

Betulinsulfonamide als Prodrug gegen hypoxische Tumoren

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
Daniel Emmerich
geboren am 21. Februar 1989 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Paschke (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
Prof. Dr. Ekkehard Sinn (Western Michigan University)
Prof. Dr. René Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Tag der Verteidigung: 05. Juli 2022

„Wissen Sie, eine Doktorarbeit besteht zum großen Teil aus anderen Doktorarbeiten“, erläuterte Kolibril. „Eine neue Doktorarbeit ist immer auch eine Art Orgie von alten Doktorarbeiten, die sich untereinander, äh, befruchten, damit etwas Neues, noch nie Dagewesenes aus ihnen hervorgeht.“

— Walter Moers, Rumo & Die Wunder im Dunkeln

Inhalt

| | Seite |
|--|--------------|
| Abkürzungen | ii |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Krebs und Betulin | 1 |
| 1.2 Carboanhydrasen und Sulfonamide | 8 |
| 2. Zielstellung | 13 |
| 3. Chemische Synthesen und Analysen | 15 |
| 3.1 Sulfamate | 15 |
| 3.2 Sulfonamide durch Taurinamid | 23 |
| 4. Untersuchung der Enzymaktivität | 28 |
| 4.1 Grundlagen | 28 |
| 4.2 Methode | 30 |
| 5. Zytotoxizität | 32 |
| 5.1 IC ₅₀ -Werte | 33 |
| 5.2 Selektivitäten | 37 |
| 5.3 Struktur-Wirkungs-Korrelation | 40 |
| 6. Zusammenfassung | 46 |
| 7. Ausblick | 48 |
| 8. Methoden und Synthese | 49 |
| 8.1 Allgemeines zur Synthese | 49 |
| 8.2 Analysemethoden | 49 |
| 8.3 Synthesevorschriften | 50 |
| 8.4 SRB-Assay | 80 |
| Literaturverzeichnis | 81 |
| Abbildungsverzeichnis | 93 |
| Tabellenverzeichnis | 95 |
| Bisherige Publikationen | v |
| Danksagung | vi |
| Wissenschaftlicher Werdegang | vii |
| Eidesstattliche Erklärung | viii |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| AIF | Apoptose-Induzierender Faktor |
| APT | <i>Attached Proton Test</i> , Technik in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie, mit der man die Anzahl der Wasserstoffatome abschätzen kann, die an ein bestimmtes Kohlenstoffatom gebunden sind. |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BA | Betulinsäure, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ |
| BE | Betulin, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ |
| BECB | 3,28-Bis(ethylaminocarbonyloxy)betulin, $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_4$ |
| BSS | Bernsteinsäure, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ |
| CA | Carboanhydrase |
| CARP | <i>CarboAnhydrase-Related Protein</i> , eine inaktive Variante der Carboanhydrase |
| CoA | Coenzym A |
| d | Dublettaufspaltung |
| DCM | Dichlormethan, CH_2Cl_2 |
| dd | Dublettisches Dublett |
| DIPEA | N,N-Diisopropylethylamin, $(i\text{-Pr})_2\text{NEt}$ |
| DMA | N,N-Dimethylacetamid, $\text{H}_3\text{CCON}(\text{CH}_3)_2$ |
| DMAP | N',N'-Dimethyl-4-aminopyridin, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{N}-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ |
| DMAPP | 3,3-Dimethylallyldiphosphat, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{OPO}_3\text{PO}_3^{3-}$ |
| DMF | N,N-Dimethylformamid, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid, $\text{OS}(\text{CH}_3)_2$ |
| dms o -d $_6$ | Deutერიertes Dimethylsulfoxid, $\text{OS}(\text{CD}_3)_2$ |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DPMDC | 5-Diphosphomevalonat-Decarboxylase |
| E | Enzym |
| EC | <i>Enzyme Commission number</i> , Nummer zur Enzymklassifikation |
| EDTA | Ethan-1,2-dinitrilotetraacetat $(-\text{OOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ |
| EMT | <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> , ein Prozess, bei dem sich eine Zelle aus einem Zellverband löst |
| ESI | Elektrosprayionisation |

| | |
|------------------|---|
| FPP | Farnesyldiphosphat, $C_{15}H_{25}O_7P_2^{3-}$ |
| FPPS | Farnesyldiphosphat-Synthase |
| Gew. | Gewicht |
| GLUT | <i>GLU</i> ucose <i>T</i> ransporter, Transportproteine für Glucose |
| GPP | Geranyldiphosphat, $C_{10}H_{17}O_7P_2^{3-}$ |
| GPPS | Geranyldiphosphat-Synthase |
| HATU | <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat, $C_{10}H_{15}F_6N_6OP$ |
| HI, HIV | <i>H</i> uman <i>I</i> mmunodeficiency <i>V</i> irus, menschliches Immunschwächevirus |
| HIF | Hypoxieinduzierter Faktor |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol, $C_6H_5N_3O$ |
| IC ₅₀ | <i>I</i> nhibiting <i>C</i> oncentration <i>50</i> , Wirkstoffkonzentration, bei der die Rate der Zellvermehrung um die Hälfte abnimmt. |
| IPP | Isopentenylidiphosphat, $H_2C=C(CH_3)CH_2CH_2OPO_3PO_3^{3-}$ |
| iJ_{H-H} | Betrag der Kopplungskonstante zweier geminaler ($i = 2$) oder vicinaler ($i = 3$) Wasserstoffatome |
| i | Inhibierungsfaktor in der Michaelis-Menten-Kinetik |
| I | Inhibitor |
| IPPI | Isopentenylidiphosphat-Dimethylallyldiphosphat-Isomerase |
| K_i | Inhibierungskonstante |
| K_m | Michaelis-Menten-Konstante |
| k_n | Geschwindigkeitskonstante |
| LUS | Lupen-Synthase |
| m | Multiplettaufspaltung |
| M | Molar, $1 M = 1 \text{ mol L}^{-1}$ |
| MCT | <i>M</i> ono <i>C</i> arboxylate <i>T</i> ransporter, ein Transportmolekül für Carbonsäureanionen |
| MPP | Mevalonsäurediphosphat, $C_6H_{11}O_{10}P_2^{3-}$ |
| MS | Massenspektrometrie |
| NEt ₃ | Triethylamin, $N(C_2H_5)_3$ |
| NMR | <i>N</i> uclear <i>M</i> agnetic <i>R</i> esonance, Kernmagnetresonanz(spektroskopie) |
| NPA | 4-Nitrophenolacetat, $C_8H_7NO_5$ |
| NP | 4-Nitrophenol, $C_6H_5NO_4$ |
| OPP | Diphosphat, $-OPO_3PO_3^{3-}$ |
| OSC | 2,3-Oxosqualen-Cyclase |

| | |
|--------------|---|
| P | Produkt |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Phosphatpufferlösung |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulettaufspaltung |
| S | Substrat |
| SE | Squalen-Monooxygenase |
| SI | Selektivitätsindex |
| SQS | Squalen-Synthase |
| SRB | Sulforhodamin B, $C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$ |
| t | Triplettaufspaltung |
| TA | Taurinamid, $H_2NCH_2CH_2SO_2NH_2$ |
| TCA | Trichloressigsäure, Cl_3CCOOH |
| TERT | <i>TElomerase Reverse Transcriptase</i> , eine Proteinuntereinheit der Telomerase |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor</i> , ein Wachstumsprotein |
| THF | Tetrahydrofuran, C_4H_8O |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan, $H_2NC(CH_2OH)_3$ |
| v | Reaktionsgeschwindigkeit |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , ein Signalprotein für die Bildung von Blutgefäßen |
| v_{max} | Grenzgeschwindigkeit für die enzymatische Umsetzung |

1. Einleitung

Pflanzen werden schon seit jeher für medizinische Zwecke verwendet [1-3]. Eine wichtige Rolle spielen hierbei sogenannte sekundäre Pflanzenmetabolite, von der Pflanze hergestellte Substanzen, die nicht direkt für ihr Überleben nötig sind, aber mitunter bemerkenswerte Eigenschaften für ihren Schutz aufweisen. Beispielsweise produzieren Kartoffeln verschiedene Alkaloide, um sich vor Käferfraß zu schützen und Zitrusfrüchte wehren mittels des Terpens Limonen Blattläuse ab [4]. In Knoblauchpflanzen bildet sich antimikrobielles Allicin, wenn ihre Zellen verletzt werden [5]. Und in den Kernen von Äpfeln und Steinfrüchten kommen Cyanoglykoside vor, welche bei Beschädigung der Zelle giftige Blausäure freisetzen [6].

Unter diesen sekundären Pflanzenstoffen sind die Triterpene eine häufig anzutreffende Substanzklasse. Chemisch ist ihnen gemein, dass ihr Grundgerüst ein Kohlenwasserstoff der Formel $C_{30}H_{48}$ ist, formal also aus sechs Isopreneinheiten C_5H_8 besteht [7]. Oftmals enthalten Triterpene weitere funktionelle Gruppen, die ihre chemischen, physikalischen und physiologischen Eigenschaften bestimmen. Weiter werden Triterpene nach der Anzahl der anelierten Sechs- und Fünfringe unterteilt, aus denen ihr Grundgerüst besteht. Die allermeisten Triterpene gehören zu den Strukturen mit vier oder fünf Ringen. Eine Substanz der letzteren Gruppe, ein pentacyclisches Triterpen also, ist das Betulin.

1.1 Krebs und Betulin

Betulin (BE, (3 β)-Lup-20(29)-en-3,28-diol, CAS 473-98-3, Abb. 1) ist ein sekundärer Metabolit, der in einigen höheren Pflanzen vorkommt [8,9]. Die mit Abstand ergiebigste Quelle ist die Rinde von Birken; der getrocknete Kork der Weißbirke *Betula alba* enthält bis zu 30 Gew.-% Betulin [10,11]. Die weiße, leicht

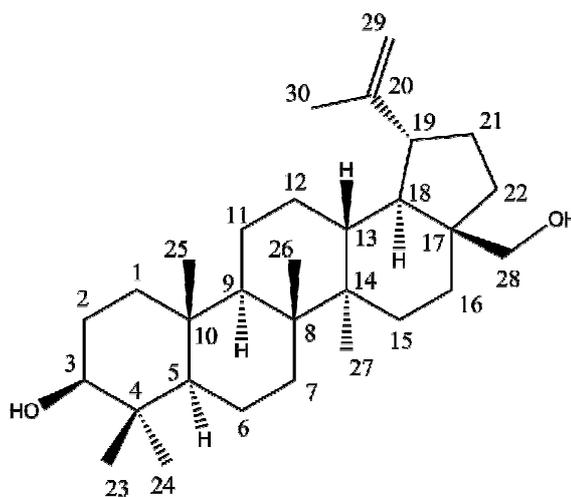


Abbildung 1: Strukturformel von Betulin mit üblicher Nummerierung der Kohlenstoffatome.

zu extrahierende Substanz ist ein Triterpen des Lupantyps und enthält als funktionelle Gruppen eine Doppelbindung zwischen C20 und C29, sowie zwei Hydroxylgruppen, je eine an C3 und C28.

Betulinsäure (BA, 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-28-säure, CAS 472-15-1) ist die an C28 zur Carbonsäure oxidierte Form des Betulins. Betulinsäure wird ebenfalls in vielen höheren Pflanzen gebildet, allen voran in der Borke der Ahornblättrigen Platane *Platanus acerifolia* mit 3,3 Gew.-% in der Trockenmasse [12]. Weiterhin kommen größere Mengen an Betulinsäure in den Blättern von Rosmarin und Eukalyptus sowie ebenfalls in der Rinde von Birken vor [8]. Der Stoff lässt sich mittels wiederholter Umkristallisation relativ rein aus Platanenborkenextrakt gewinnen [13]. Daneben kann Betulinsäure auch teilsynthetisch mittels Jones-Oxidation und anschließender partieller

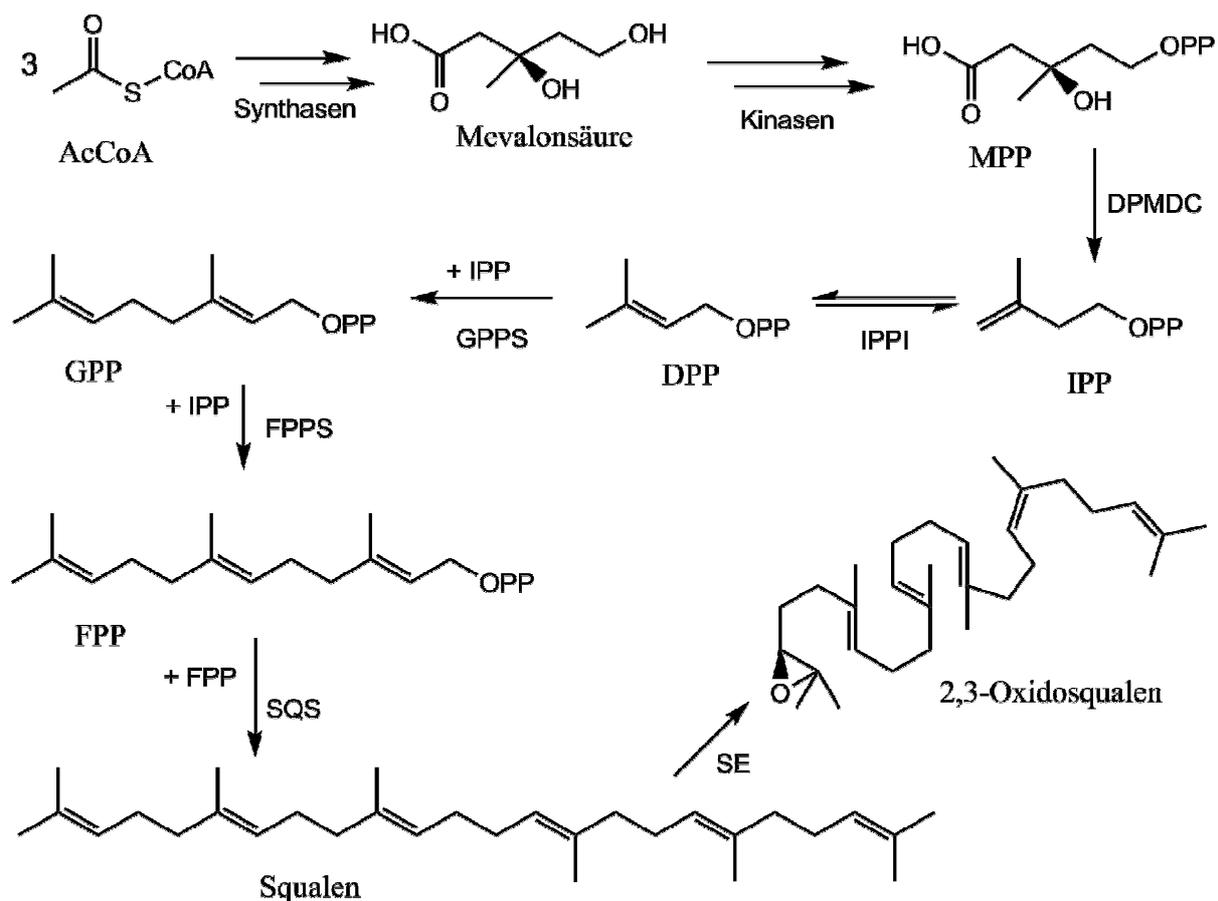


Abbildung 2: Biosynthese von Squalen. Zwischenprodukte: CoA - Coenzym A; MPP - Mevalonsäurediphosphat, IPP - Isopentenylidiphosphat, DPP - 3,3-Dimethylallyldiphosphat, GPP - Geranyldiphosphat, FPP - Farnesyldiphosphat. Enzyme: DPMDC - MPP-Decarboxylase, IPPI - IPP-DPP-Isomerase, GPPS - Geranyldiphosphat-Synthase, FPPS - Farnesyldiphosphat-Synthase, SQS - Squalensynthase, SE - Squalen-Epoxygenase.

