: A new scaffold for the synthesis of cytotoxic agents*” zusammengefasst.

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der zytotoxischen Eigenschaften einer Verbindung stellt deren Selektivität zwischen malignen und nicht-malignen Zellen dar. Diese Eigenschaft wird durch den Selektivitätsindex (SI) beschrieben, welcher sich wie folgt berechnen lässt:  $SI = EC_{50}(\text{maligne Zellen})/EC_{50}(\text{nicht-maligne Zellen})$ .

Viele der aktiven Platansäure-Derivate zeigen zwar niedrige  $EC_{50}$ -Werte gegenüber diversen Tumorzellen, allerdings wirken sie auch auf nicht-maligne Zellen zytotoxisch, d.h. sie sind wenig selektiv. Daher sind weitere Forschungen im Hinblick auf eine Verbesserung der Selektivität notwendig.

### 3.1.2 Weiterführende Untersuchungen zur Selektivität

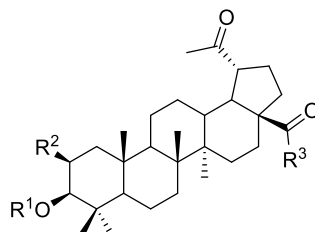
Zusätzlich zu den bereits veröffentlichten Untersuchungen zur Platansäure wurde weiterhin versucht, die Selektivität zytotoxischer Platansäure-Derivate zu verbessern. SOMMERWERK et al.<sup>[96]</sup> konnten im Jahr 2016 nachweisen, dass Augustussäure-Derivate deutlich bessere Selektivitäten zwischen malignen und nicht-malignen Zellen zeigen als analoge Derivate der Oleanolsäure. Beide Triterpene sind strukturell sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich im Substitutionsmuster des A-Ringes. Augustussäure besitzt zwei Hydroxygruppen an den Positionen 2 und 3 während Oleanolsäure lediglich eine OH-Gruppe an Position 3 aufweist. Demnach scheint die zweite Hydroxyl-Funktion einen entscheidenden Beitrag zur selektiven Wirkung der Substanzen beizutragen. Um die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf die Platansäure zu untersuchen, sollte eine zweite OH-Gruppe am A-Ring eingefügt werden. Die Synthese erfolgte analog zur Literatur<sup>[97]</sup> und ist in Abb. 11 dargestellt. Weitere Forschungen von SIEWERT et al.<sup>[98]</sup> untersuchten die der



**Abb. 11:** Syntheschema zur Darstellung des Augustussäure-Analogons der Platansäure.

Ausgustussäure strukturell sehr ähnliche Maslinsäure. Dabei konnte das entsprechende Benzylamid (EM2) als aktive und gleichzeitig auch selektive antitumoraktive Substanz identifiziert werden. Demzufolge wurden entsprechende Benzylamide der Platansäure und von Verbindung **PA-2** hergestellt und hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt. Dabei lassen sich ähnliche Trends wie in der Literatur beobachten. Das Anbringen einer weiteren OH-Gruppe allein (wie in **PA-2**) beeinflusst die antitumoraktiven Eigenschaften noch nicht ( $EC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ). Erst nach Acetylierung und anschließender Umsetzung zum Benzylamid oder Benzylester kommt es zu einer Verringerung der cytotoxischen Aktivität. Die  $EC_{50}$ -Werte liegen unterhalb von  $10 \mu\text{M}$ , wobei die besten Werte von  $2.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$  (**PA-5**) bzw.  $3.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$  (**PA-7**) gegenüber Ovarialkarzinom Zellen (A2780) erreicht wurden. Gleichzeitig kann eine enorme Steigerung der Selektivität beobachtet werden, da die genannten Verbindungen nicht toxisch gegenüber nicht-malignen Mausfibroblasten sind ( $EC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ).

**Tab. 1:** Ergebnisse der SRB-Assays zur Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften der Platansäure-Derivate **PA** bis **PA-7**.  $EC_{50}$ -Werte sind in  $\mu\text{M}$  angegeben. \* bisher unveröffentlichte Ergebnisse; experimentelle Daten enthalten in der Bachelorarbeit von Hr. N. Heise; n.l. nicht löslich in den mit dem SRB-Assay kompatiblen Lösungsmitteln.



Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	A2780	HT29	MCF-7	NIH 3T3
<b>PA</b> <sup>[99]</sup>	H	H	H	>30	>30	>30	>30
<b>PA-1</b> <sup>[99]</sup>	Ac	H	H	>30	>30	>30	>30
<b>PA-2</b> <sup>[97]</sup>	H	OH	H	>30	>30	>30	>30
<b>PA-3</b> *	Ac	OAc	H	>30	>30	>30	9.6 ± 3.5
<b>PA-4</b> *	Ac	H		n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
<b>PA-5</b> *	Ac	OAc		2.4 ± 1.6	7.2 ± 4.3	5.2 ± 2.1	>30
<b>PA-6</b> <sup>[99]</sup>	Ac	H		>30	>30	>30	>30
<b>PA-7</b> *	Ac	OAc		3.7 ± 1.4	7.4 ± 2.1	8.4 ± 1.9	>30

## 3.2 Derivate weiterer triterpenoider Leitstrukturen

### 3.2.1 Selektivitätsuntersuchungen am Beispiel der Asiasäure

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 diskutiert, scheint das Substitutionsmuster am A-Ring des triterpenoiden Grundgerüsts einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität zytotoxischer Derivate zu haben. Es wurde sowohl in der Literatur<sup>[96, 98, 100]</sup> als auch durch die weiterführenden Untersuchungen der Platansäure analog zu Kapitel 3.1.2 gezeigt, dass das Vorhandensein einer zweiten Hydroxyl-Funktion am A-Ring des Triterpengerüsts positive Effekte auf die cytotoxischen Eigenschaften sowie auch auf deren Selektivität zur Folge hat. Dieser Fakt legt die Vermutung nahe, dass das Anbringen einer weiteren Hydroxygruppe diese Effekte weiter verstärken kann und bildete u.a. die Grundlage für die Publikation P2 „Transformation of asiatic acid into a mitocanic, bimodal-acting rhodamine B conjugate of nanomolar cytotoxicity“. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde Asiasäure, ein natürlich vorkommendes Triterpen mit drei OH-Gruppen am A-

Ring, als Leitstruktur gewählt. Um Vergleiche hinsichtlich Zytotoxizität und Selektivität mit dem literaturbekannten Maslinsäure Derivat **EM2**<sup>[98]</sup> vornehmen zu können wurde das Benzylamid der Asiasäure (**P2-2**) hergestellt. Die Ergebnisse der biologischen Evaluierung der SRB-Assays zeigen eine signifikante Verbesserung der zytotoxischen Eigenschaften mit einhergehender Selektivität zu malignen Zellen. Im Vergleich zu dem Benzylamid der Maslinsäure (**EM2**) zeigt sich jedoch eine deutlich niedrigere Selektivität (Abb. 12). Weiterhin wurden, aufbauend auf den Ergebnissen kürzlicher Untersuchungen zu Rhodamin B-Konjugaten diverser Triterpene, weitere Untersuchungen durchgeführt. SOMMERWERK et al.<sup>[65]</sup> konnten EC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich und für das von der Maslinsäure abgeleitete Konjugat auch eine gesteigerte Selektivität feststellen. Um eine

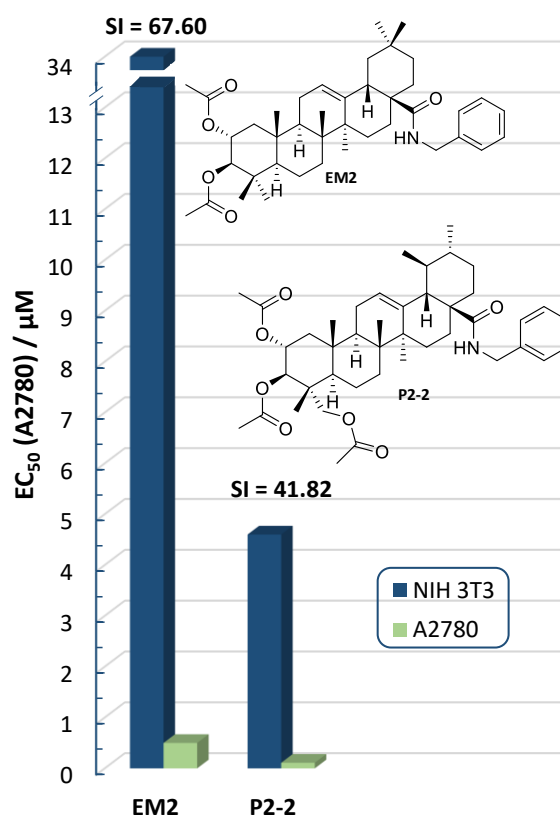
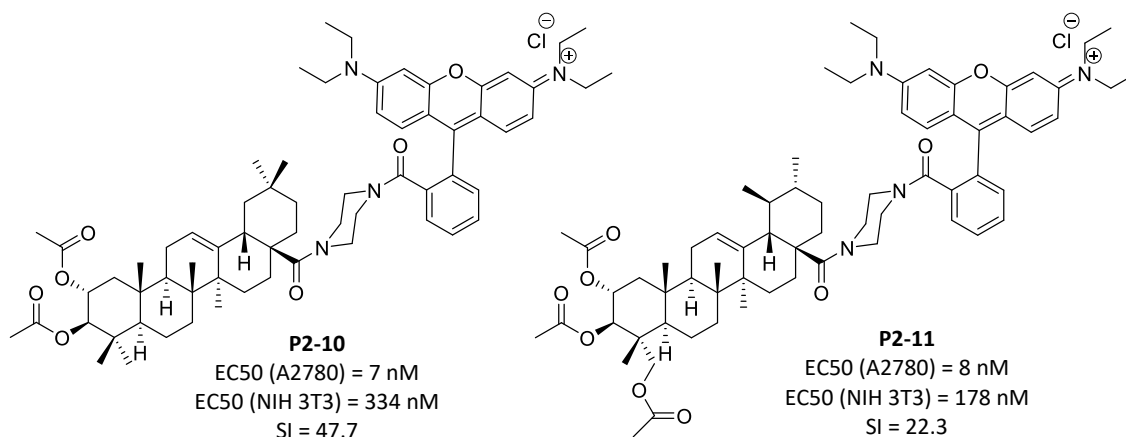


Abb. 12: Vergleich der Aktivität und Selektivität der Verbindungen **EM2** und **P2-2** bezüglich Ovarialkarzinom Zellen (A2780) und nicht-malignen Mausfibroblasten (NIH 3T3).

mögliche Steigerung dieser Eigenschaften zu erzielen, wurde ein vergleichbares Rhodamin B Konjugat der Asiasäure (Abb. 13, **P2-11**) synthetisiert und hinsichtlich seiner zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Dieses Derivat zeigte ebenfalls EC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich wie das analoge Maslinsäure-Derivat (Abb. 13, **P2-10**), allerdings verringerte sich die Selektivität in etwa um den Faktor 2.



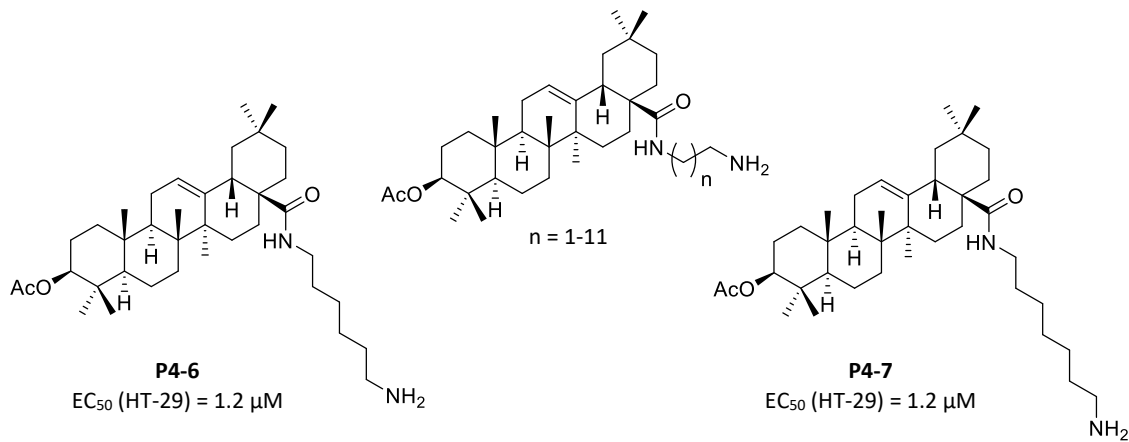
**Abb. 13:** Strukturformeln zweier Rhodamin B-Konjugate abgeleitet von Maslinsäure (**P2-10**) und Asiasäure (**P2-11**) und Vergleich der zytotoxischen Eigenschaften bezüglich ausgewählter Zelllinien.

### 3.2.2 Ethylendiamin-abgeleitete Amide von Triterpencarbonsäuren

Wie bereits in Kapitel 3.1.1 erwähnt, wurden von HELLER et al.<sup>[95]</sup> die zytotoxischen Eigenschaften von Ethylendiamin-abgeleiteten Carboxamiden der Oleanolsäure nachgewiesen. Durch entsprechende Derivatisierungen an der Platansäure konnten diese Ergebnisse auf ein weiteres triterpenoides Grundgerüst übertragen werden. Ausgehend davon wurden analoge Derivate von diversen pentazyklischen Triterpenen synthetisiert und gescreent, um sowohl den Einfluss des Grundgerüsts, als auch von terminalen Substituenten oder der Alkylkettenlänge der Oligomethylendiamin-Einheit zu untersuchen. Als Ausgangsstoffe dienten hierbei Ursol-, Betulin-, Oleanol- und Maslinsäure. Die daraus resultierenden Ergebnisse sowie experimentelle Daten sind in den beiden Publikationen P3 „*Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents*“ und P4 „*The cytotoxicity of oleanane derived aminocarboxamides depends on their aminoalkyl substituents*“ veröffentlicht worden. Die Synthese erfolgte dabei über eine Amidierung durch *in situ* Erzeugung der triterpenoiden Carbonsäurechloride mittels Oxalylchlorid und anschließender Umsetzung mit den entsprechenden Oligomethylendiaminen. Am Beispiel der Oleanolsäure konnte dabei eine begrenzte Steigerung der Zytotoxizität mit Verlängerung der Alkylkette bis

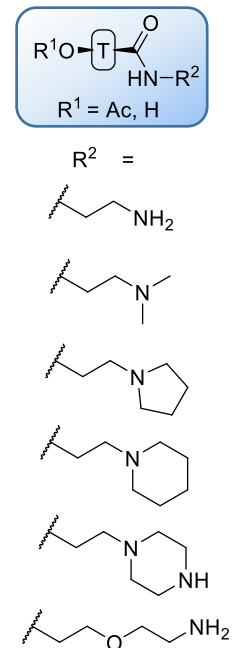


$n = 5$  (**P4-6**) bzw.  $n = 6$  (**P4-7**) beobachtet werden (Abb. 14). Beide Verbindungen zeigten einen  $EC_{50}$ -Wert von ca.  $1.2 \mu\text{M}$  bezüglich kolorektaler Karzinome (HT-29). Eine weitere Steigerung der Kettenlänge hatte jedoch eine Verringerung der Zytotoxizität zur Folge.



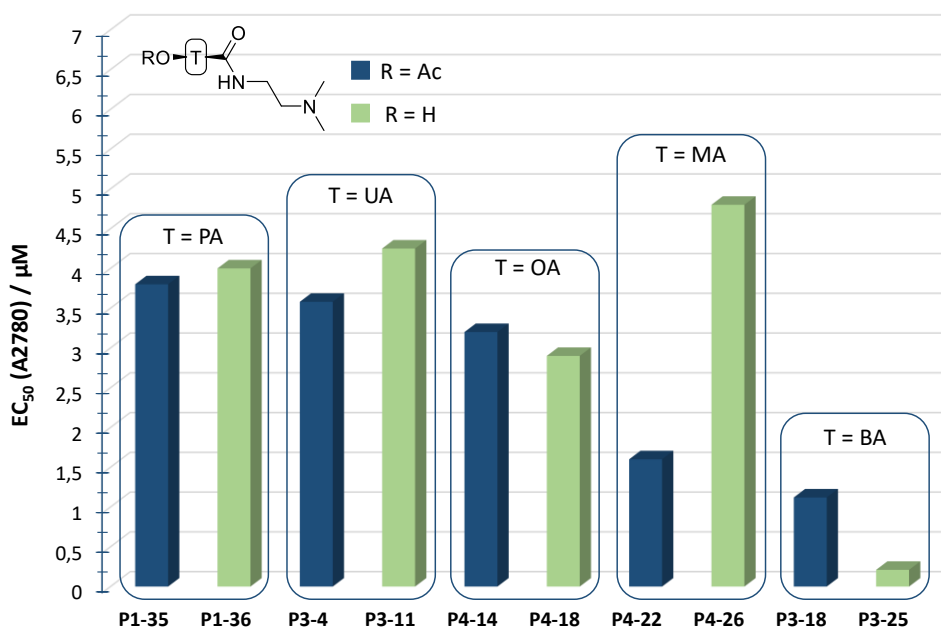
**Abb. 14** Allgemeine Strukturformel oligomethylenediamin-abgeleiteter Amide der Oleanolsäure sowie der Verbindungen **P4-6** und **P4-7**.