Reduktion aus Betulin gewonnen werden [14]. Außerdem gibt es Anstrengungen den Stoff von genmodifizierten Mikroorganismen erzeugen zu lassen [15,16]. Pflanzen bilden diese – meist in der Rinde und anderen Außenflächen vorkommenden – Triterpene unter anderem zum Schutz gegen Wasser und Krankheitserreger [17].

Die Bildung von Betulin, Betulinsäure und Triterpenen allgemein erfolgt in der Pflanzenzelle schrittweise aus kleineren Kohlenstoffeinheiten. Den Anfang machen drei Moleküle Acetyl-CoA, deren Acetylgruppen über mehrere Zwischenstufen zu (*R*)-3,5-Dihydroxy-3-methylpentansäure (Mevalonsäure) verknüpft werden (Abb. 2). Über Kinasen wird die Mevalonsäure diphosphatiert und durch die Carboxylase DPMDC in Isopentenylidiphosphat (IPP) und schließlich sein Isomeres Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) überführt. DMAPP wird mit jeweils einem Molekül IPP zunächst zu Geranyldiphosphat (GPP), dann zu Farnesyldiphosphat (FPP) aufgebaut, und zwei FPP-Einheiten wiederum zum langkettigen Squalen (Abb. 2) [7,18]. Squalen wird 2,3-epoxidiert und mittels einer Oxidosqualen-Cyclase (OSC) wird eine kationische Zyklisierungskette angestoßen, die, von weiteren Cyclasen katalysiert, die Struktur des Triterpens aufbaut. Für Moleküle des Lupantyps endet diese Reaktion mit der Eliminierung eines Protons von C29 und

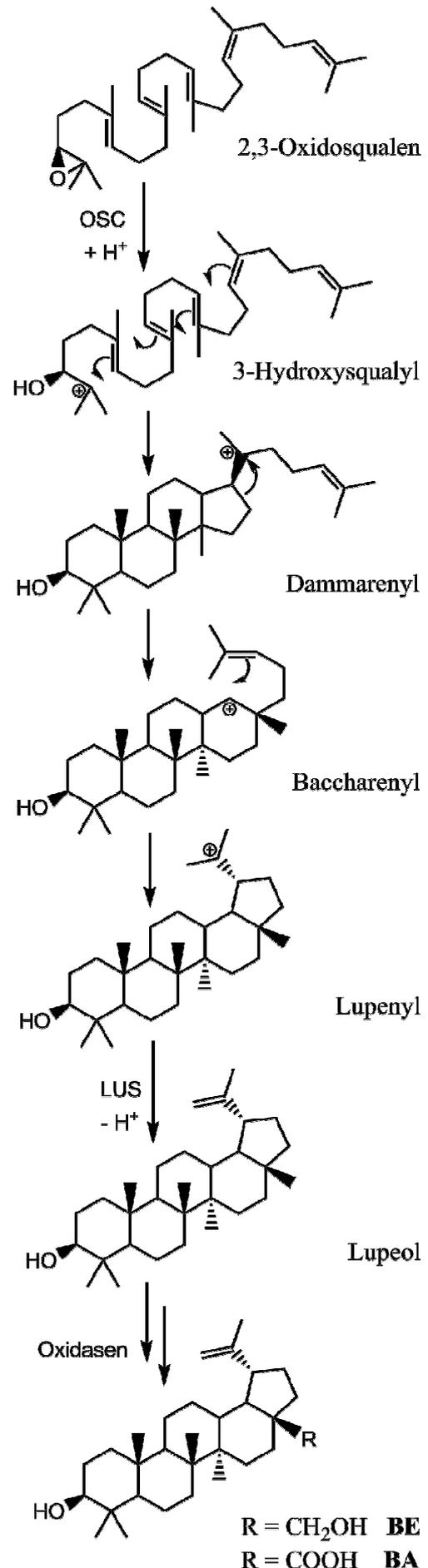


Abbildung 3: Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen zu Lupeol und anschließende Oxidation zu BE und BA. OSC – 2,3-Oxidosqualen-Cyclase, LUS – Lupen-Synthase.

der Bildung der 20(29)-Doppelbindung (Abb. 3) [19-21]. Das so entstandene Lupeol wird dann durch den Einfluss von Oxidasen zunächst zu Betulin umgewandelt und schließlich zu Betulinsäure oxidiert [22]. Zum Transport innerhalb der Pflanze werden die Triterpene glykosyliert [18].

Betulin, Betulinsäure und ihre Derivate zeigen, wie andere Triterpene auch, bemerkenswerte pharmakologische Eigenschaften [10,23-27]. Unter anderem wirken sie anti-HI-viral [28-30] und aktivitätshemmend gegenüber weiteren Virentypen [31,32], antimalarial [33,34], entzündungshemmend [35,36], und zeigen Aktivität gegen eine Vielzahl von Tumoren [37-42]. Die letztere Eigenschaft, die Antitumoraktivität, wird der Fokus dieser Arbeit sein.

Laut Statistischem Bundesamt waren „bösartige Neubildungen“ mit knapp 25% Gesamtanteil nach kardiovaskulären Krankheiten die zweithäufigste Todesursache in Deutschland im Jahr 2015 [43]. Schätzungen zufolge sind im Jahr 2018 weltweit etwa 18 Millionen Krebsneuerkrankungen aufgetreten und gut 9,5 Millionen Tode sind der Krankheit zuzuschreiben [44], was Krebs weltweit ebenfalls zur zweithäufigsten Todesursache macht [45]. Der Begriff Krebs bezeichnet im Allgemeinen ein breites Spektrum unterschiedlicher Krankheiten mit diversen Symptomen, Auftrittsorten und Prognosen [46]. Diese Krankheiten haben auf zellulärer Ebene allerdings eine kleine Gruppe von Eigenschaften gemeinsam, die von Hanahan und Weinberg als „Hallmarks of Cancer“ bezeichnet wird [47]:

1. Aufrechterhaltung von Proliferationssignalen, etwa durch Aktivierung zelleigener Signalpfade für die Herstellung von Wachstumsfaktoren [48,49], Abschaltung oder Suppression von negativen Rückkopplungsschleifen [49, 50] oder Stimulation des umliegenden Gewebes zur Bereitstellung von Wachstumsfaktoren [51, 52].
2. Umgehen von Wachstumssuppressoren, beispielsweise durch Inaktivierung oder Umprogrammierung des TGF- β -Signalpfades [53,54] oder Deregulierung der Zellkontaktinhibition [55].
3. Widerstand gegen Zelltodmechanismen, etwa durch Störung von Apoptose-signalpfaden [56] oder Induzierung von Autophagie durch Stressoren, wodurch

Tumorzellen sich in einen reversiblen, widerstandsfähigen Keimzustand zurückbilden [57-60]. Des Weiteren können nekrotische Zellen vom umliegenden Tumorgewebe missbraucht werden, indem sie Immunzellen anlocken, die Wachstumsfaktoren ausschütten [61,62].

4. Unbegrenzte Teilungsfähigkeit, meist durch Anstieg der Produktion von Telomerase und besonders ihrer Untereinheit TERT, welche einerseits das Telomer^a erweitert [63-65], andererseits auch Apoptose unterdrückt [66,67] und die Proliferation unterstützt [68,69].
5. Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, üblicherweise durch Aktivierung von VEGF-A [70-72], was zur Bildung vieler neuer, wenn auch unregelmäßiger und unvollständiger, Blutgefäße führt [73-75]. Auch Entzündungsreaktionen, die von tumorassoziierten Immunzellen ausgehen, können vaskulären Neubau fördern [76,77].
6. Invasion und Metastase, oftmals durch Modifikation der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), welche Gewebezellen in eine mobile Form überführt [78-82]. Tendenziell zeigen mesenchymale Zellen stammzellähnliche Eigenschaften, wodurch sie sich nach der Wanderung im umgebenden Gewebe einnisten und dort sowohl gegen die Immunabwehr des Körpers als auch gegen medizinische Therapien resistent sind [62,78,79,83].
7. Umprogrammierung der Energieversorgung der Zelle, etwa durch Hochregulierung der Expression des Glucosetransporters GLUT1, um den geringen Energiegewinn durch die anaerobe Glykolyse auszugleichen [84-86], oder durch die Umstellung auf ausgeschiedenem Lactat als Energiequelle [87-89].

^a Der Begriff „Telomer“ bezeichnet eine hexamere, sich wiederholende, nicht kodierende Basensequenz am Ende jedes DNS-Stranges, welche bei einer Zellteilung ein Stück weit abgeschnitten wird. Ist das Telomer vollständig abgebaut, kann die Zelle in einen nichtproliferativen Zustand (Seneszenz) eintreten oder, falls die Zelle sich weiterhin teilt, kann die mit dem fortschreitenden Abbau einhergehende Instabilität der DNS zu Apoptose führen [63,65].

8. Umgehen der Immunabwehr, durch Immunselektion der empfindlichen Tumorzellen, wodurch Zellen, die Resistenzen entwickelt haben, sich effektiver vermehren [90-92].

Jene phänotypischen Eigenschaften werden zum großen Teil durch zwei grundlegende Charakteristika ermöglicht: Zum Einen besitzen Krebszellen ein instabiles Genom, in welchem eine hohe Mutationsrate für eine schnelle Evolution des Tumors sorgt [93,94]. Insbesondere erbliche Krebserkrankungen gehen dabei auf anfängliche Mutationen in Genen für den DNS-Reparaturapparat der Zelle zurück. [94-96]. Zum Anderen rufen Erkrankungen wie Krebs Entzündungsreaktionen hervor [61,97]. Dabei infiltrieren Immunzellen das geschädigte Gewebe und schütten bioaktive Moleküle aus, unter anderem Wachstumsfaktoren oder Proteine, welche die Zelladhäsion beeinflussen [98]. Anstatt wie üblich die gesunden Zellen dazu anzuregen, das schadhafte Gewebe zu ersetzen, reagieren in diesem Fall die kranken Zellen selbst auf die Faktoren und vermehren sich umso mehr.

DNS-Instabilität, und damit Krebs, kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden. Einerseits gibt es interne Ursachen, denen die Zelle durch physiologische Prozesse innerhalb des Organismus unabwendbar ausgesetzt ist. Beispielsweise können bei der DNS-Replikation Fehlkombinationen zwischen Basenpaaren stattfinden, die DNS kann durch hydrolytische Vorgänge, reaktive Sauerstoffspezies oder Methylierung gespalten werden und einige Leukozyten setzen bei Entzündungen Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen frei, welche auch die DNS angreifen können [95]. Mehr noch als diese internen Faktoren zeichnen Umwelteinflüsse für die Entstehung von Krebs verantwortlich, etwa übermäßige Sonnenexposition, Tabakkonsum, Fehlernährung oder chronische Infektionen [61,99]. Ganz allgemein können die meisten Krebsarten auf eine Form von chronischer Entzündung zurückgeführt werden, welche die zuvor genannten Mechanismen in Gang setzt [61,99-101].

Die Antitumorwirkung von Betulinderivaten beruht darin, dass sie in der Krebszelle Apoptose induzieren. Sie depolarisieren die Außenmembran der Mitochondrien und sorgen so dafür, dass Cytochrom c und AIF aus dem mitochondriellen Zwischenmembranbereich ins Zytosol dringen und dort eine Caspasekaskade auslösen, die schließlich zum kontrollierten Zelltod führt [41,102-105]. Zusätzlich zur

Zytotoxizität gegen Krebszellen kann man Betulinsäure auch einen antiangiogenen Effekt nachweisen, welcher eine weitere Möglichkeit eröffnet, den Tumor zu schwächen [106].

Betulin und Triterpene allgemein haben also erstaunliche pharmakologische Eigenschaften. Warum werden sie dann nicht universell gegen Krebs und andere Krankheiten eingesetzt und immer noch Medikamente wie Doxorubicin, Antikörper oder Cis-Platin-Derivate verwendet, die teilweise schwere Nebenwirkungen haben [107-112]? Ein großer Nachteil der Triterpene, der verhindert, dass sie ohne Weiteres als Medikamente eingesetzt werden können, ist ihre recht mäßige Wirkung gegenüber malignen Zellen. Während beispielsweise die IC_{50} -Werte von Betulin und Betulinsäure gegenüber verschiedenen Krebszelllinien typischerweise im Bereich zwischen 1 und 10 μM liegen, wirkt das Interkalatin Doxorubicin bereits bei Konzentrationen zwischen 0.025 und 0.6 μM [113,114]. Auch die IC_{50} -Werte von Cisplatin liegen in vielen Fällen um 1 μM [115,116]. Für eine entsprechende Wirkung müsste man die Triterpene also höher konzentriert einsetzen. Allerdings ist die Wasserlöslichkeit dieser Substanzen durch das ausgedehnte Kohlenstoffgerüst sehr begrenzt (BE: 79 mg/L, BA: 44 mg/L [117]), was bei einem *In-vivo*-Einsatz dazu führen kann, dass sie für den Körper nutzlos oder sogar schädlich auskristallisieren.