Wie bereits erwähnt, wurde auch der Einfluss der terminalen Substituenten an der Ethylendiamin-Einheit auf die Zytotoxizität untersucht. Eine Übersicht der strukturellen Variationen ist in Abb. 15 dargestellt. Bei zytotoxischer Untersuchung der synthetisierten Derivate mittels SRB-Assays konnte allerdings kein signifikanter Einfluss des terminalen Substituenten auf die  $EC_{50}$ -Werte festgestellt werden. Vergleicht man jedoch die ethylendiamin-abgeleiteten Amide der verschiedenen Triterpene untereinander, so lassen sich einige interessante Trends beobachten. Die mit Abstand aktivsten Derivate sind die von der Betulinsäure abgeleiteten Amide. Ein Großteil dieser Verbindungen zeigte  $EC_{50}$ -Werte unterhalb von  $1 \mu\text{M}$ , wobei Spitzenwerte von bis zu  $0.2 \mu\text{M}$  erreicht wurden. **P3-25** ist eine der aktivsten Verbindungen und zeigte einen  $EC_{50}$ -Wert von  $0.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$  gegenüber Ovarialkarzinom-Zellen (A2780). Die entsprechenden Amide der Oleanol- und Ursolsäure zeigen ebenfalls gute zytotoxische Eigenschaften. Deren  $EC_{50}$ -Werte unterschreiten einen Minimalwert von ca.  $1.5 \mu\text{M}$  nicht und sind damit im Vergleich zu analogen Betulinsäure-Derivaten deutlich höher. Vergleicht man ausgewählte Amide der verschiedenen acetylierten Triterpene und deren  $EC_{50}$ -Werte bezüglich Ovarialkarzinom-Zellen (A2780) kann man folgende



**Abb. 15:** Übersicht der terminal substituierten Carbonsäureamide der verschiedenen Triterpene.

Reihenfolge der Grundgerüste feststellen: Platansäure > Ursolsäure > Oleanolsäure > Maslinsäure > Betulinsäure (Abb. 16, dunkelblaue Balken). Weiterhin lassen sich in Abb. 16 auch Unterschiede zwischen acetylierten und nichtacetylierten Derivaten erkennen. Je nach Grundgerüst üben die Acetylgruppen unterschiedlich starken Einfluss auf die zytotoxischen Eigenschaften aus. Im Fall der Platan- (**P1-35**, **P1-36**) oder Oleanolsäure-Amide (**P4-14**, **P4-18**) ist diese Beeinflussung vernachlässigbar klein. Bei den analogen Ursolsäure-Derivaten (**P3-4**, **P3-11**) ist eine geringe Steigerung der  $EC_{50}$ -Werte nach Entfernen der Acetylgruppe beobachtbar. Dieser Effekt ist bei den entsprechenden Derivaten der Maslinsäure (**P4-22**, **P4-26**) deutlich stärker ausgeprägt. Hier resultiert die Abspaltung beider Acetylgruppen in einer Verringerung der zytotoxischen Aktivität um den Faktor 3. Die analogen Betulinsäure-Derivate zeigen genau den entgegengesetzten Trend. Hier ist eine deutliche Verbesserung der zytotoxischen Eigenschaften nach Abspaltung der Acetylgruppe beobachtet worden. Das deacetylierte Derivat **P3-25** ( $EC_{50} = 0.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , A2780) zeigt einen in etwa um den Faktor 5.5 verringerten  $EC_{50}$ -Wert im Vergleich zu seinem acetylierten Analogon **P3-18** ( $EC_{50} = 1.1 \pm 0.05 \mu\text{M}$ , A2780).



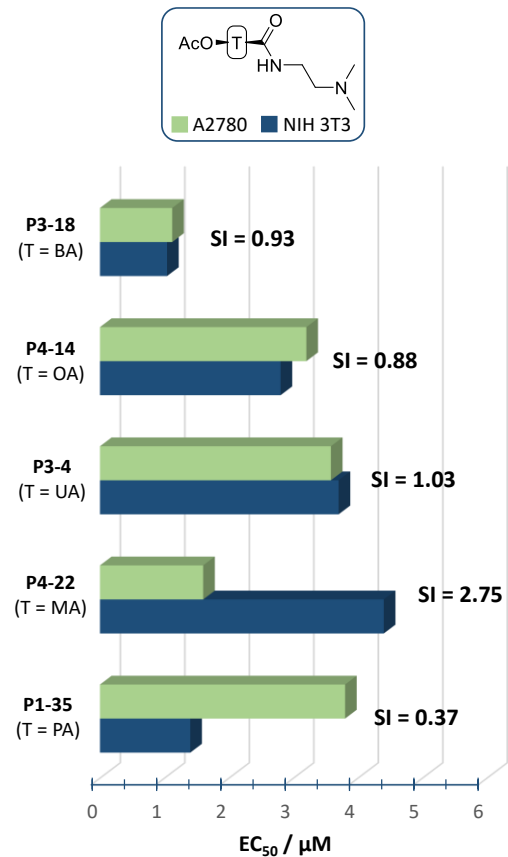
**Abb. 16:** Zytotoxizitäten ausgewählter Carbonsäureamide der verschiedenen triterpenoiden Grundgerüste (PA = Platansäure, UA = Ursolsäure, OA = Oleanolsäure, MA = Maslinsäure, BA = Betulinsäure) bezüglich Ovarialkarzinom Zellen (A2780).

Um Aussagen über Selektivitäten treffen zu können, wurden alle Substanzen zusätzlich hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften gegenüber nicht-malignen

Mausfibroblasten (NIH 3T3) getestet. Auch hierbei zeigten die verschiedenen triterpenoiden Grundgerüste unterschiedliche Eigenschaften.

In Abb. 17 ist das Selektivitätsverhalten ausgewählter Amide am Beispiel der malignen Zelllinie A2780 und den nicht-malignen Mausfibroblasten NIH 3T3 vergleichend dargestellt. Darin fällt auf, dass die Selektivitätsindices der entsprechenden Betulin- (**P3-18**), Oleanol- (**P4-14**) und Ursolsäure-Derivate (**P3-4**) nur sehr geringfügig von 1 abweichen. Diese Verbindungen wirken somit auf nicht-maligne Zellen im gleichen Maße zytotoxisch wie auf Tumorzellen. Im Fall des Platansäure-Amids **P1-35** wurde sogar ein inverses Selektivitätsverhalten beobachtet. Der  $EC_{50}$ -Wert für NIH 3T3 ist in etwa um den Faktor 3 kleiner als der  $EC_{50}$ -Wert für A2780 Tumorzellen. Das entsprechende Maslinsäure Derivat **P4-22** hingegen zeigt mit einem Selektivitätsindex von 2.75 eine deutliche

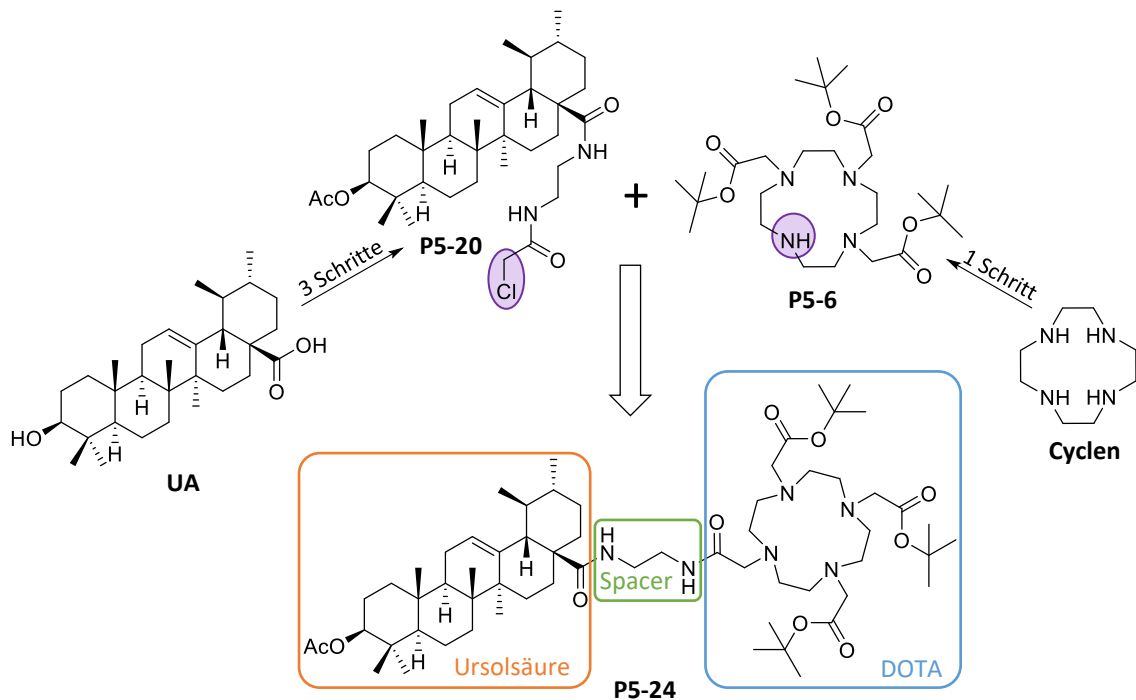
Verbesserung der Selektivität. Dieses Verhalten stimmt mit den in den Kapiteln 3.1.2 und 3.2.1 sowie in der Literatur<sup>[96, 98, 100]</sup> gewonnenen Erkenntnissen überein. Einige der Triterpen-Amide wurden zusätzlich in pro-apoptotischen Screenings untersucht, um deren Wirkmechanismus aufzuklären. Dabei kamen verschiedene Methoden, wie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nach Anfärbung mit Propidiumiodid bzw. Acridinorange oder ein kombinierter Annexin-V/Propidiumiodid-Assay zum Einsatz. Für einige Derivate, wie **P3-25**, **P4-6** oder **P4-23** konnten deutliche Hinweise auf einen programmierten Zelltod (Apoptose), wie z.B. Membran-Blebbing (vgl. Kapitel 1.2.3.2), beobachtet werden.



**Abb. 17:** Zytotoxizitäten ausgewählter Carbonsäureamide der verschiedenen triterpenoiden Grundgerüste (PA = Platansäure, UA = Ursolsäure, OA = Oleanolsäure, MA = Maslinsäure, BA = Betulinsäure) bezüglich Ovarialkarzinom Zellen (A2780) und nicht-malignen Mausfibroblasten (NIH 3T3).  $SI = EC_{50}(\text{NIH 3T3})/EC_{50}(\text{A2780})$ .

### 3.2.3 DOTA-Konjugate der Ursolsäure

Weiterführende strukturelle Modifizierungen der in Kapitel 3.2.2 diskutierten Amide wurden am Beispiel der entsprechenden Ursolsäure-Derivate durchgeführt. Die Grundidee dabei war nach wie vor die Herstellung antitumoraktiver Derivate und damit potentieller Chemotherapeutika unter Berücksichtigung der Selektivität. Gleichzeitig wurde diese Intention im Hinblick auf zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten erweitert. Durch Wahl eines geeigneten, klinisch relevanten Pharmakophors und dessen Verknüpfung mit zytotoxischen Ursolsäure-Derivaten könnte das Anwendungsspektrum der hergestellten Verbindungen möglicherweise erweitert werden. Ein mehrfach in der Literatur beschriebenes Molekül, welches in einer Vielzahl bildgebender Verfahren in der Tumordiagnose, wie PET, MRT oder SPECT (vgl. Kapitel 1.2.3.1) medizinische Anwendung findet, ist der makrozyklische Chelator 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA).<sup>[101-106]</sup> Wie bereits in Kapitel 1.2.3.1 erwähnt wurde, ist neben der Therapie von Tumoren, deren Diagnose ein ebenso bedeutender Punkt in der Behandlung. Daher wurde eine Verknüpfung zytotoxischer Ursolsäure-Derivate mit dem diagnostisch angewandten DOTA als sinnvoll erachtet. Die daraus resultierenden Konjugate könnten neben der potentiellen Anwendung in der Tumorthherapie möglicherweise auch diagnostische Anwendungsmöglichkeiten eröffnen.

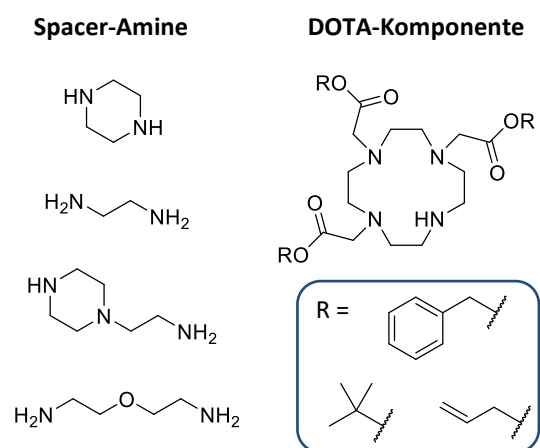


**Abb. 18:** Vereinfachtes Syntheschema zur Darstellung der Ursolsäure-DOTA-Konjugate ausgehend von Ursolsäure (UA) und Cyclen am Beispiel der Verbindung P5-24.

In der Literatur finden sich zum aktuellen Zeitpunkt keinerlei Referenzen für eine Verknüpfung des DOTA mit einem pentazyklischen Triterpen-Grundgerüst. Lediglich die Synthese eines auf Oleanolsäure basierenden Konjugats mit dem strukturverwandten Chelator NOTA wird in der Literatur beschrieben.<sup>[107]</sup> Die Synthese der Ursolsäure-DOTA-Konjugate erfolgte über mehrere Stufen, wobei beide Komponenten vor Verknüpfung jeweils chemisch modifiziert wurden. Das vereinfachte Syntheschema zur Herstellung der Ursolsäure-DOTA-Konjugate ist am Beispiel der Verbindung **P5-24** in Abb. 18 dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung des Syntheseweges ist in der Publikation P5 „*Synthesis and cytotoxicity evaluation of DOTA-conjugates of ursolic acid*“ zu finden. Als sinnvolle Ausgangsverbindung zur Herstellung der DOTA-Komponente wurde Cyclen gewählt. Drei der vier sekundären Amino Funktionen dieser Verbindung wurden dabei mit

Acetatgruppen verknüpft. Das entstehende Derivat **P5-6** verfügt noch über eine freie, sekundäre Aminogruppe, welche als reaktives Zentrum für die anschließende Verknüpfung zur Verfügung steht (Abb. 18, lila). Die Vorbereitung der Ursolsäure erfolgte zunächst durch Acetylierung an Position 3 und anschließender Amidierung mit dem entsprechenden Spacer-Amin. Dabei

wurden einige der bereits in Kapitel 3.2.2 diskutierten Verbindungen verwendet. Durch Umsetzung der terminalen Aminogruppe mit Chloracetylchlorid entsteht das kupplungsbereite Derivat **P5-20**, dessen endständige Chlormethylgruppe als reaktives Zentrum im weiteren Syntheseverlauf fungiert (Abb. 18, lila). Die anschließende Verknüpfung der beiden Precursor-Moleküle **P5-6** und **P5-20** erfolgt durch nukleophile Substitution der Aminogruppe der DOTA-Komponente und der Chlormethylgruppe des Triterpen-Derivats unter Bildung des Konjugats **P5-24**. Die synthetisierten Konjugate können dabei durch eine generalisierte Strukturformel beschrieben werden, welche aus drei Teilen zusammengesetzt ist: Das Ursolsäure-Grundgerüst (Abb. 18, orange) und die DOTA-Komponente (Abb. 18, blau), welche über einen Spacer (Abb. 18, grün) miteinander verknüpft sind. Dabei kamen sowohl unterschiedliche Spacer-Amine als auch verschiedene Substituenten der DOTA-Komponente zum Einsatz (Abb. 19).



**Abb. 19:** Übersicht der verwendeten Spacer-Amine und Substituenten der DOTA-Komponente.

Die synthetisierten Konjugate wurden in SRB-Assays bezüglich Ihrer zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Dabei wurde für einen Großteil der Verbindungen ein schlechtes Löslichkeitsverhalten festgestellt, weshalb diese Derivate nicht genauer untersucht werden konnten. Bei den restlichen untersuchbaren Konjugaten konnten jedoch einige interessante Ergebnisse beobachtet werden. Die Verbindungen zeigten EC<sub>50</sub>-Werte in einem Bereich zwischen 1.5 und 6.0 µM gegenüber malignen Zelllinien. Die beiden aktivsten Konjugate **P5-22** und **P5-24** erreichten Spitzenwerte von  $1.5 \pm 0.4$  µM (**P5-22**, A375) bzw.  $1.7 \pm 0.1$  µM (**P5-24**, A2780). Beide Substanzen wurden mittels erweiterter Tests basierend auf fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, einem kombinierten Annexin-V/Propidiumiodid-Assay sowie der Evaluierung des Zellzyklus‘ bezüglich des Wirkmechanismus‘ untersucht. Dabei konnten für Verbindung **P5-24** deutliche Hinweise auf eine apoptotische Wirkung, wie z.B. Membran-Bebbling oder DNA-Fragmentierung (vgl. Kapitel 1.2.3.2) festgestellt werden. Eine detaillierte Beschreibung der experimentellen Daten sowie die Ergebnisse der SRB-Assays und weiterführender Untersuchungen hinsichtlich des Wirkmechanismus‘ sind in der Publikation P5 „*Synthesis and cytotoxicity evaluation of DOTA-conjugates of ursolic acid*“ veröffentlicht worden.

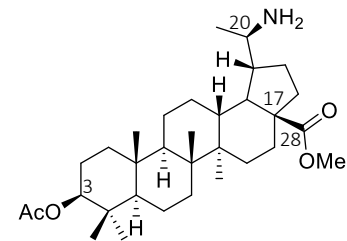
## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit bildete die Synthese zytotoxischer bzw. antitumoraktiver Triterpen-basierter Derivate. Die dabei erhaltenen Forschungsergebnisse sind in insgesamt fünf Publikationen veröffentlicht worden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden strukturelle Modifizierungen an dem pentazyklischen Triterpen Platansäure vorgenommen, um deren zytotoxische Eigenschaften zu verbessern. Im Fokus der Derivatisierung lag dabei die Einführung diverser Stickstoff-Substituenten an verschiedenen Positionen des triterpenoiden Grundgerüsts. Dabei resultierten aus der Einführung primärer Aminogruppen an den Positionen C-3 oder C-20 signifikant erhöhte Zytotoxizitäten. Das entsprechende an Position C-17 substituierte Derivat wurde hingegen als inaktiv eingestuft.

Weiterhin führten Ethylendiamin-abgeleitete Substituenten an der Carboxylgruppe C-28 zu verbesserten zytotoxischen

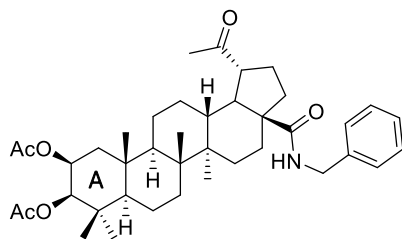
Eigenschaften. Bei Untersuchung des Wirkmechanismus von **P1-17** (Abb. 20) konnten zudem Hinweise auf pro-apoptotische Eigenschaften festgestellt werden.