Beide dieser Probleme lassen sich mittels gezielter Derivatisierung beheben – die Verbindung mit hydrophilen funktionellen Gruppen steigert die Wasserlöslichkeit und andere Seitenketten und Modifikationen am Triterpenmolekül beeinflussen die zytotoxische Wirkung der Substanzen sowie ihr Kristallisationsverhalten [118-123]. Verschiedene Betulinderivate sind unterschiedlich selektiv gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien [124,125], was heißt, dass man Betulinderivate präzise für die jeweilige Krebsart synthetisieren kann, um ihr Wirkpotential zu maximieren. Es lassen sich Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermitteln, mit denen sich flächendeckende Aussagen zur Effektivität bestimmter Derivattypen auf bestimmte Krebsarten oder auf Tumoren im Allgemeinen formulieren lassen.

1.2 Carboanhydrasen und Sulfonamide

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Wirkung von Sulfonamiden auf das Enzym α -Carboanhydrase (CA, EC 4.2.1.1). Dieses Enzym kommt in den Zellen vieler Gewebetypen in nahezu allen Tierarten sowie in Pflanzen und einigen Einzellern vor [126,127]. Der CA wird die Aufgabe zuteil, im Zytosol oder in der extrazellulären Flüssigkeit gelöstes Kohlendioxid zusammen mit Wasser über eine Kohlensäure-Zwischenstufe in Hydrogencarbonationen und Protonen umzuwandeln – oder umgekehrt (Abb. 4) [128]. Dabei ist die Carboanhydrase eines der schnellsten bekannten Enzyme, mit einer Reaktionsrate von bis zu 10^6 s^{-1} für die Isoform CA II [129]. Die Umwandlung der beiden Stoffe ineinander dient einerseits der Regulation des pH-Werts innerhalb sowie außerhalb der Zelle, andererseits ist Hydrogencarbonat für die Zellapparate kontrollierter zu transportieren [130,131].

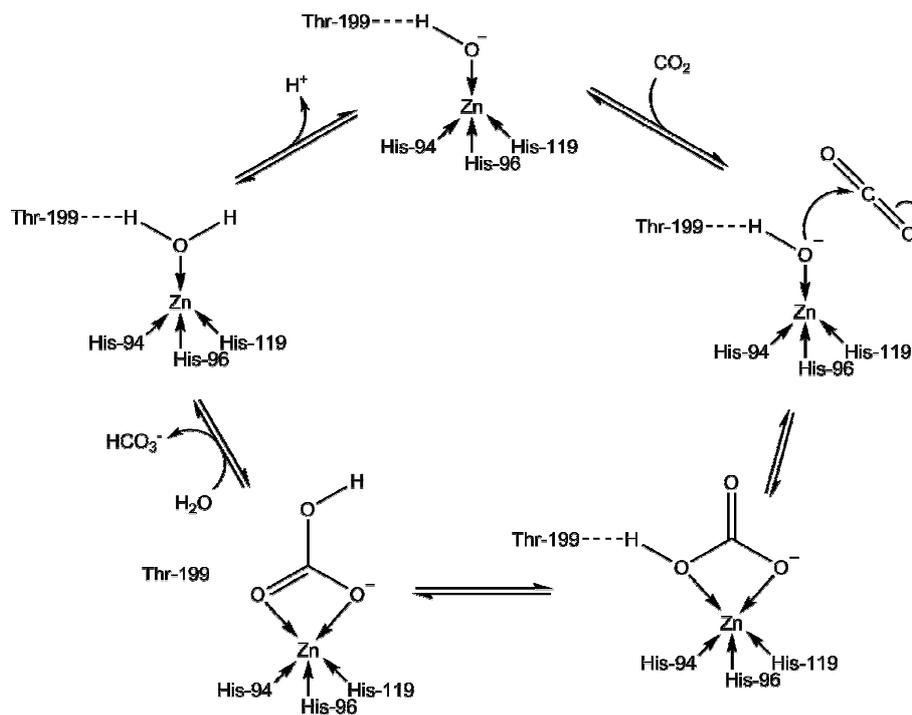


Abbildung 4: Reaktionsschema der Umwandlung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat in der Carboanhydrase [132].

Die reversible Katalyse zwischen Kohlendioxid und Hydrogencarbonat findet an einem Zinkion im Zentrum des Enzyms statt, das über Stickstoffligandstellen an drei Histidinreste gebunden ist. Eine vierte Koordinationsstelle im aktiven Zinkkomplex wird von einem Hydroxidion besetzt, welches über eine Wasserstoffbrücke zu einem

benachbarten Threoninrest stabilisiert wird (Abb. 4, oben) [133]. Die Umsetzung mit Kohlendioxid erfolgt über einen nukleophilen Angriff durch das Hydroxidion, welches das Kohlendioxid in Form von Hydrogencarbonat zunächst an das Zinkion koordiniert. Das so gebildete Anion wird durch ein Wassermolekül verdrängt, welches schließlich ein Proton abgibt, um als Hydroxidion das Enzym erneut zu aktivieren [132]. Die entsprechende Rückreaktion findet in umgekehrter Reihenfolge statt.

In höheren Wirbeltieren sind 16 verschiedene Isoformen der α -Carboanhydrase bekannt [126,134], von denen drei – die carboanhydrase-verwandten Proteine (CARP) VIII, X und XI – mangels eines Zink-Kofaktors inaktiv sind [135,136]. Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer großräumigen Struktur sowie in ihrer Position innerhalb der Zelle – einige sind im Zytosol gelöst, andere membrangebunden [137,138]. Die Isozyme

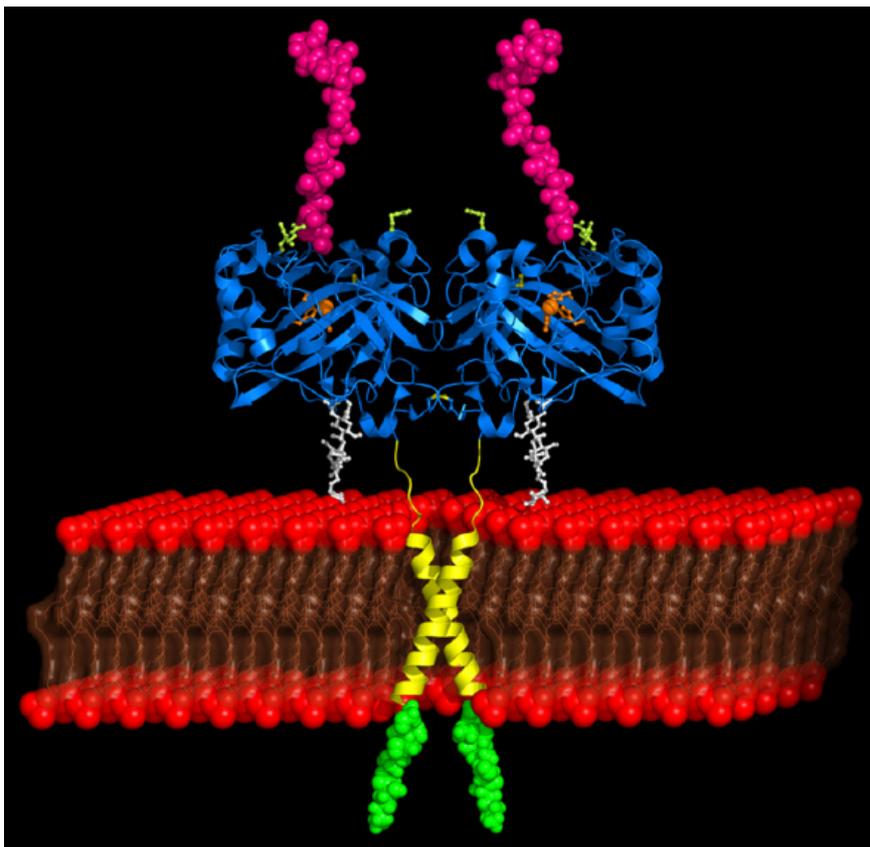


Abbildung 5: Ein Modellvorschlag des Proteinkomplexdimers der humanen CA IX. Die katalytische Domäne ist in blau wiedergegeben, mit einigen besonderen Gruppen und Seitenketten farblich abgesetzt (grün: Arg-58, Arg-60 und Arg-130; weiß: Glykanrest). Der unmittelbare Metallkomplex ist in orange dargestellt. Magenta, gelb und grün markieren die proteoglykanartige Domäne, einen helikalen transmembranen Abschnitt bzw. einen intrazytosolen Abschnitt. Die Zellmembran ist in braun und rot dargestellt; die katalytische Domäne befindet sich auf der Außenseite. Die Abbildung ist [140] entnommen.

VA und VB kommen in Mitochondrien vor und die Variante VI wird mit dem Speichel ausgeschieden [126,134,136]. Diese Arbeit legt ihren Fokus auf die humane, membrangebundene Isoform IX, welche sowohl eine hohe katalytische Aktivität als auch eine hohe Affinität gegenüber Sulfonamiden zeigt [126,139].

CA IX unterscheidet sich – neben ihrer membranverankerten Position mit extrazellulärem katalytischen Zentrum – in weiteren Eigenschaften von anderen Isoformen [84,141]. Wesentlich für diese Arbeit ist dabei, dass Isoform IX zum großen Teil nur unter hypoxischen Bedingungen exprimiert sowie aktiviert wird [139,142]. Da solide Tumoren aufgrund unzureichender Durchblutung und des schnellen Zellstoffwechsels tendenziell wenig Sauerstoff zur Verfügung haben, stellt sich im malignen Geschwür oft Hypoxie ein, was zusammen mit deren Folgen gemeinhin als „Warburg-Effekt“ bekannt ist [84,143-146]. Durch den Sauerstoffmangel im Zytosol sammelt sich das ansonsten bei Normoxie abgebaute Protein HIF-1 α an und kann den Zellkern erreichen [147]. Dort regt es, im Konjugat mit dem Faktor HIF-1 β , die Auslesung von verschiedenen Genen an, welche unter anderem angiogenetische Faktoren wie VEGF, Proteine für Glykolyse sowie CA IX und XII kodieren [84,142,148,149]. Mittels VEGF gebildete Blutgefäße neigen zu Fehlbildungen und erhöhter Permeabilität, was zusätzlich zum hohen Flüssigkeitsdruck innerhalb des Tumorgewebes sowohl die Versorgung mit Sauerstoff erschwert, als auch verhindert, dass Arzneistoffe aus der Blutbahn ins Gewebe vordringen können [75,150]. Durch die Überexpression der Glucosetransporter GLUT1-3 einerseits und die Unterversorgung mit Sauerstoff andererseits kann die Krebszelle ihren Energiebedarf nicht mehr durch die übliche oxidative Phosphorylierung von Glucose decken, welche bei der Umsetzung von 1 mol Glucose zu Kohlendioxid und Wasser 36 mol ATP ergibt. Stattdessen wird die anaerobe Glykolyse genutzt, wobei jedes Mol Glucose, das in diesem Fall zu Milchsäure umgesetzt wird, nur 2 mol ATP erbringt [46]. Der Senkung des pH-Werts im Zytosol durch die Fermentierung zu Milchsäure wird entgegengewirkt, indem Protonen gemeinsam mit dem entstandenen Lactat über MCT4-Ionenpumpen in den extrazellulären Raum ausgeschieden werden [130]. Auch die Expression von MCT4 wird von HIF-1 gesteuert [151]. Durch den permanenten Sauerstoffmangel werden schließlich auch die Mitochondrien beschädigt [152,153], wodurch die Tumorzellen unfähig zur oxidativen Phosphorylierung werden. Selbst wenn eine ausreichende Sauerstoffzufuhr wiederhergestellt wird, scheiden die Zellen weiterhin Lactat als

Fermentationsprodukt aus; dies ist die phänotypische Eigenschaft, die Otto Warburg an Krebszellen beschrieben hat [146, 154-156].

Die Aufgabe der – ebenfalls überexprimierten – Carboanhydrase IX ist es nun, einer Übersäuerung der extrazellulären Flüssigkeit durch die Stoffwechselprodukte vorzubeugen und überschüssige Protonen mithilfe von gelöstem Hydrogencarbonat zu neutralisieren. Durch diese Stabilisierung des pH-Werts des Tumorgewebes können die Krebszellen trotz ihres abnormalen Stoffwechsels unter moderaten Bedingungen überleben. Solche hypoxischen Tumoren sind im Allgemeinen schwer zu behandeln, da sie zum Einen oft tief im Elterngewebe verankert sind, was eine operative Entfernung riskant und oft unzureichend macht. Zum Anderen verhindert der Mangel an Sauerstoff, wodurch sich keine reaktiven Sauerstoffspezies bilden können, sowie die Gegenwart von HIF-1 eine effektive Radiotherapie [157-160]. Es ergibt sich ein möglicher Angriffspunkt für die Krebstherapie: Man kann die Umsetzung der Protonen durch eine gezielte Inhibierung des Enzyms unterbinden, so den pH-Wert im Gewebe senken und damit den Tumor schwächen [143].

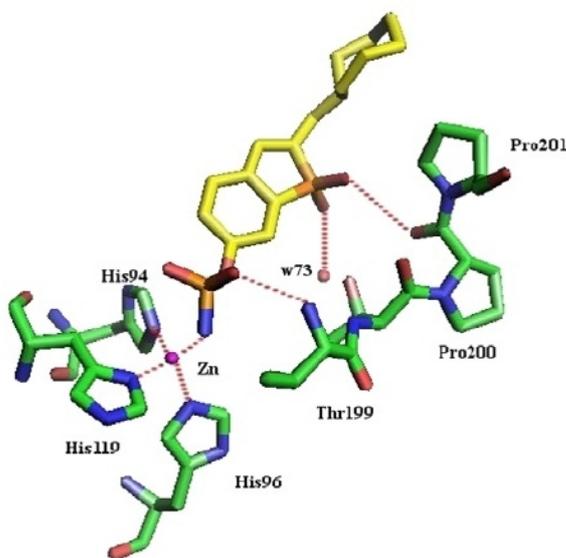


Abbildung 6: Koordination eines Sulfonamids (gelb) an das katalytische Zinkzentrum einer Carboanhydrase. Das Bild wurde [164] entnommen.

Sulfonamide $RSO_2NR'R''$ zeigen in vielen Fällen eine gute inhibitorische Wirkung gegen Carboanhydrasen [126,161,162]. Dabei binden sie koordinativ an das enzymatische Zinkzentrum und verdrängen das Hydroxidion, weswegen das Enzym nicht mehr in seine aktive Form übergehen kann (Abb. 6) [163-165]. Die Carboanhydrase verliert dadurch ihre Fähigkeit zur Umsetzung von Kohlendioxid und damit zur Regulation des pH-Wertes im extrazellulären Gewebe sowie innerhalb der Zelle. Dies

führt zu einer Übersäuerung des Tumors und eröffnet bessere Möglichkeiten zur Behandlung, beispielsweise eben mit Betulinderivaten. Es konnte gezeigt werden, dass Betulinsäure unter hypoxischen Bedingungen gegen maligne Gliome effektiver wirkt als

unter normaler Sauerstoffversorgung [166,167]. Des Weiteren unterdrückt Betulinsäure die Expression von HIF-1 α und VEGF in endometrialen Adenokarzinomen [168].

Als Beispiele für hochaffine sulfonamidbasierte Inhibitoren der CA IX seien Acetazolamid ($K_i = 25$ nM), Methazolamid ($K_i = 27$ nM), Dichlorophenamid ($K_i = 50$ nM) und SLC-0111 ($K_i = 45$ nM) genannt [161,169], von welchen Letzteres bereits Teil einer klinischen Phase-1-Studie war [170].

2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Substanzen zu entwickeln, die Tumoren über zwei verschiedene Wege angreifen: Einerseits wird die zellmembranständige Carboanhydrase IX blockiert, um deren pH-ausgleichende Wirkung zu unterbinden, andererseits soll ein Teil des Stoffes in die so geschwächte Zelle eindringen und dort Apoptose auslösen. Zu diesem Zweck werden Wirkstoffe synthetisiert, deren Molekülstruktur sowohl eine Sulfonamidgruppe als auch einen Betulinrest beinhaltet, welche mit einem esterhaltigen Spacer verbunden sind. Ein solcher kombinierter Wirkstoff soll als Prodrug mit seinem endständigen Sulfonamidrest dabei an das zentrale Zinkion der CA IX anbinden und das Enzym so inhibieren. Währenddessen wird der Spacer durch die esterspaltende Wirkung der CAs [171,172] oder anderer extrazellulärer Carboxylesterasen [173] abgebaut und gibt das Betulinderivat frei (Abb. 7). Letzteres kann anschließend in die Zelle dringen und dort Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran freisetzen, was schließlich den programmierten Zelltod in Gang setzt. Hierbei ist der niedrige pH-Wert im Tumorgewebe von Nutzen, da er die zytotoxische Wirkung von Betulinderivaten erhöht [174,175]. Vergleichsstudien mit den Einzelkomponenten – einem Betulinderivat

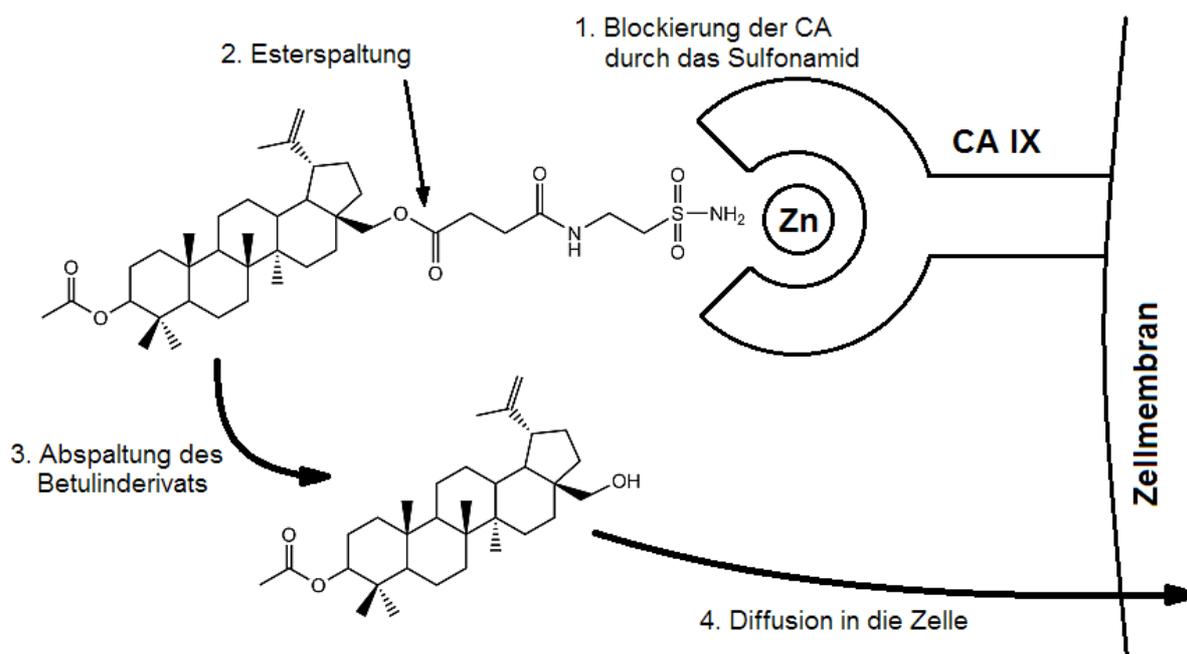


Abbildung 7: Schema der erwarteten Wirkung eines Betulinsulfamats auf eine Tumorzelle mit exprimierter CA IX am Beispiel von Substanz 30.

und einem Sulfonamid – sollen Klarheit über die Effektivität solch eines kombinierten Moleküls bringen.

Die synthetisierten Moleküle werden mittels SRB-Assay auf ihren zytotoxischen Effekt gegen verschieden Tumorzelllinien untersucht. Kooperationspartner führen weitere Tests mit ausgewählten Substanzen durch, wie die Untersuchung der Zytotoxizität unter hypoxischen Bedingungen oder Tests zur Strahlensensitivierung.

In dieser Dissertation wird zunächst den Verlauf der Synthesen der verschiedenen Substanzen beschrieben und einige Ergebnisse der chemischen Analysen erläutert. Es schließt sich eine Diskussion über Inhibierungsversuche an Carboanhydrasen und Zytotoxizitätstests an Krebszellen an, bevor die Ergebnisse zusammengefasst und Struktur-Wirkungs-Korrelationen umrissen werden. Zum Schluss folgt ein Teil mit detaillierten Methoden zu den durchgeführten Synthesen.

3. Chemische Synthesen und Analysen

3.1 Sulfamate

Zunächst wurden einige Sulfamate der Form ROSO_2NH_2 synthetisiert, wobei R einen Betulinderivatrest repräsentiert. Die Synthese selbst ist simpel – der entsprechende Alkohol wird mit Sulfamylchlorid ClSO_2NH_2 in Dimethylacetamid (DMA) umgesetzt [176,177]. Das hydrolyseempfindliche und korrosive Sulfamylchlorid selbst wird durch die Reaktion von Chlorsulfurylisocyanat ClSO_2NCO mit Ameisensäure gewonnen (Abb. 8) [178].

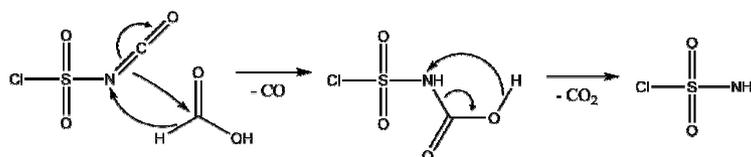


Abbildung 8: Abbau von Chlorsulfurylisocyanat zu Sulfamylchlorid [179].

Bei der Umsetzung von Betulinderivaten zu den entsprechenden Sulfamaten wird DMA gegenüber dem bei diesem Reaktionstypen sonst üblichen DMF bevorzugt, um die Bildung von Lösungsmitteladdukten zu verhindern [180]. Mit dieser Methode wurden die einfach substituierten Sulfamate **5**, **7**, **10** und **11**, die gemischtsubstituierten Carbamat-Sulfamate **8** und **9**, das Disulfamat **6** sowie die betulinfreien Vergleichssubstanzen **12** und **13** erhalten (Abb. 9-13). Die letzten drei Substanzen sind bereits aus der Literatur bekannt und auf ihre enzyminhibierenden Fähigkeiten untersucht, wobei sie durchweg gute Werte zeigen [176,181].

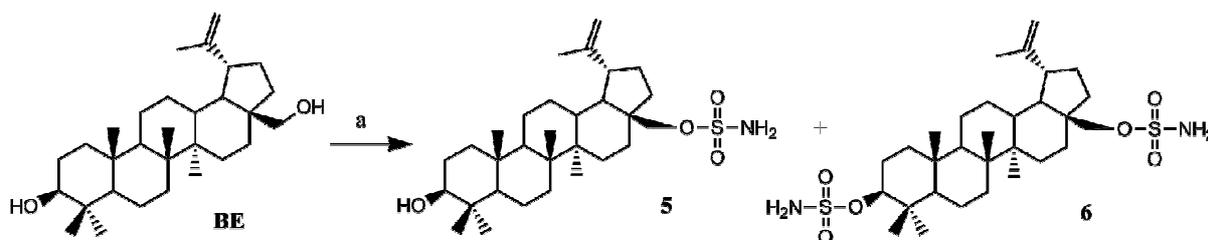


Abbildung 9: Syntheschema für die Betulinsulfamate **5** und **6**. a: 1. ClSO_2NH_2 , DMA; 2. H_2O .

Die Herstellung von **5** und **6** erfolgt durch die Umsetzung von Betulin mit den jeweiligen stöchiometrischen Mengen an Sulfamylchlorid. Über Säulenchromatografie lässt sich das dabei entstehende Gemisch in drei Phasen trennen: Das Disulfamat **6**, das Monosulfamat **5**, und nicht umgesetztes Betulin. Hierbei stellt **5** ebenfalls ein Gemisch dar, bestehend aus 28-*O*-Sulfamylbetulin und dem hier nicht gezeigten 3-*O*-Sulfamylbetulin, welches bei der Reaktion in geringerer Menge anfällt (NMR-Messungen zufolge etwa 15% der Gesamtmenge an Monosulfamat). **5** und **6** sind blassgelbe Feststoffe, wobei **5** als kristallines Pulver anfällt und **6** interessanterweise einen amorphen Schaum bildet.

Bei der chemischen Analyse der Sulfamate **5** und **6** kann man im NMR-Spektrum sehr gut die Substitution der funktionellen Gruppen erkennen und sie sogar nach den beiden Substitutionsstellen im Betulin unterscheiden, was bei der Analyse von komplexeren Verbindungen hilft (Tab. 1).

Tabelle 1: Ausgewählte NMR-Daten von Betulin, **5** und **6**, welche die Änderung der chemischen Verschiebung abhängig vom Substituenten zeigen. Verschiebungen sind als δ -Wert in ppm angegeben.

* Das entsprechende ^1H -Signal wird vom HDO-Signal überlagert.

| BE | 5 | 6 | Zuordnung |
|------------|---|---|-----------------------|
| 4.23 (-OH) | * (-OH) | 7.31 (-OSO ₂ NH ₂) | H im 3-Substituenten |
| 4.19 (-OH) | 7.39 (-OSO ₂ NH ₂) | 7.40 (-OSO ₂ NH ₂) | H im 28-Substituenten |
| 2.95 | 2.96 | 3.97 | H3 |
| 3.50; 3.06 | 4.11; 3.74 | 4.11; 3.74 | H28 |
| 77.2 | 77.2 | 88.1 | C3 |
| 58.4 | 67.8 | 67.8 | C28 |

Es ist zu erkennen, dass sowohl das jeweilige Kohlenstoffatom, an dem die Substitution stattfindet, sowie die daran gebundenen Wasserstoffatome bei der Veresterung zum Sulfonamid deutliche Tieffeldverschiebungen erfahren. *H3* wird dabei um etwa 1.0 ppm, die *H28*-Atome jeweils um etwa 1.6 bis 1.7 ppm verschoben. Gleichwohl erfahren die Kohlenstoffatome *C3* und *C28* Verschiebungen um 10.9 ppm bzw. 9.4 ppm bei der Reaktion.

Dieselbe Synthese kann auch ausgehend von der Betulinsäure durchgeführt werden, was das Monosulfamat **7** ergibt (Abb. 10).

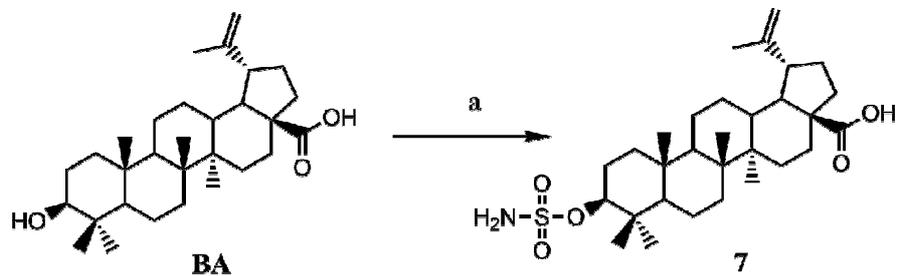


Abbildung 10: Syntheschema für das Betulinsäuresulfamat **7**. a: 1. ClSO_2NH_2 , DMA; 2. H_2O .

Tabelle 2: Einige NMR-Daten von Betulinsäure und ihrem Sulfamat **7**. Verschiebungen sind als δ -Wert in ppm angegeben.

| BA | 7 | Zuordnung |
|------------|---|--------------------|
| 4.24 (-OH) | 7.30 (-OSO ₂ NH ₂) | H im Substituenten |
| 2.94 | 3.97 | H3 |
| 77.2 | 88.1 | C3 |

Bei der Umsetzung von Betulinsäure zu **7** werden, wie schon zuvor, die Resonanzen des Kohlenstoffatoms *C3* sowie des daran geknüpften *H3* durch den Elektronenreichtum in der Sulfamatgruppe stark ins tiefe Feld verschoben (Tab. 2).