**P1-17**

$EC_{50}$  (A2780) = 4.7  $\mu$ M  
 $EC_{50}$  (NIH 3T3) = 5.6  $\mu$ M  
 SI = 1.19

**Abb. 20:** Strukturformel des Platansäure Derivats **P1-17**.



**PA-5**

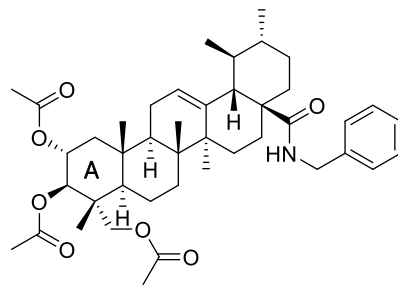
$EC_{50}$  (A2780) = 2.4  $\mu$ M  
 $EC_{50}$  (NIH 3T3) = >30  $\mu$ M  
 SI = >12.5

**Abb. 21:** Strukturformel des Platansäure Derivats **PA-5**.

Die meisten der aktiven Platansäure-Derivate zeigten allerdings eine geringe Selektivität zwischen malignen und nicht-malignen Zellen, weshalb weitere strukturelle Modifizierungen durchgeführt werden mussten. Durch die Einführung einer zweiten Hydroxygruppe am A-Ring der Platansäure nach dem Vorbild Maslin- bzw. Augustussäure sowie der Umsetzung zu Benzylamiden, konnte dabei eine Verbesserung der Selektivität entsprechender Platansäure-Derivate erreicht werden (Abb. 21).

Um eine mögliche weitere Steigerung der Selektivität durch eine dritte Hydroxygruppe am A-Ring eines triterpenoiden Grundgerüsts zu untersuchen, wurden entsprechende Derivate ausgehend von Asiasäure hergestellt, da diese bereits in ihrer natürlich vorkommenden Form drei OH-Gruppen am A-Ring aufweist. Dabei zeigte sich zwar eine teilweise Steigerung zytotoxischer Eigenschaften, allerdings konnte keine weitere

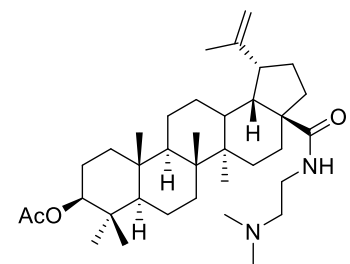
Verbesserung der Selektivität im Vergleich zum analogen Maslinsäure-Derivat beobachtet werden (Abb. 22).

**P2-2**EC<sub>50</sub> (A2780) = 0.11 μMEC<sub>50</sub> (NIH 3T3) = 4.6 μM

SI = 41.81

**Abb. 22:** Strukturformel des Asiasäure-Derivats **P2-2**.

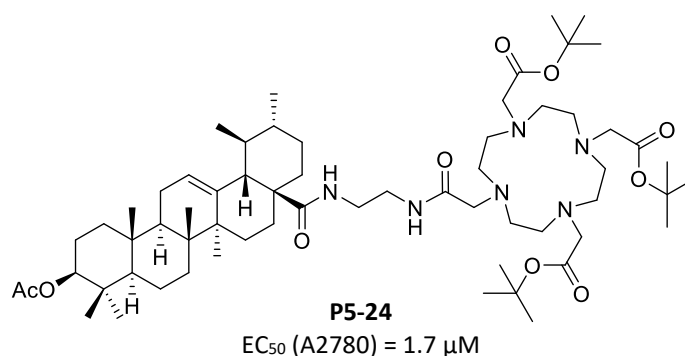
Die vielversprechenden zytotoxischen Eigenschaften der Ethylendiamin-abgeleiteten Platansäureamide dienen als Basis für weiterführende Studien unter Ausweitung auf weitere pentazyklische Triterpene, wie Ursol-, Oleanol-, Maslin- und Betulinsäure. Alle Amide zeigten gesteigerte Zytotoxizitäten, wobei einige Unterschiede zwischen den einzelnen Grundgerüsten festgestellt werden konnten. Als aktivste Substanzklasse wurden dabei die Betulinsäure-Derivate, wie z.B. **P3-25** (Abb. 23) identifiziert. Bei Untersuchungen ausgehend von Oleanolsäure führte eine Verlängerung der Alkylkette des Ethylendiamin-Substituenten bis zu einer Länge von sechs Methyleneinheiten (Hexamethyldiamin) zu steigenden EC<sub>50</sub>-Werten, während die Substitution der terminalen Aminogruppe keinen erheblichen Einfluss zu haben scheint. Das Anbringen oder Abspalten von Acetylgruppen am A-Ring resultierte abhängig vom jeweiligen Grundgerüst in gesteigerten oder verringerten EC<sub>50</sub>-Werten. Das beste Selektivitätsverhalten zeigten entsprechende Derivate der Maslinsäure.

**P3-25**EC<sub>50</sub> (A2780) = 0.2 μM**Abb. 23:** Strukturformel des Betulinsäure Derivats **P3-25**.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit wurden weiterführende strukturelle Modifizierungen ausgehend von Ursolsäureamiden vorgenommen. Intention war dabei die Herstellung antitumoraktiver Substanzen unter in Zukunft möglicher Erweiterung des Anwendungsspektrums im Bereich der Tumordiagnose. Die durch Verknüpfung der Ursolsäureamide mit dem diagnostisch angewandten Chelator DOTA hergestellten Derivate wurden bezüglich ihrer zytotoxischen Eigenschaften in SRB-Assays sowie in pro-apoptischen Screenings untersucht. Einige der Substanzen zeigten dabei niedrige EC<sub>50</sub>-Werte unterhalb von 6 μM. Die Ergebnisse der Annexin V-Assays und Zellzyklus-



Evaluierung deuteten speziell für Verbindung **P5-24** (Abb. 24) auf eine apoptotische Wirkung hin.



**Abb. 24:** Strukturformel des Ursolsäure-DOTA Konjugats **P5-24**.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation haben gezeigt, dass es möglich ist, mit vergleichsweise einfachen Synthesestrategien aktive Substanzen herzustellen. Allerdings ist die Fähigkeit der synthetisierten Verbindungen zwischen malignen und nicht-malignen Zellen zu unterscheiden häufig nicht zufriedenstellend ausgeprägt. Weiterhin ist noch nicht vollkommen klar, welche strukturellen Modifizierungen einen positiven Einfluss auf die Selektivität ausüben. Daher sollte die weitere Optimierung des Selektivitätsverhaltens zytotoxischer Substanzen Inhalte zukünftiger Forschungen darstellen. Weiterhin ist die Überprüfung einer möglichen Anwendung der synthetisierten Ursolsäure-DOTA-Konjugate in bildgebenden Verfahren der Tumordiagnostik, wie z.B. PET ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen. Erste Untersuchungen hierzu sind bereits anhand eines Oleanolsäure-NOTA-Konjugats in der Literatur beschrieben worden.<sup>[107]</sup>

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] K. G. Ramawat, *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2008**, S. 2-5.
- [2] U. Bühring, *Praxis-Lehrbuch Heilpflanzenkunde: Grundlagen - Anwendung - Therapie*, 4. Auflage, Karl F. Haug Verlag, Stuttgart, **2014**, S. 24-36.
- [3] E. K. Teall, *Grand Valley Journal of History* **2014**, 3, Article 2.
- [4] C. L. Herzenberg, S. V. Meschel, J. A. Altena, *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, 101-105.
- [5] G. Ebers, *Zeitschrift für Ägyptische Sprache und Altertumskunde* **1873**, 11, 41-46.
- [6] G. Klebe, *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**, S. 7-137.
- [7] <http://derblaueritter.de/wp-content/uploads/2015/02/paracelsus-1.jpg>, 13.06.2019 10:45 Uhr.
- [8] B. B. Petrovska, *Pharmacogn. Rev.* **2012**, 6, 1-5.
- [9] R. Verpoorte, Medicinal Plants: A Renewable Resource for Novel Leads and Drugs. *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2009**, S. 1-5.
- [10] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629-661.
- [11] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, *Ca-Cancer J. Clin.* **2018**, 68, 394-424.
- [12] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, *Ca-Cancer J. Clin.* **2015**, 65, 87-108.
- [13] D. M. Parkin, P. Pisani, J. Ferlay, *Ca-Cancer J. Clin.* **1999**, 49, 33-64.
- [14] D. M. Parkin, *Lancet Oncol.* **2001**, 2, 533-543.
- [15] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani, *Ca-Cancer J. Clin.* **2005**, 55, 74-108.
- [16] <https://gco.iarc.fr/tomorrow/>, 13.05.2019 10:30 Uhr.
- [17] <http://gco.iarc.fr/today/>, 14.05.2019 15:30 Uhr.
- [18] <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle-2016.html>, 14.05.2019 16:00 Uhr.
- [19] H. Leischner, *Basics Onkologie*, Urban & Fischer Verlag, München, **2010**, S. 1-3.