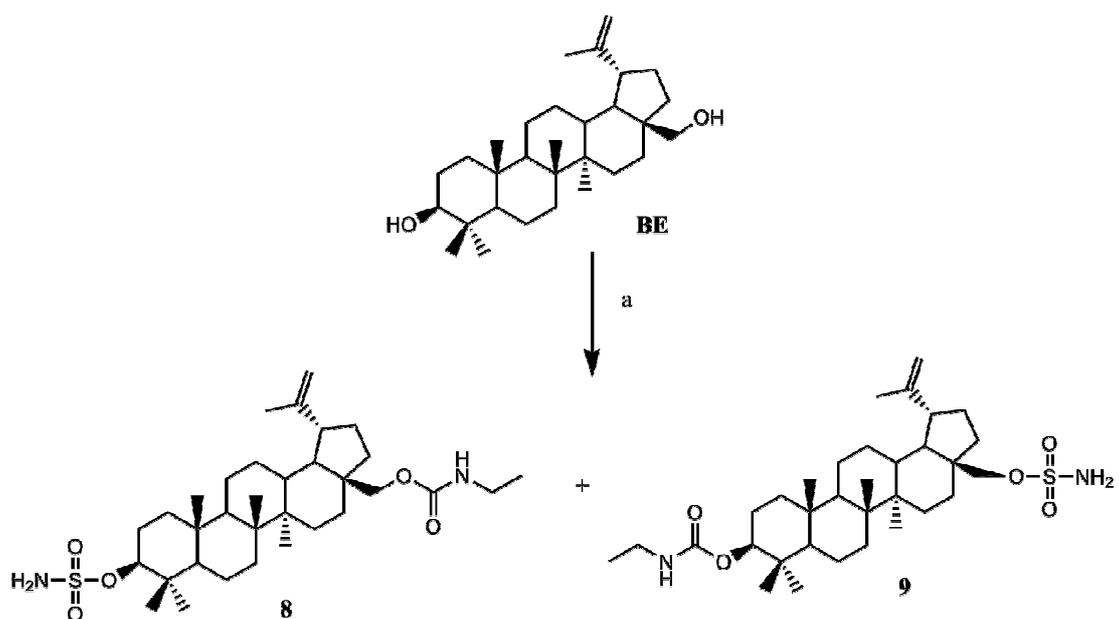


Abbildung 11: Syntheschema für die Betulinicarbamat-Sulfamate **8** und **9**. a: 1. EtNCO , CHCl_3 ; 2. H_2O ; 3. ClSO_2NH_2 , DMA; 4. H_2O .

Die Carbamat-Sulfamate **8** und **9** werden synthetisiert, indem Betulin zunächst mit Ethylisocyanat umgesetzt wird und das entstehende Produktgemisch aus Monocarbamaten – welches sich chromatografisch nur schwer trennen lässt – wieder mit Sulfamylchlorid zur Reaktion gebracht wird (Abb. 11). Ethylcarbamat wurde hier als Zweitsubstituent gewählt, da aus der Literatur bekannt ist, dass diese Gruppen die zytotoxische Wirkung von Betulin erhöhen [182].

Tabelle 3: ¹H-NMR-Verschiebungen in den Substituenten der Verbindungen **8** und **9** im Vergleich mit dem Disulfamat **6** und Bis(ethylcarbamy)betulin BECB. Verschiebungen sind als δ -Wert in ppm angegeben.

| Substituent und Aufspaltung | H3 | H28 |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| -SO ₂ NH ₂ (s) | 7.31 (6) | 7.40 (6) |
| | 7.30 (8) | 7.38 (9) |
| -CONHEt (t) | 6.88 (BECB) | 7.00 (BECB) |
| | 6.88 (9) | 6.98 (8) |

Die beiden Isomere lassen sich im ¹H-NMR-Spektrum anhand der Verschiebungen der Aminogruppen in ihren jeweiligen Substituenten unterscheiden, was wegen der ähnlichen Polarität der Moleküle und dem damit unklaren Unterschied der Retentionszeiten in der Chromatografie von Nutzen ist (Tab. 3). Dabei unterscheiden sich die Verschiebungen der NH-Gruppe des Ethylcarbamatrests um 0.10 ppm je nach Substitutionsstelle. Die Verschiebungen der NH₂-Gruppe im Sulfamatrest zeigen eine Differenz von 0.08 ppm, wie auch schon so ähnlich im Disulfamat **6**.

Alle weiteren Verbindungen, die von Betulin ausgehen, wurden der Handhabbarkeit halber nur an jeweils einer der Angriffsstellen substituiert – entweder an *C3* oder an *C28*. Die jeweils andere Seite wurde durch Veresterung zum Acetat chemisch geschützt. Somit sind die Betulinmonoacetate **1** und **3** die Ausgangsstoffe für die Synthese der Verbindungen **10**, **11** und **14-34**. Die Betulinacetate **1** und **2** werden hergestellt, indem Betulin mit Essigsäureanhydrid unter Eiskühlung in Dichlormethan umgesetzt wird. Das Diacetat **2** kann dabei mithilfe von Calciumhydrid in einer Methanol-THF-Suspension wieder selektiv zu **3** verseift werden [183]. Die Monoacetate werden nun, wie gehabt, mit Sulfamylchlorid zu **10** und **11** umgesetzt (Abb. 12).

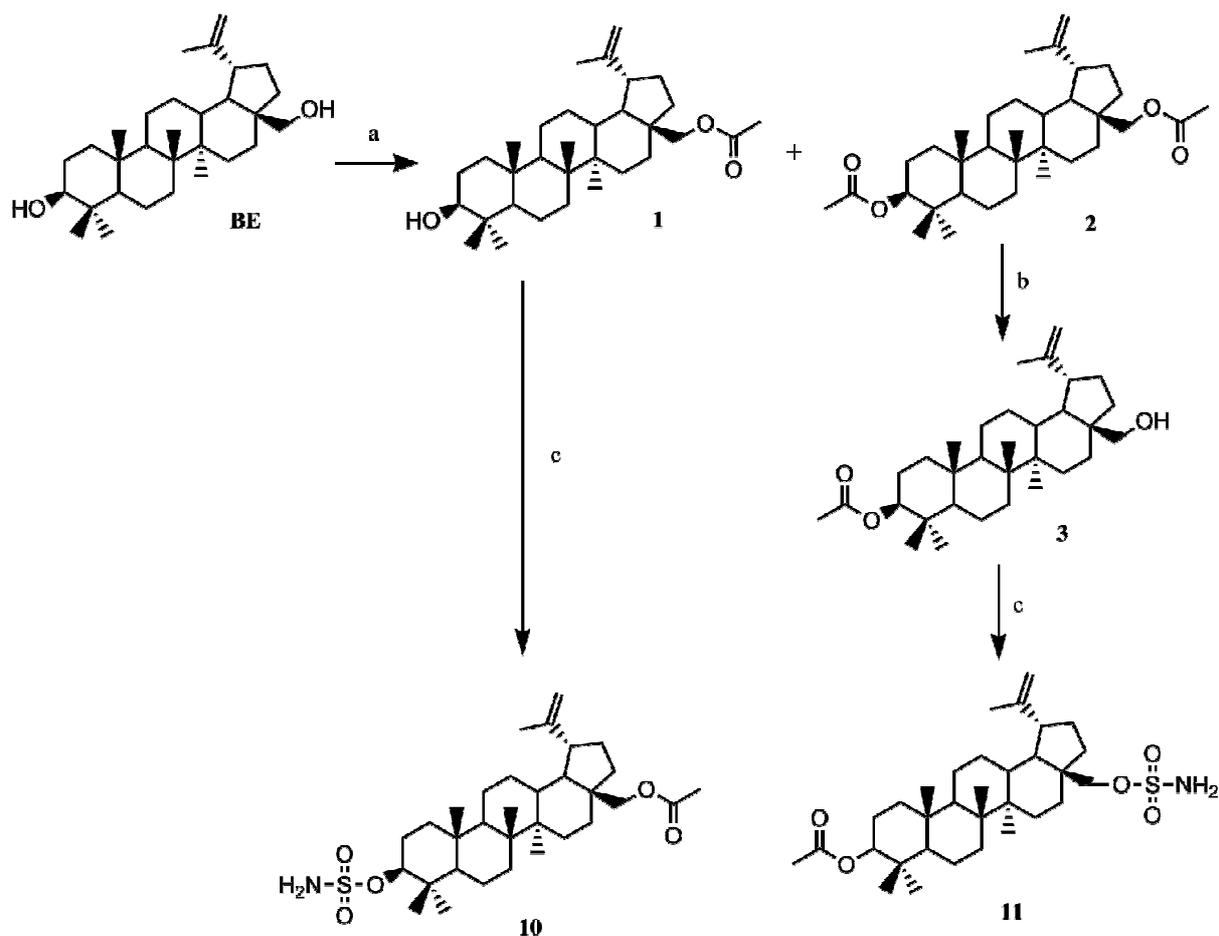


Abbildung 12: Syntheschema für die Betulinacetate **1-3** und die daraus hergestellten Sulfamate **10** und **11**. **a:** 1. Ac₂O, DCM, DMAP, Et₃N, 0 °C; 2. Na₂CO₃, H₂O. **b:** 1. CaH₂, MeOH, THF; 2. H₂O. **c:** 1. ClSO₂NH₂, DMA; 2. H₂O.

Während die Acetylbetuline **1-3** bevorzugt Kristalle bilden, fallen deren Sulfamate **10** und **11** als amorphe Schäume an. Dies mag zum Einen am Unvermögen dieser doppelt substituierten Betulinderivate liegen, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Zum Anderen können die relativ großen, tetraedrischen Sulfamatgruppen (S-O: 1.70 Å; S=O: 1.44 Å; S-N: 1.77 Å [184,185]) verhindern, dass sich die Moleküle bequem in Schichten anordnen können, wie sie es beispielsweise im Kristall von **2** tun [186].

Zum Vergleich mit den Literaturangaben zur CA-inhibierenden Wirkung wurden auch die Sulfamate von 1,8-Octandiol (**12**) und von 1-Octanol (**13**) synthetisiert (Abb. 13) [176,181]. Auch bei diesen Verbindungen kann dieselbe Methode der Umsetzung des Alkohols mit Sulfamylchlorid in DMA verwendet werden.

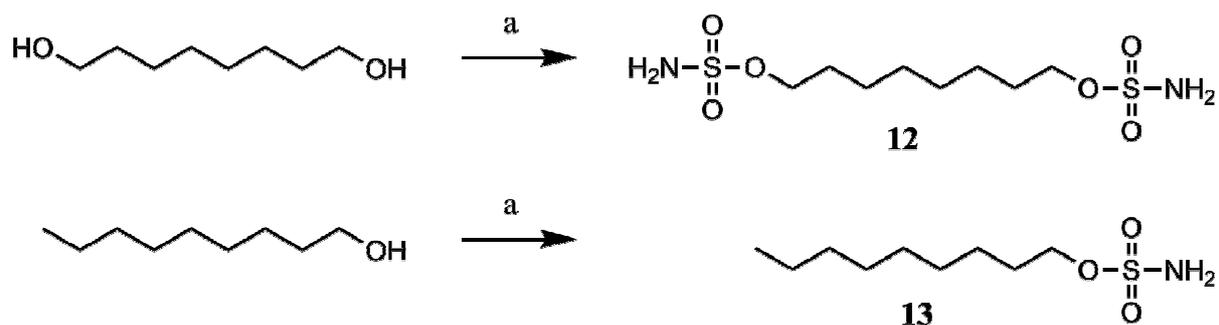


Abbildung 13: Syntheschema für die Octylsulfamate **12** und **13**. a: 1. ClSO₂NH₂, DMA; 2. H₂O.

Ausgehend von den guten K_i-Werten, die die langkettigen Verbindungen **12** und **13** in der Literatur zeigen, sollten in Anlehnung an deren Strukturen weitere Betulinverbindungen mit Spacergruppen zwischen dem Triterpen und der Sulfamatgruppe synthetisiert werden. Ein leicht zugänglicher solcher Spacer ist Bernsteinsäure, womit das Betulin zunächst zum Hemisuccinat erweitert wird [187-189]. Dazu wird Bernsteinsäureanhydrid zusammen mit dem Acetylbetulin in Pyridin unter Rückfluss gekocht [190,191]. Da die Reaktion zum Sulfamat das Vorhandensein einer Hydroxyl-

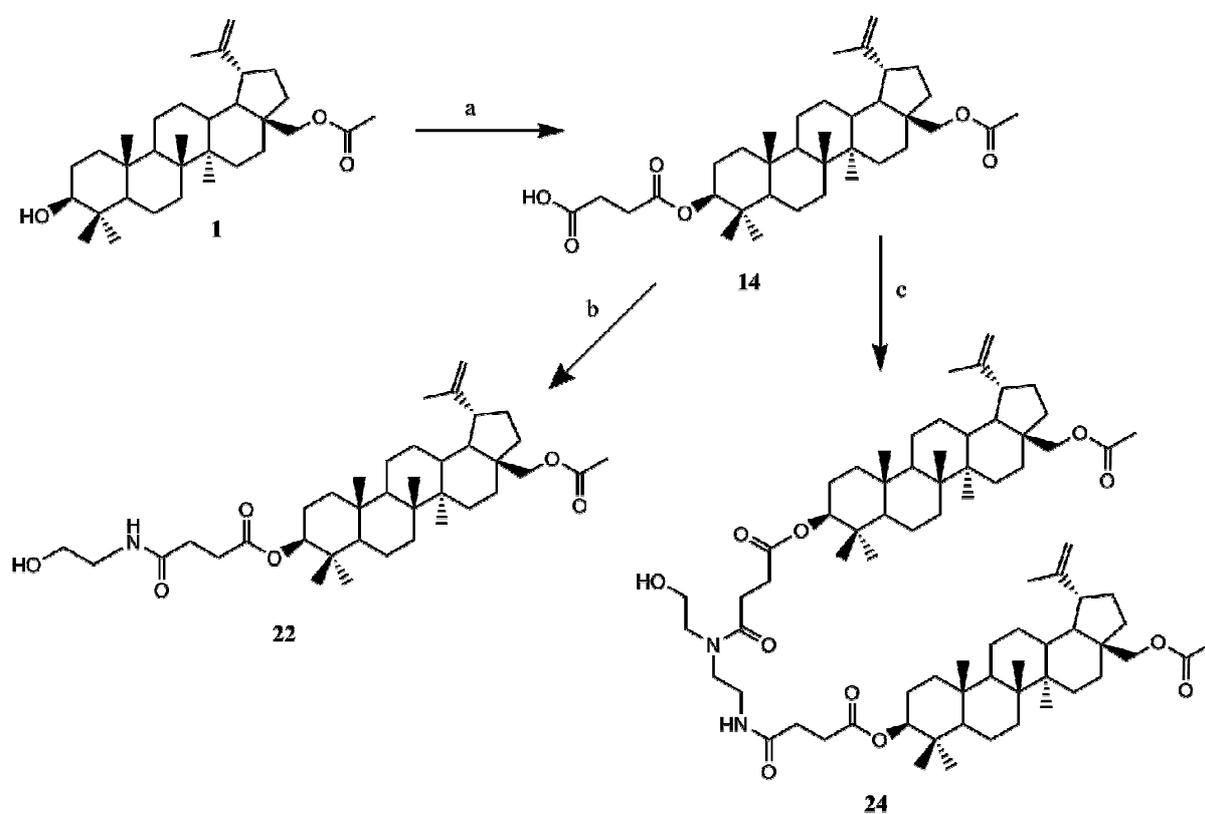


Abbildung 14: Syntheschema für das Betulinhemisuccinat **14** und die daraus hergestellten Amidalkohole **22** und **24**. a: 1. Bernsteinsäureanhydrid, DMAP, Pyridin, Rückfluss; 2. H₂O. b: 1. HOBT, DMF; 2. HATU; 3. HOCH₂CH₂NH₂; 4. H₂O. c: 1. HOBT, DMF; 2. HATU; 3. HOCH₂CH₂NHCH₂CH₂NH₂; 4. H₂O.

gruppe erfordert, wurde eine zweistufige Reaktion gewählt, in der das Hemisuccinat mit Aminoethanol zum entsprechenden Hydroxyethylamid umgesetzt wird. Die beiden Teile dieses Spacers – Succinat und Aminoalkohol – ließen sich dann beliebig durch Homologe und andere geeignete Moleküle austauschen, um eine Vielzahl von Strukturen systematisch zu entwickeln. Zunächst wurden für diesen Zweck die Hemisuccinate **14** und **18** und, von diesen ausgehend, die erweiterten Alkohole **22** und **23** (mit Aminoethanol) sowie **24** und **25** (mit Aminoethylaminoethanol) synthetisiert (Abb. 14, 16). Die zwei letztgenannten Verbindungen zeigen dabei allerdings nicht den erwarteten linearen Molekülaufbau. Stattdessen knüpfte sich bei diesen Substanzen jeweils ein weiteres Hemisuccinat an das zentrale, sekundäre Stickstoffatom des Aminoalkohols. Nichtsdestoweniger sind beide Substanzen immer noch dafür geeignet, eine Sulfamatgruppe zu binden, besonders im Anbetracht dessen, dass die ansonsten freie sekundäre Aminogruppe ebenfalls Sulfonsäuren zu binden vermag. In diesem Fall würde ein Diaminosulfon $RR'NSO_2NH_2$ statt eines Sulfamats entstehen. Eine solche Reaktion wäre dem Zweck dieser Arbeit allerdings nicht abträglich, denn solche Diaminosulfone zeigen ebenfalls eine inhibierende Wirkung gegenüber Carboanhydrasen [192-194].

Als Kopplungsreagenz wurde die aus der Peptidsynthese bekannte Kombination aus 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und dem Aminiumsalz HATU verwendet [195-197]. Diese ist mit teilweise über 90% Ausbeute sehr effizient sowie selektiv gegenüber der

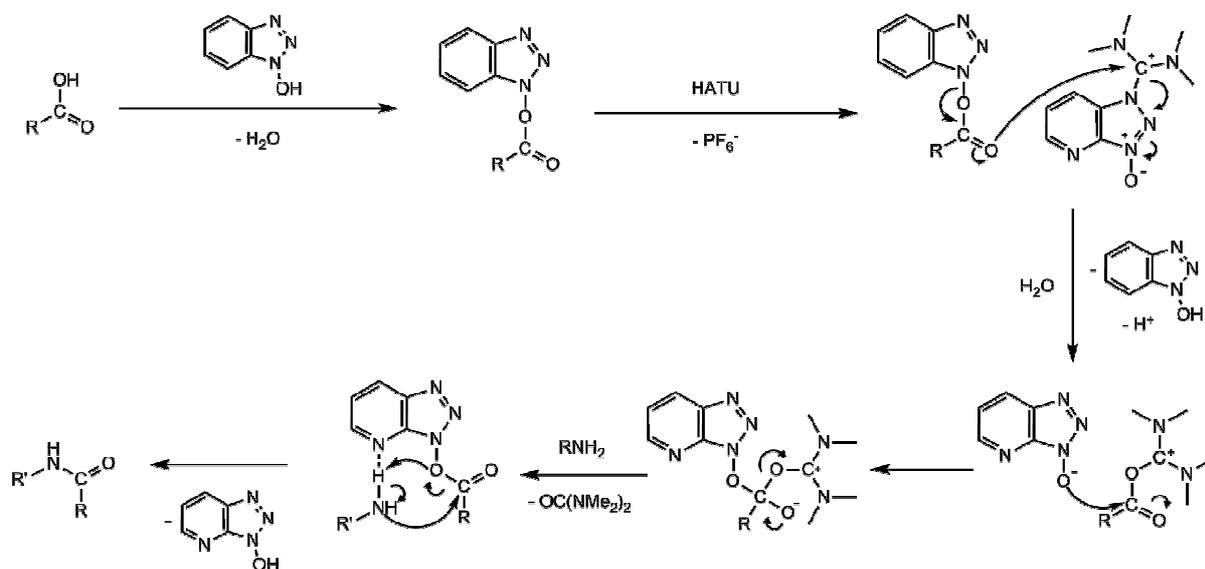


Abbildung 15: Mechanismus der HOBt/HATU-Kopplung [196, 198].

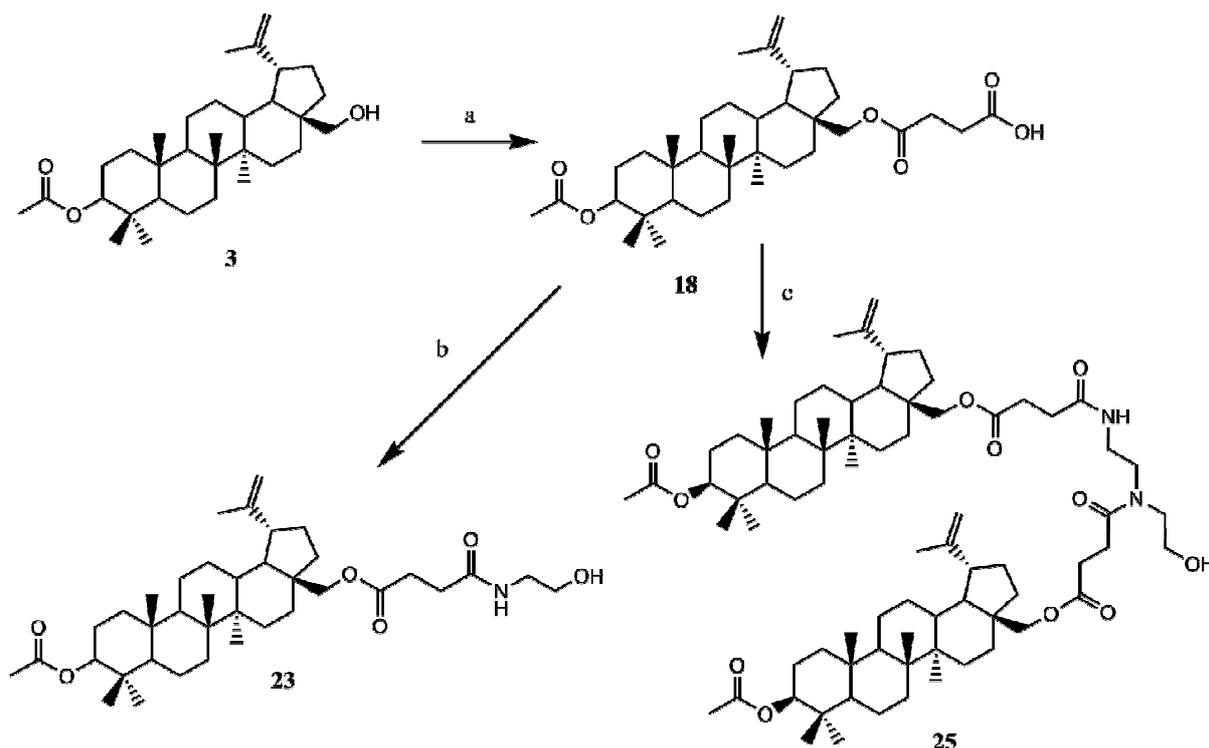


Abbildung 16: Syntheschema für das Betulinhemisuccinat **15** und die daraus hergestellten Amidalkohole **23** und **25**. **a:** 1. Bernsteinsäureanhydrid, DMAP, Pyridin, Rückfluss; 2. H₂O. **b:** 1. HOBT, DMF; 2. HATU; 3. HOCH₂CH₂NH₂; 4. H₂O. **c:** 1. HOBT, DMF; 2. HATU; 3. HOCH₂CH₂NHCH₂CH₂NH₂; 4. H₂O.

Bildung des Amids statt des Esters. Eine solche Veresterung wäre bei einer Umsetzung der Carbonsäuren **14** und **15** mit einem Aminoalkohol theoretisch ebenfalls möglich, wird aber nicht beobachtet.

Beim Versuch, die Substanzen **22-25** zu Sulfamaten umzusetzen, stellte sich allerdings heraus, dass die Produkte in Lösung sehr bereitwillig wieder zerfallen: Die nach der Aufreinigung gewonnene Substanz hat bei einer nachfolgenden Dünnschichtchromatografie eine deutliche Rückreaktion zum Alkohol gezeigt und in NMR-Spektren waren keine Spuren des Produkts mehr zu erkennen. Frühere Publikationen weisen darauf hin, dass bei Arylsulfamaten in bestimmten Lösungen ein spontaner Zerfall auftritt [199,200]. Das Arylsulfamat eliminiert dabei Sulfin $\text{HN}=\text{SO}_2$, was den Arylalkohol zurücklässt. Denkbar ist, dass diese Reaktion auch in Gegenwart anderer destabilisierender Gruppen stattfindet, auch wenn zwischen den Ester- und Amidgruppen in **22-25**, die dafür in Frage kämen, sich in der Theorie keine als besonders katalytisch wirksam anbieten. Reine Alkylsulfamate wie **12** und **13** sind hingegen ungleich stabiler als Arylsulfamate [201]. In jedem Fall taugen diese

kurzlebigen Sulfamate nicht für eine biologische Anwendung. Somit kann gezeigt werden, dass die C-O-S-Brücke in gewissen Umgebungen instabil ist, also bestanden die nächsten Versuche darin, eine haltbarere C-S-Bindung zu verwenden.

3.2 Sulfonamide durch Taurinamid

Anstatt die Sulfonamidgruppe über zwei Stufen mittels Aminoethanol und Sulfamylchlorid an das Hemisuccinat zu knüpfen, wurde nun Taurinamid $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH}_2$ (TA) verwendet, welches sowohl eine Sulfonamidgruppe als auch eine freie Aminogruppe enthält. Mithilfe des Taurinamids konnte eine Vielzahl von weitaus stabileren Verbindungen hergestellt werden: Zunächst die Succinate **26** und **30**, dann auch die homologen Glutarate **27** und **31** aus den jeweiligen Hemiglutaraten **15** und **19**. Der Einfluss von kurzen Seitenketten wirkt sich ebenfalls interessant auf die pharmakologischen Eigenschaften aus [29,190,202], im Falle des als Bevirimat bekannten 3,3-Dimethylhemisuccinats der Betulinsäure sogar so sehr, dass es in den USA in einer klinischen Phase-2-Studie als HIV-Maturations-Inhibitor getestet wurde [203-206]. In Anlehnung an die Struktur von Bevirimat wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls 2- und 3-Methylhemisuccinate **16**, **17**, **20** und **21** sowie die dazugehörigen Sulfonamide **28**, **29**, **32** und **33** synthetisiert (Abb. 17). Die Kopplung des Taurinamids an die Carbonsäurefunktion gelingt ebenfalls mit den zuvor erwähnten Aktivierungsreagenzien HOBt und HATU.

Wie auch schon die meisten der zuvor genannten Produkte fallen die Substanzen **14-21** und **26-33** als amorphe Feststoffe an, die Schäume bilden, wenn das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgesaugt wird.

Verschiebungen im NMR-Spektrum durch die Reaktionen sind in Tabelle 4 am Beispiel der Bernsteinsäurederivate **14** und **26** gezeigt. Bei der Veresterung von **1** zu **14** wird H_3 stark ins tiefe Feld verschoben, aber die mittleren Wasserstoffatome der Bernsteinsäure erfahren nur eine leichte Verschiebung zu höheren Frequenzen. Zwischen diesen findet trotz der nur einseitigen Reaktion auch kaum eine Aufspaltung statt, die allerdings bei der nachfolgenden Amidbildung an C_4' durch die nun zu höherem Feld verschobenen H_3' -Atome deutlicher hervortritt. Im Vergleich mit dem ungebundenen Taurinamid sind die H_5' -Atome in **26** nach der Bindungsknüpfung ebenfalls mäßig ins tiefe Feld