- [20] W. Müller-Esterl, *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2017**, S. 493-494.
- [21] C. Wagener, O. Müller, *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte; 95 Tabellen*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2010**, S. 61-76.
- [22] K. R. Aigner, F. O. Stephens, *Onkologie Basiswissen*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2016**, S. 5-13.
- [23] D. Schadendorf, W. Queißer, *Krebsfrüherkennung: Allgemeine und spezielle Aspekte der sekundären Prävention maligner Tumoren*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2003**, S. 1-5.
- [24] G. Irney, A. L. Jordan, *110 wirksame Behandlungsmöglichkeiten bei Krebs: gezielte Information: die wichtigsten Methoden und unterstützenden Maßnahmen ; Schulmedizin und sinnvolle Alternativen besser verstehen ; so finden Sie Ihren persönlichen Weg*, Karl F. Haug Verlag, Stuttgart, **2005**, S. 34-35.
- [25] O. Dössel, *Bildgebende Verfahren in der Medizin: Von der Technik zur medizinischen Anwendung*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2016**, S. 1-3.
- [26] B. Lemmer, D. Palm, G. Fülgraff, K. Brune, *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2010**, S. 156-161.
- [27] K. R. Aigner, F. O. Stephens, *Onkologie Basiswissen*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2016**, S. 79-99.
- [28] W. Hiddemann, C. R. Bartram, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2010**, S. 401-480.
- [29] N. V. Bhagavan, *Medical Biochemistry*, 4th Edition, Harcourt Academic Press, Burlington, **2002**, S. 609.
- [30] S. Elmore, *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35, 495-516.
- [31] G. Löffler, P. C. Heinrich, P. E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**, S. 225-228.
- [32] A. Smith, M. A. Parkes, G. K. Atkin-Smith, R. Tixeira, I. K. Poon, *WikiJournal of Medicine* **2017**, 4, 1-3.

- [33] K. D. Miller, R. L. Siegel, C. C. Lin, A. B. Mariotto, J. L. Kramer, J. H. Rowland, K. D. Stein, R. Alteri, A. Jemal, *Ca-Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 271-289.
- [34] G. M. Cragg, D. J. Newman, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72-79.
- [35] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- [36] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888-3890.
- [37] J. Heymach, L. Krilov, A. Alberg, N. Baxter, S. M. Chang, R. B. Corcoran, W. Dale, A. DeMichele, C. S. Magid Diefenbach, R. Dreicer, A. S. Epstein, M. L. Gillison, D. L. Graham, J. Jones, A. H. Ko, A. M. Lopez, R. G. Maki, C. Rodriguez-Galindo, R. L. Schilsky, M. Sznol, S. N. Westin, H. Burstein, *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1020-1044.
- [38] <https://www.vfa-bio.de/vb-de/aktuelle-themen/branche/car-t-eine-revolution-in-der-krebstherapie.html>, 13.05.2019 13:00 Uhr.
- [39] E. Tran, D. L. Longo, W. J. Urbaniak, *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2593-2596.
- [40] <http://scienzaericerca.univr.it/2017/12/13/kymriah-the-half-million-dollar-therapy-interview-with-dr-bondanza/>, 13.05.2019 14:00 Uhr.
- [41] [http://www.pmlive.com/pharma\\_news/gilead\\_strikes\\_deal\\_with\\_nhs\\_england\\_on\\_car-t\\_yscarta\\_1254669](http://www.pmlive.com/pharma_news/gilead_strikes_deal_with_nhs_england_on_car-t_yscarta_1254669), 13.05.2019 14:00 Uhr.
- [42] H. Ledford, *Nature* **2014**, *508*, 24-26.
- [43] Y.-H. Lee, C. H. Kim, *Arch. Pharmacol Res.* **2019**.
- [44] N. A. Mitchison, *J. Exp. Med.* **1955**, *102*, 157.
- [45] E. J. Lipson, C. G. Drake, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6958.
- [46] <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/>, 15.05.2019 10:15 Uhr.
- [47] G. Habermehl, P. Hammann, H. C. Krebs, W. Ternes, *Naturstoffchemie: Eine Einführung*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2008**, S. 5-55.
- [48] E. Breitmaier, *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2005**, S. 1-10.
- [49] A. Greenberg, W. J. Cannon, *Chemistry: Decade by Decade*, Facts On File, Inc., New York, **2007**, S. 109-141.
- [50] O. Wallach, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1885**, *230*, 225-272.
- [51] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *9*, 357-367.

- [52] P. Dzubak, M. Hajduch, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban, J. Sarek, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394-411.
- [53] E. Breitmaier, *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2005**, S. 85-108.
- [54] R. Aplin, T. Halsall, T. Norin, *J. Chem. Soc.* **1963**, 3269-3273.
- [55] T. Fujioka, Y. Kashiwada, R. E. Kilkuskie, L. M. Cosentino, L. M. Ballas, J. B. Jiang, W. P. Janzen, I.-S. Chen, K.-H. Lee, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243-247.
- [56] L. Heller, M. Kahnt, A. Loesche, P. Grabandt, S. Schwarz, W. Brandt, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 652-668.
- [57] P. Davies, A. Maloney, *Lancet* **1976**, *308*, 1403.
- [58] S. Schwarz, S. Sommerwerk, S. D. Lucas, L. Heller, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 95-102.
- [59] C. P. S. Potter, A. L. Harris, *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 2-7.
- [60] A. Giatromanolaki, M. I. Koukourakis, E. Sivridis, J. Pastorek, C. C. Wykoff, K. C. Gatter, A. L. Harris, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7992.
- [61] N. Robertson, C. Potter, A. L. Harris, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6160.
- [62] S. K. Chia, C. C. Wykoff, P. H. Watson, C. Han, R. D. Leek, J. Pastorek, K. C. Gatter, P. Ratcliffe, A. L. Harris, *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 3660-3668.
- [63] L. C. Baratto, M. V. Porsani, I. C. Pimentel, A. B. Pereira Netto, R. Paschke, B. H. Oliveira, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 121-131.
- [64] F. M. Abdel Bar, A. M. Zaghoul, S. V. Bachawal, P. W. Sylvester, K. F. Ahmad, K. A. El Sayed, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1787-1790.
- [65] S. Sommerwerk, L. Heller, C. Kerzig, A. E. Kramell, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 1-9.
- [66] S. Sommerwerk, L. Heller, R. Csuk, *Arch. Pharm.* **2015**, *348*, 46-54.
- [67] J. Y. Kim, H.-M. Koo, D. S. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2405-2408.
- [68] R. Csuk, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 913-923.
- [69] T. Laxmi, K. Praveen, S. Ranjit, *Curr. Bioact. Compd.* **2009**, *5*, 160-168.
- [70] D.-M. Zhang, H.-G. Xu, L. Wang, Y.-J. Li, P.-H. Sun, X.-M. Wu, G.-J. Wang, W.-M. Chen, W.-C. Ye, *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 1127-1155.
- [71] S. Fulda, C. Friesen, M. Los, C. Scaffidi, W. Mier, M. Benedict, G. Nuñez, P. H. Krammer, M. E. Peter, K.-M. Debatin, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4956.

- [72] V. Zuco, R. Supino, S. C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, F. Formelli, *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17-25.
- [73] S. Fulda, *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 1096-1107.
- [74] H. Chen, Y. Gao, A. Wang, X. Zhou, Y. Zheng, J. Zhou, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 648-655.
- [75] H. Hussain, I. R. Green, I. Ali, I. A. Khan, Z. Ali, A. M. Al-Sadi, I. Ahmed, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 1061-1072.
- [76] D. Y. Seo, S. R. Lee, J.-W. Heo, M.-H. No, B. D. Rhee, K. S. Ko, H.-B. Kwak, J. Han, *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **2018**, *22*, 235-248.
- [77] A. Paszel-Jaworska, A. Romaniuk, M. Rybczynska, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2014**, *11*, 330-342.
- [78] J. Liu, *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49*, 57-68.
- [79] P. Gregorio, M. Giovanni, D. A. Stefano, *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1259-1269.
- [80] G. Lozano-Mena, M. Sánchez-González, M. E. Juan, J. M. Planas, *Molecules* **2014**, *19*, 11538-11559.
- [81] C. Sánchez-Quesada, A. López-Biedma, F. Warleta, M. Campos, G. Beltrán, J. J. Gaforio, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 12173-12182.
- [82] M. E. Juan, J. M. Planas, V. Ruiz-Gutierrez, H. Daniel, U. Wenzel, *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 36-43.
- [83] P.-O. Harmand, R. Duval, C. Delage, A. Simon, *Int. J. Cancer* **2005**, *114*, 1-11.
- [84] J. T. James, I. A. Dubery, *Molecules* **2009**, *14*, 3922-3941.
- [85] M. F. Nagoor Meeran, S. N. Goyal, K. Suchal, C. Sharma, C. R. Patil, S. K. Ojha, *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
- [86] W.-J. Kim, J. Kim, B. Veriansyah, J.-D. Kim, Y.-W. Lee, S.-G. Oh, R. R. Tjandrawinata, *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *48*, 211-216.
- [87] E. Reverchon, I. De Marco, *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*, 146-166.
- [88] S. M. Kamble, C. R. Patil, *Cardiovasc. Toxicol.* **2018**, *18*, 131-141.
- [89] S. P. Patil, S. Maki, S. A. Khedkar, A. C. Rigby, C. Chan, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1196-1202.
- [90] M. K. Sarika, M. P. Harun, N. G. Sameer, N. N. Malleshappa, B. M. Umesh, O. Shreesh, R. P. Chandragouda, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2017**, *20*, 215-234.