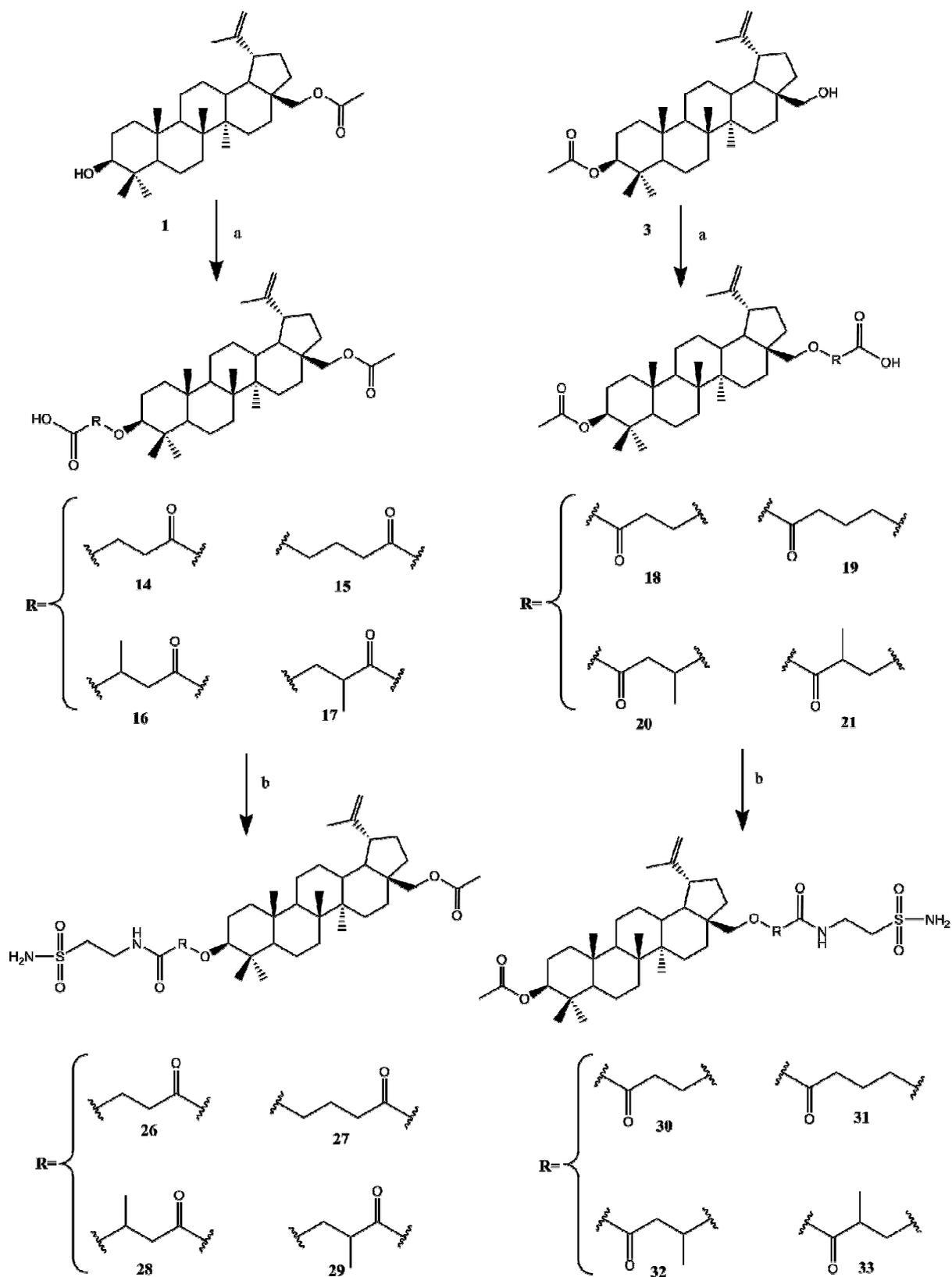


Abbildung 17: Syntheschema für die Hemisuccinate und Hemiglutarate **14-21** und die daraus hergestellten Sulfonamide **26-33**. **a:** RCO₂ (Säureanhydrid), DMAP, Pyridin, Rückfluss; 2. H₂O. **b:** 1. HOBT, DMF; 2. HATU; 3. H₂NSO₂CH₂CH₂NH₂; 4. H₂O.

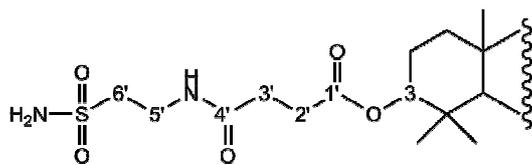


Tabelle 4: Ausgewählte ^1H - und ^{13}C -NMR-Verschiebungen des Hemisuccinats **14** und des daraus hergestellten Sulfonamids **26** im Vergleich mit ihren Ausgangsstoffen. Es sind

Verschiebungen als δ -Wert in ppm sowie die Signalaufspaltungen im ^1H -Spektrum angegeben.

| 1 | BSS | 14 | TA | 26 | Zuordnung |
|----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| 2.95 (m) | | 4.36 (dd) | | 4.34 (dd) | H3 |
| | 2.39 (s) | 2.47 (m) | | 2.46 (m) | H2' |
| | 2.39 (s) | 2.47 (m) | | 2.33 (t) | H3' |
| | | | | 8.00 (t) | NH |
| | | | 2.88 (t) | 3.37 (m) | H5' |
| | | | 3.03 (t) | 3.05 (t) | H6' |
| 77.2 | | 80.4 | | 80.3 | C3 |
| | 174.0 | 172.0 | | 172.2 | C1' |
| | 29.2 | 29.2 | | 29.8 | C2' |
| | 29.2 | 29.6 | | 30.4 | C3' |
| | 174.0 | 173.8 | | 171.4 | C4' |
| | | | 58.1 | 54.1 | C5' |
| | | | 37.2 | 34.5 | C6' |

verschoben. Im ^{13}C -Spektrum kann man gut die jeweiligen Frequenzänderungen bei Ester- bzw. Amidbildung verfolgen. Während bei der Veresterung das Carbonsäurekohlenstoffatom $C1'$ um 2.0 ppm ins hohe und das hydroxylgebundene $C3$ um 3.2 ppm ins tiefe Feld verschoben werden, zeigt sich bei der Amidbildung sowohl bei $C4'$ als auch seinem amingebundenen Reaktionspartner $C5'$ eine Hochfeldverschiebung, um 2.4 bzw. 4.0 ppm. Auch im ^{13}C -NMR kann man mit dem Verlauf der Reaktionen eine zunehmende Aufspaltung der mittleren Kohlenstoffatome $C2'$ und $C3'$ der Disäure erkennen.

Acetylbetulinsäure **4** lässt sich ebenfalls mit Taurinamid umsetzen, wobei das Derivat **34** entsteht (Abb. 18). Die Wirkung des sterisch eher anspruchsvollen HOBT/HATU-Komplexes reicht durch den Platzmangel an der Carbonsäuregruppe dabei nicht mehr aus. Da **4** allerdings problemlos in sein Säurechlorid überführt werden kann, wurde hier

dieser Umsetzungsweg verwendet [207,208]. **4** selbst wird synthetisiert, indem Betulinsäure zusammen mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erhitzt wird [209].

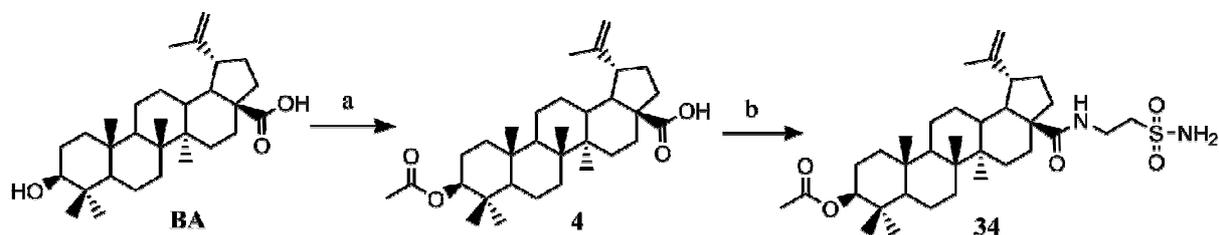


Abbildung 18: Syntheschema für Acetylbetulinsäure **4** und das daraus hergestellte Sulfonamid **34**.
a: 1. Ac₂O, Pyridin, 100 °C; 2. H₂O. **b:** 1. SOCl₂, DCM; 2. TA, NEt₃, DCM, DMF; 3. H₂O.

Tabelle 5: Ausgewählte ¹H- und ¹³C-NMR-Verschiebungen des Betulinsäurederivats **34** im Vergleich mit den Ausgangsstoffen **4** und **TA**. Es sind Verschiebungen als δ-Wert in ppm sowie Signalaufspaltungen im ¹H-Spektrum angegeben.

| 4 | TA | 34 | Zuordnung |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 6.86 (t) | NH |
| | 2.88 (t) | 3.39 (m) | H1' |
| | 3.03 (t) | 3.06 (m) | H2' |
| 55.9 | | 55.3 | C17 |
| 177.7 | | 176.3 | C28 |
| | 58.1 | 54.2 | C1' |
| | 37.2 | 34.5 | C2' |

Interessant bei der Betrachtung des NMR-Spektrums von **34** (Tab. 5) ist die Umsetzung einer Carboxylgruppe, die direkt an das Triterpengerüst gebunden ist, zu einem Amid. Während die Amidierung zuvor an einer primären Carbonsäuregruppe stattfand (siehe Tab. 4), ist das benachbarte C-Atom hier von drei weiteren C-Atomen umgeben, wodurch sich die Verschiebung der Kernspins ändert. Bei der Reaktion zu **34** werden *C28* und *C17* um 1.4 ppm bzw. 0.6 ppm zu höherem Feld verschoben. Im Gegensatz dazu fällt die Änderung bei der Reaktion zu **26** aus den Ausgangsstoffen extremer aus: Das Carboxylkohlenstoffatom wird dabei um 2.4 ppm zu hohem Feld verschoben und das benachbarte *C3'* sogar ins tiefe Feld, um 0.8 ppm.

Schließlich wurde **35** hergestellt, das nur eine Seitenkette bestehend aus Bernsteinsäure und Taurinamid darstellt und kein Triterpenderivat ist (Abb. 19). Dabei werden äquimolare Mengen Bernsteinsäureanhydrid und Taurinamid in Aceton umgesetzt [210], wodurch **35** als weißes, kristallines Pulver entsteht, welches sich gut in Wasser, Aceton und Acetonitril lösen lässt. Die enzyminhibierenden und zytotoxischen Eigenschaften von **35** lassen sich dann mit denen der betulinhaltigen Verbindungen vergleichen.

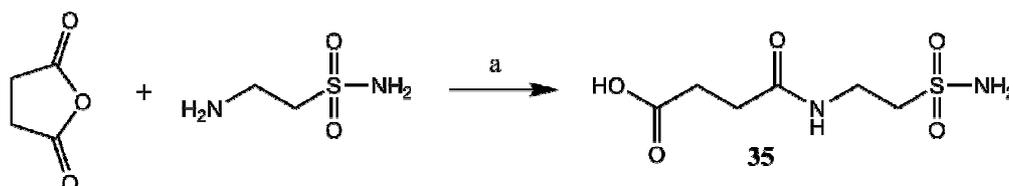


Abbildung 19: Syntheschema für das Sulfonamid **35**. a: Aceton, DMF, 0 °C.

Tabelle 6: Ausgewählte ^1H - und ^{13}C -NMR-Verschiebungen des Bernsteinsäurederivats **35** im Vergleich mit den Ausgangsstoffen Bernsteinsäure und **TA**. Es sind Verschiebungen als δ -Wert in ppm sowie Signalaufspaltungen im ^1H -Spektrum angegeben.

| BSS | TA | 35 | Zuordnung |
|----------|----------|----------|-----------|
| 2.39 (s) | | 2.40 (t) | H2 |
| 2.39 (s) | | 2.28 (t) | H3 |
| | 2.88 (t) | 3.39 (m) | H5 |
| | 3.03 (t) | 3.06 (t) | H6 |
| 29.2 | | 30.5 | C3 |
| 174.0 | | 171.7 | C4 |
| | 58.1 | 54.1 | C5 |
| | 37.2 | 34.5 | C6 |

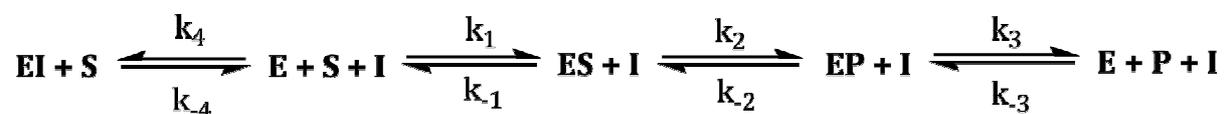
Im NMR-Spektrum von **35** (Tab. 6) lässt sich verfolgen, wie die zuvor magnetisch äquivalenten Atome *C2* und *C3* der Bernsteinsäure durch die Reaktion aufgespaltet werden. Während *C2* und *H2*, die dem Reaktionszentrum ferner liegen, kaum Verschiebungen erfahren, zeichnet sich die Umsetzung deutlicher an *C3* und *H3* ab. *C3* wird um 1.3 ppm zu höheren Frequenzen verschoben und *H3* um 0.11 ppm zu niedrigeren. Wie schon bei den Reaktionen zuvor werden die H-Atome des Taurinamids bei der Amidierung ins tiefe Feld verschoben, die C-Atome leicht ins höhere Feld.

4. Untersuchung der Enzymaktivität

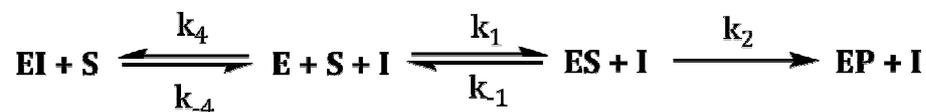
Im Rahmen dieser Promotion war geplant, zusätzlich zur chemischen und zellproliferativen Charakterisierung der Stoffe auch eine Untersuchung zur Inhibierung von CA IX durchzuführen. Während der Promotionszeit konnte die Methode zum Großteil etabliert werden, jedoch wurden tatsächliche Messungen der Einzelsubstanzen nicht mehr durchgeführt. Daher soll an dieser Stelle eine theoretische Betrachtung der Enzyminhibierung und deren Durchführung erfolgen.

4.1 Grundlagen

Der große Teil der chemischen Enzyminhibitoren sind sogenannte kompetitive Inhibitoren, welche denselben Bindungsplatz im Enzym besetzen wie das Substrat. Auch die Sulfamate gehören zu dieser Gruppe [140,164], die der folgenden allgemeinen Reaktionsgleichung folgt:



Hierbei bezeichnet **E** das Enzym, **S** das Substrat, **P** das Reaktionsprodukt und **I** den Inhibitoren. Betrachtet man nur den Beginn der Umsetzung, so ist **[P]** vernachlässigbar klein, sodass die Rückreaktion k_{-3} ihre Bedeutung verliert. Da der Ausstoß des Produkts (k_3) ebenfalls schneller geschieht als die Rückreaktion zum Substrat (k_{-2}), kann man die folgende vereinfachte Gleichung für die kompetitive Inhibierung erzeugen:



Aus diesem Reaktionsgleichgewicht lässt sich unter der Annahme $[S] \gg [E]$ und damit $d[ES]/dt = 0$ (Steady-State-Zustand) die folgende modifizierte Michaelis-Menten-Gleichung aufstellen [211,212]:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]_0}{K_m \cdot i + [S]_0}, \text{ mit } v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0, \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad i = 1 + \frac{k_4 \cdot [I]_0}{k_{-4}}$$

v_{max} ist dabei die Grenzgeschwindigkeit bei Substratsättigung ($[S] \gg K_m$), K_m ist die Michaeliskonstante, bei der $v = v_{max}/2$ gilt, und i ist der Inhibierungsfaktor, der ausdrückt, wie stark die Reaktionsgeschwindigkeit durch den Einfluss des Inhibitors sinkt.