- [91] R. Csuk, S. Schwarz, B. Siewert, R. Kluge, D. Ströhl, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5356-5369.
- [92] C.-M. Ma, X.-H. Wu, M. Hattori, X.-J. Wang, Y. Kano, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2009**, *12*, 243-248.
- [93] C.-M. Ma, S.-Q. Cai, J.-R. Cui, R.-Q. Wang, P.-F. Tu, M. Hattori, M. Daneshtalab, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 582-589.
- [94] L. Heller, S. Sommerwerk, F. Tzschöckell, J. Wiemann, S. Schwarz, B. Siewert, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Arch. Pharm.* **2015**, *348*, 889-896.
- [95] L. Heller, A. Knorrscheidt, F. Flemming, J. Wiemann, S. Sommerwerk, I. Z. Pavel, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137-151.
- [96] S. Sommerwerk, L. Heller, J. Kuhfs, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464.
- [97] M. Kahnt, L. Heller, A. Al-Harrasi, R. Schäfer, R. Kluge, C. Wagner, C. Otgonbayar, R. Csuk, *Med. Chem. Res.* **2018**, *27*, 1757-1769.
- [98] B. Siewert, E. Pianowski, A. Obernauer, R. Csuk, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 594-615.
- [99] M. Kahnt, L. Heller, P. Grabandt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 259-265.
- [100] S. Sommerwerk, L. Heller, J. Kuhfs, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 1-16.
- [101] G. J. Stasiuk, N. J. Long, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2732-2746.
- [102] S. N. M. Chilla, C. Henoumont, L. V. Elst, R. N. Muller, S. Laurent, *Isr. J. Chem.* **2017**, *57*, 800-808.
- [103] M. Magerstädt, O. A. Gansow, M. W. Brechbiel, D. Colcher, L. Baltzer, R. H. Knop, M. E. Girton, M. Naegele, *Magn. Reson. Med.* **1986**, *3*, 808-812.
- [104] T. M. Jones-Wilson, K. A. Deal, C. J. Anderson, D. W. McCarthy, Z. Kovacs, R. J. Motekaitis, A. D. Sherry, A. E. Martell, M. J. Welch, *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25*, 523-530.
- [105] A. M. Wu, P. J. Yazaki, S.-w. Tsai, K. Nguyen, A.-L. Anderson, D. W. McCarthy, M. J. Welch, J. E. Shively, L. E. Williams, A. A. Raubitschek, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 8495-8500.
- [106] S. V. Deshpande, S. J. DeNardo, D. L. Kukis, M. K. Moi, M. J. McCall, G. L. DeNardo, C. F. Meares, *J. Nucl. Med.* **1990**, *31*, 473-479.

- [107] S.-M. Kim, I. H. Jeong, M. S. Yim, M. K. Chae, H. N. Kim, D. K. Kim, C. M. Kang, Y. S. Choe, C. Lee, E. K. Ryu, *J. Drug Targeting* **2014**, 22, 191-199.



## Anhang

### Publikationen

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikationen (P1-P5) sind nachfolgend aufgelistet.

**P1: „Platanic acid: A new scaffold for the synthesis of cytotoxic agents”**

M. Kahnt, L. Heller, P. Grabandt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 259-265.

**P2: „Transformation of asiatic acid into a mitocanic, bimodal-acting rhodamine B conjugate of nanomolar cytotoxicity”**

M. Kahnt, J. Wiemann, L. Fischer, S. Sommerwerk, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 143-148.

**P3: „Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents”**

M. Kahnt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Molecules* **2018**, *23*, 2558.

**P4: „The cytotoxicity of oleanane derived aminocarboxamides depends on their aminoalkyl substituents”**

M. Kahnt, A. Loesche, I. Serbian, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Steroids* **2019**, *149*, 108422.

**P5: „Synthesis and cytotoxicity evaluation of DOTA-conjugates of ursolic acid”**

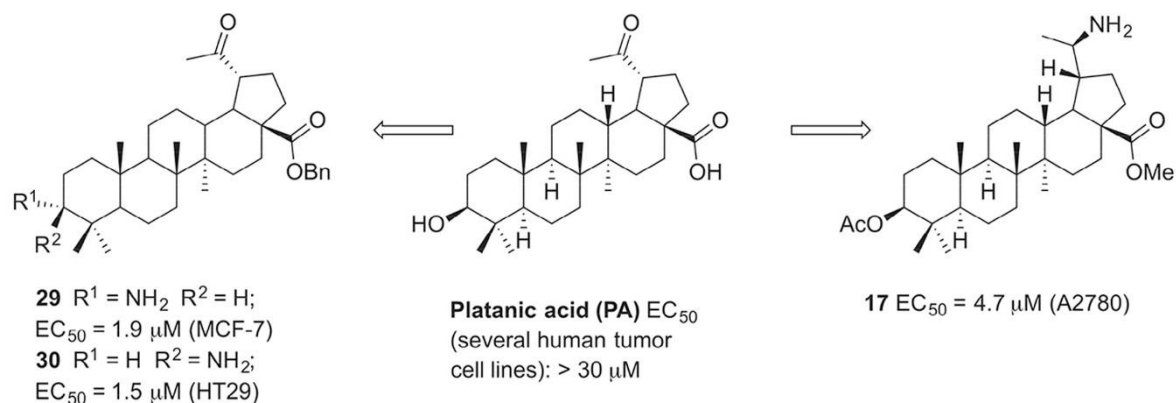
M. Kahnt, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Molecules* **2019**, *24*, 2254.

## Publikation P1

### Platanic acid: A new scaffold for the synthesis of cytotoxic agents

M. Kahnt, L. Heller, P. Grabandt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 259-265.

#### Graphical Abstract



#### Abstract

Thirty-seven different derivatives (**2-38**) have been prepared from platanic acid, a natural occurring triterpenoid. Main emphasis was the introduction of several N-containing functional groups such as amines, amides and oximes and their screening for cytotoxic activity employing several human tumor cell lines using SRB assays. In these SRB assays, nearly all compounds showed good cytotoxicity for these human tumor cell lines. Two compounds (**17** and **38**), however, were submitted to extended biological testing and investigated with respect to their mode of action using fluorescence microscopy and FACS analysis. Compound **17**, a methyl (3β, 20R) 3-acetyloxy-20-amino-30-norlupan-28-oate, induced apoptosis in A2780 ovarian carcinoma cells.

#### Keywords

Triterpenes; Platanic acid; Cytotoxicity

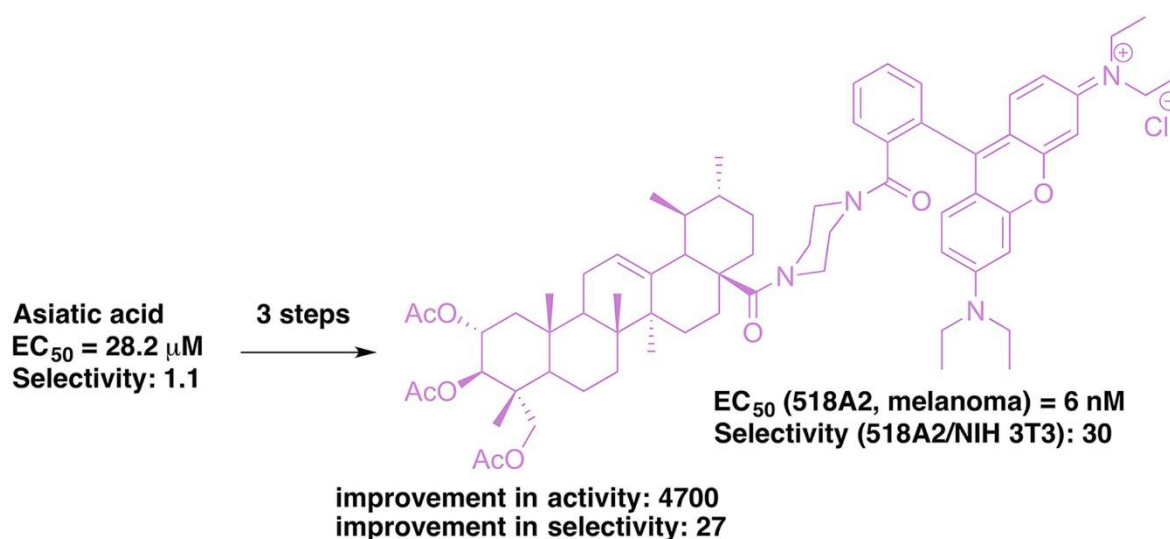
**DOI:** 10.1016/j.ejmech.2017.11.046

## Publikation P2

**Transformation of asiatic acid into a mitocanic, bimodal-acting rhodamine B conjugate of nanomolar cytotoxicity**

M. Kahnt, J. Wiemann, L. Fischer, S. Sommerwerk, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 143-148.

## Graphical Abstract



## Abstract

Based on their biological activity natural products continue to represent optimal lead structures for the development of novel drug candidates. We focused on the syntheses of several derivatives of the triterpene asiatic acid and on the evaluation of their cytotoxic activity in a photometric sulforhodamin B assay. Especially, benzamide **2** and rhodamine B conjugate **11** show a distinct cytotoxicity for several human tumor cell lines, e.g. EC<sub>50</sub> (A2780) = 110 ± 1 nM and EC<sub>50</sub> (A2780) = 8 ± 2 nM, respectively. Interestingly, compound **11** showed for two human tumor cell lines (HT29 and 518A2) non-linear, bimodal dose-response relationships.

## Keywords

Asiatic acid; Triterpene; Cytotoxicity; Mitocan; Rhodamine B; Bimodal

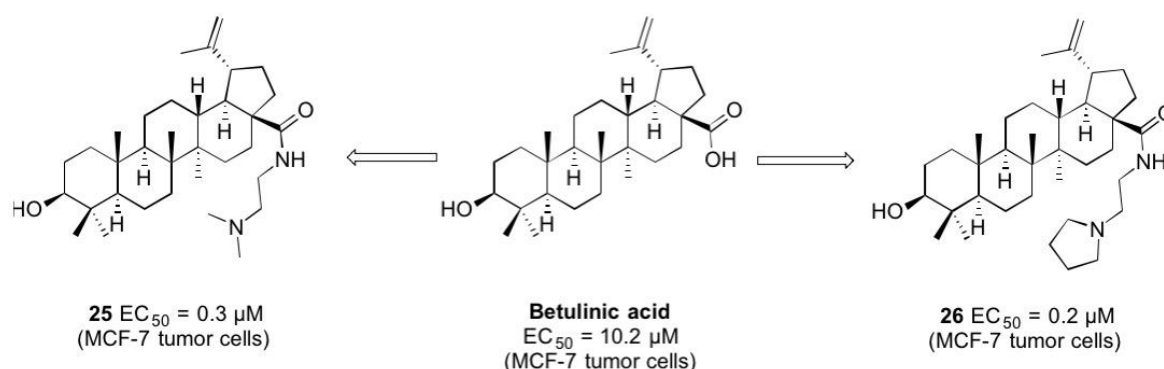
DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.09.066

## Publikation P3

## Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents

M. Kahnt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Molecules* **2018**, *23*, 2558.

## Graphical Abstract



## Abstract

Two easily accessible, natural occurring triterpenoids, betulinic and ursolic acid, were used as starting materials for the synthesis of novel cytotoxic agents. A set of 28 ethylenediamine-spacered carboxamides was prepared holding an additional substituent connected to the ethylenediamine group. The compounds were screened in SRB assays to evaluate their cytotoxic activity employing several human tumor cell lines. Betulinic acid-derived carboxamides **17–30** showed significantly higher cytotoxicity than their ursolic acid analogs **3–16**. In particular, compounds **25** and **26** were highly cytotoxic, as indicated by EC<sub>50</sub> values lower than 1 μM.

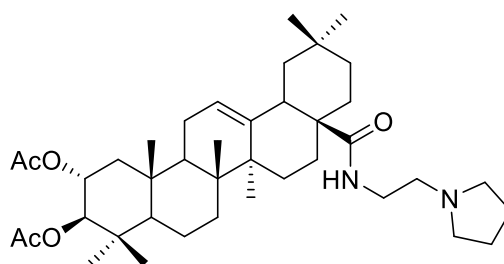
## Keywords

ursolic acid; betulinic acid; cytotoxicity; triterpenoids

DOI: 10.3390/molecules23102558

**Publikation P4****The cytotoxicity of oleanane derived aminocarboxamides depends on their aminoalkyl substituents**

M. Kahnt, A. Loesche, I. Serbian, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harrasi, R. Csuk,  
*Steroids* **2019**, *149*, 108422.

**Graphical Abstract**

EC<sub>50</sub> = 1.5 μM (A2780)  
EC<sub>50</sub> = 4.6 μM (NIH 3T3)

**Abstract**

Several oligo-methylene diamine derived carboxamides of oleanolic and maslinic acid have been prepared, and substitutions of the terminal primary amine as well as variations of the length of alkyl chain of the diamine moiety were made. Biological evaluation of their cytotoxic activity was performed using photometric sulforhodamin B assays employing a panel of different human cancer cell lines. These experiments showed most of the carboxamides to be cytotoxic with EC<sub>50</sub> values below 10 μM. Prolongation of the alkyl chainlength initially reduced EC<sub>50</sub> values to a minimum, but a decrease in cytotoxicity was observed for longer alkyl chains. Variation of substituents at the terminal nitrogen atom, however, did not influence EC<sub>50</sub> values at all. Noteworthy results were obtained particularly for compounds 4, 6 and 23 as indicated by EC<sub>50</sub> values lower than 2 μM, and in case of a maslinic derivative 23 even an increased tumor/non-tumor cell selectivity was observed. These compounds were further investigated using fluorescence microscopy and flow cytometry analysis, which revealed 6 to show indications of apoptosis.

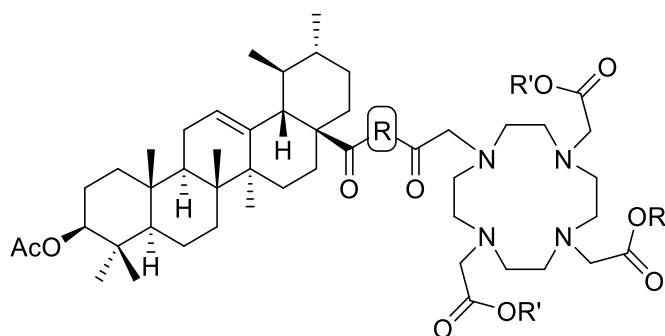
**Keywords**

Oleanolic acid; maslinic acid; cytotoxicity; triterpenoids, carboxamides

**DOI:** 10.1016/j.steroids.2019.05.014

**Publikation P5****Synthesis and cytotoxicity evaluation of DOTA-conjugates of ursolic acid**

M. Kahnt, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Molecules* **2019**, *24*, 2254.

**Graphical Abstract****Abstract**

In this study, we report the synthesis of several amine-spacered conjugates of ursolic acid (UA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA). Thus, a total of 11 UA-DOTA conjugates were prepared holding various oligo-methylene diamine spacers as well as different substituents at the acetate units of DOTA including tert-butyl, benzyl, and allyl esters. Furthermore, three synthetic approaches were compared for the ethylenediamine-spacered conjugate **29** regarding reaction steps, yields, and precursor availability. The prepared conjugates were investigated regarding cytotoxicity using SRB assays and a set of human tumor cell lines. The highest cytotoxicity was observed for piperazinyl spacered compound **22**. Thereby,  $EC_{50}$  values of 1.5  $\mu\text{M}$  (for A375 melanoma) and 1.7  $\mu\text{M}$  (for A2780 ovarian carcinoma) were determined. Conjugates **22** and **24** were selected for further cytotoxicity investigations including fluorescence microscopy, annexin V assays and cell cycle analysis.

**Keywords**

Uroslic acid; DOTA; triterpenoids; cytotoxicity

**DOI:** 10.3390/molecules24122254



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Michael Kahnt  
Geburtsdatum: 21.02.1991  
Geburtsort: Schkeuditz  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildungsweg

---

Seit 11/2015 Promotionsstudium unter der Leitung von Prof. Dr. René Csuk  
Institut für Chemie im Bereich Organische Chemie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2013 - 09/2015 Master of Science Chemie (1,2)  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2010 - 10/2013 Bachelor of Science Chemie (1,7)  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2001 - 2009 Allgemeine Hochschulreife (1,4)  
Roman Herzog Gymnasium Schmölln

### Praxiserfahrung

---

12/2016 - 07/2017 Wissenschaftliche Hilfskraft  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Institut für Chemie)

01/2016 - 03/2016 Wissenschaftliche Hilfskraft  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Institut für Chemie)



**Publikationsliste**

„Synthesis and cytotoxicity evaluation of DOTA-conjugates of ursolic acid”

**M. Kahnt**, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harasi, R. Csuk, *Molecules* **2019**, *24*, 2254.

„The cytotoxicity of oleanane derived aminocarboxamides depends on their aminoalkyl substituents”

**M. Kahnt**, A. Loesche, I. Serbian, S. Hoenke, L. Fischer, A. Al-Harasi, R. Csuk, *Steroids* **2019**, *149*, 108422.

„Triterpene-Based Carboxamides Act as Good Inhibitors of Butyrylcholinesterase”

A. Loesche, **M. Kahnt**, I. Serbian, W. Brandt, R. Csuk, *Molecules* **2019**, *24*, 948.

„Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents”

**M. Kahnt**, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Molecules* **2018**, *23*, 2558.

„Transformation of asiatic acid into a mitocanic, bimodal-acting rhodamine B conjugate of nanomolar cytotoxicity”

**M. Kahnt**, J. Wiemann, L. Fischer, S. Sommerwerk, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 143-148.

„Platanic acid-derived methyl 20-amino-30-norlupan-28-oates are potent cytotoxic agents acting by apoptosis”

**M. Kahnt**, L. Heller, A. Al-Harrasi, R. Schäfer, R. Kluge, C. Wagner, C. Otgonbayar, R. Csuk, *Med. Chem. Res.* **2018**, *27*, 1757-1769.

„Platanic acid: A new scaffold for the synthesis of cytotoxic agents”

**M. Kahnt**, L. Heller, P. Grabandt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 259-265.

„Amino derivatives of platanic acid act as selective and potent inhibitors of butyrylcholinesterase”

L. Heller, **M. Kahnt**, A. Loesche, P. Grabandt, S. Schwarz, W. Brandt, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 652-668.

### **Posterbeiträge**

**M. Kahnt**, L. Fischer, R. Csuk: Novel betulinic carboxamides as potential cytotoxic agents, EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, 02.-06.09.2018, Ljubljana, Slowenien.

**M. Kahnt**, L. Heller, R. Csuk: Platanic acid derivatives with promising cytotoxic activity, 18<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium, 27.-30.06.2017, Budapest, Ungarn.

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die aus den benutzten Werken, wörtlich oder inhaltlich, entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Halle (Saale), den 19.06.2019

Michael Kahnt