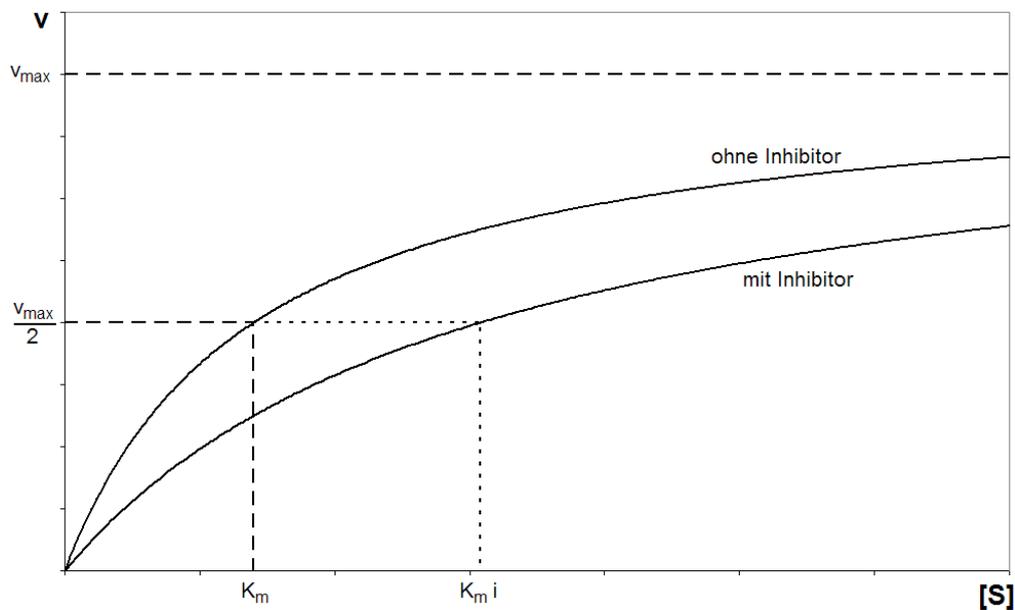


Abbildung 20: Beispiel eines Michaelis-Menten-Plots. v – Reaktionsgeschwindigkeit, $[S]$ – Substratkonzentration, v_{max} – Grenzgeschwindigkeit, K_m – Michaeliskonstante, i – Inhibierungsfaktor

Die inhibitorspezifische Konstante $K_i = k_{-4}/k_4$ kann nun durch eine weitere lineare Regression ermittelt werden, indem die zuvor bestimmten Inhibierungsfaktoren i gegen die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen $[I]$ aufgetragen werden:

$$i = \frac{K_m \cdot i}{K_m} = \frac{[I]_0}{K_i} + 1$$

Bildet man das Reziprok der Michaelis-Menten-Gleichung,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m \cdot i}{v_{max} \cdot [S]_0} + \frac{1}{v_{max}}$$

erhält man eine Linearisierungsform für die Auftragung von v^{-1} gegen $[S]_0^{-1}$ für verschiedene Inhibitorkonzentrationen (Lineweaver-Burk-Plot, Abb. 21). In dieser Auftragungsform zeichnen sich kompetitive Inhibitoren dadurch aus, dass sich die Graphen in $v^{-1}(0) = v_{max}^{-1}$ schneiden. Die Nullstellen der Graphen ergeben die inhibierten Michaeliskonstanten $K_m i$.

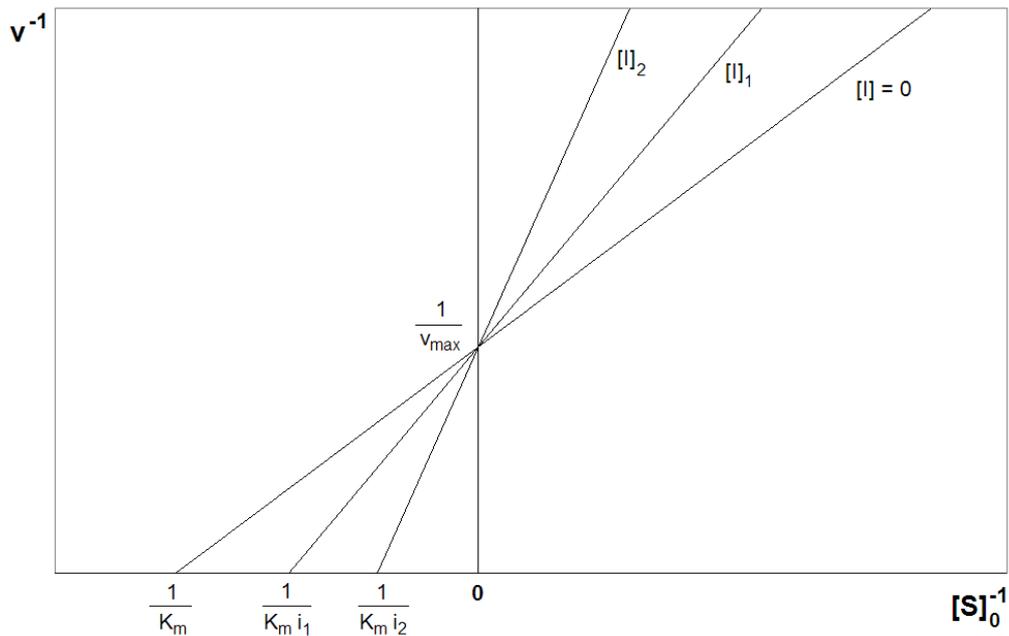


Abbildung 21: Beispiel eines Lineweaver-Burk-Plots für einen kompetitiven Inhibitoren bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Die inhibitorspezifische Konstante $K_i = k_{-4}/k_4$ kann nun durch eine weitere lineare Regression ermittelt werden, indem die zuvor bestimmten Inhibierungsfaktoren i gegen die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen $[I]$ aufgetragen werden:

$$i = \frac{K_m \cdot i}{K_m} = \frac{[I]_0}{K_i} + 1$$

4.2 Methode

Neben der Hydratisierung von Kohlendioxid haben CAs die Eigenschaft, Ester zu hydrolysieren, was sich für eine Messung der Enzymaktivität anbietet [172,213]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die enzymatische Umsetzung von 4-Nitrophenylacetat (NPA) zu 4-Nitrophenol (NP) als Messgrundlage genutzt [172,214]. Der Ausgangsstoff ist einfacher zu handhaben als CO_2 , was ansonsten für diese Messung benötigt würde, und das Produkt zeichnet sich in deprotonierter Form ($\text{pK}_s = 7.15$ [215]) durch eine optisch messbare Gelbfärbung mit einer maximalen Absorption nahe 400 nm aus [216].

Zur Ermittlung des K_i -Wertes der Reaktion wird zunächst eine Lösung von CA IX in PBS hergestellt und anschließend mit verschiedenen konzentrierten Lösungen des entsprechenden Inhibitors in Acetonitril versetzt. Nach einer Inkubationszeit von

3 Minuten werden verschiedene Konzentrationen von NPA, ebenfalls in Acetonitril, mit den Lösungen vermischt. Anschließend wird in einem Spektrometer die Absorptionsänderung von Licht bei 405 nm Wellenlänge alle 2 Sekunden für insgesamt 3 Minuten gemessen. Zusätzlich zu den Messungen mit Inhibitor und Enzym wird eine Vergleichsreihe ohne Inhibitor zur Ermittlung des maximalen Umsatzes, und eine Reihe ohne Inhibitor und Enzym zur Messung des hydrolytischen Umsatzes von NPA aufgenommen. Aus den Anstiegen der resultierenden Messkurven ergeben sich die Reaktionsgeschwindigkeiten für den jeweiligen Inhibitor, seine Konzentration und die Konzentration des Substrats NPA.

5. Zytotoxizität

Die Substanzen **5-35** wurden mittels SRB-Assay auf ihre zytotoxischen Eigenschaften hin untersucht. Das namensgebende Sulforhodamin B (Abb. 22) ist ein intensiv rosa färbender Stoff, der in leicht saurem Milieu an basische Aminosäurereste in den Proteinen TCA-fixierter Zellen bindet. Wird das so angefärbte Zellmaterial anschließend in Tris-Puffer gelöst, lässt sich über eine optische Dichtebestimmung auf die Überlebensrate der Zellpopulation schließen [217]. Dazu wird von jeder Zelllinie

eine Reihe von Kolonien in den Vertiefungen einer 96-Well-Platte angezogen und anschließend mit Nährlösung behandelt, welche verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffs enthält. Nach einer Einwirkzeit von 96 Stunden werden die überlebenden Zellen fixiert und angefärbt. Die Überlebensrate jeder Zellpopulation wird festgestellt und der IC_{50} -Wert, das heißt, die Wirkstoffkonzentration, bei der die Hälfte der Population überlebt, wird ermittelt.

Drei Gruppen von Wissenschaftlern haben jeweils eine Auswahl der Substanzen auf ihre Wirkung auf einige humane Krebszelllinien getestet: Herr Dr. Kranthi Vanchanagiri untersuchte die Substanzen **6-11** auf ihre Wirkung gegenüber den Zelllinien 518A2, 8505C, A2780, A549 und MCF7. Frau Monique Brusckke beschäftigte sich ebenfalls mit dem Effekt der Substanzen **8** und **9** sowie **14**, **18**, **22** und **23** auf die Krebszelllinien 518A2, 8505C, A2780, A549, HT29 und den Mausfibroblasten NIH-3T3, mit deren Hilfe sich Selektivitätswerte formulieren lassen. Schließlich erforschte die Gruppe bestehend aus Frau Anne Funtan und Herrn Valentin Schmidt die verbliebenen Substanzen **5**, **12**, **13**, **15-17**, **19-21** und **24-35**. Dabei verwendeten sie die Zelllinien A2780, MCF7, HT29, FaDu, SW1736 und NIH-3T3. Die Bezeichnungen der Tumorzelllinien sind in Abschnitt 8.4.1 aufgeschlüsselt.

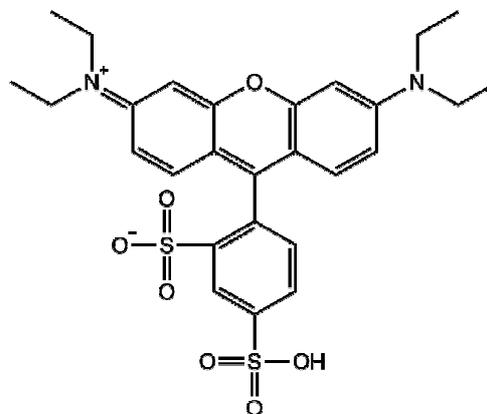


Abbildung 22: Strukturformel von Sulforhodamin B.

5.1 IC₅₀-Werte

Tabelle 7: IC₅₀-Werte der Substanzen in µM mit ihren Standardabweichungen gegenüber verschiedenen Zelllinien.

| | 518A2 | 8505C | A2780 | MCF7 | A549 | HT29 | FaDu | SW 1736 | NIH- 3T3 |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| BA [115] | 14.80 ±0.60 | 12.63 ±1.67 | 8.75 ±0.96 | 14.03 ±1.21 | 13.30 ±0.82 | | | | |
| BA [119] | 8.13 ±0.04 | 7.26 ±0.90 | 11.07 ±0.44 | 12.27 ±0.19 | 11.1 ±1.83 | 13.39 ±0.46 | 10.19 ±0.09 | 13.09 ±0.48 | |
| CisPt [115] | 0.64 ±0.01 | 1.34 ±0.04 | 0.33 ±0.02 | 0.41 ±0.01 | 1.15 ±0.05 | | | | |
| 1 [119] | 15.84 ±0.66 | 14.74 ±0.86 | 11.74 ±2.66 | 11.38 ±0.93 | 14.37 ±2.20 | 10.96 ±0.87 | 13.95 ±6.31 | 11.95 ±2.39 | |
| 4 [115] | 10.95 ±0.12 | 10.40 ±0.40 | 5.95 ±0.42 | 10.72 ±0.40 | 10.52 ±0.01 | | | | |
| 5 | | | 12.78 ±0.65 | 10.66 ±0.51 | | 12.46 ±0.74 | 13.66 ±0.79 | 19.55 ±1.13 | 12.82 ±0.92 |
| 6 | 11.83 ±0.03 | 12.24 ±0.00 | 8.85 ±1.14 | 10.45 ±1.53 | 11.49 ±0.17 | | | | |
| 7 | 15.53 ±1.10 | 16.18 ±1.77 | 4.39 ±0.00 | 13.88 ±1.95 | 11.01 ±2.36 | | | | |
| 8 | 20.01 ±1.17 | 8.79 ±1.65 | 8.70 ±0.71 | 11.48 ±0.00 | 14.99 ±4.90 | 11.08 ±0.00 | | | 26.49 ±0.40 |
| 9 | 14.5 ±2.46 | 9.35 ±0.76 | 16.53 ±1.96 | 10.26 ±0.01 | 9.24 ±1.35 | 10.46 ±0.00 | | | 11.90 ±2.50 |
| 10 | 12.32 ±0.17 | 11.89 ±1.92 | 9.61 ±0.13 | 11.79 ±1.07 | 11.10 ±0.33 | | | | |
| 11 | 6.61 ±0.11 | 9.94 ±0.88 | 4.87 ±0.54 | 7.02 ±0.11 | 6.96 ±0.21 | | | | |
| 12 | | | 25.10 ±1.46 | 12.35 ±0.76 | | 13.21 ±1.83 | 18.51 ±3.73 | 11.76 ±0.42 | 29.11 ±2.61 |

| | 518A2 | 8505C | A2780 | MCF7 | A549 | HT29 | FaDu | SW 1736 | NIH- 3T3 |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 13 | | | >40 | >40 | | >40 | >40 | >40 | >40 |
| 14 | 33.49 ±1.54 | 14.35 ±1.28 | 22.45 ±2.74 | | 14.54 ±3.03 | 7.96 ±0.50 | | | 11.22 ±0.60 |
| 15 | | | 13.83 ±1.19 | 10.68 ±1.13 | | 11.20 ±1.03 | 18.79 ±1.69 | 20.39 ±4.43 | 15.81 ±1.39 |
| 16 | | | 12.05 ±0.45 | 10.48 ±1.03 | | 12.81 ±0.51 | 20.89 ±0.96 | 19.54 ±1.73 | 14.09 ±1.28 |
| 17 | | | 16.35 ±0.75 | 10.08 ±1.84 | | 16.21 ±1.82 | 21.82 ±2.58 | 20.51 ±1.15 | 11.26 ±0.56 |
| 18 | 11.80 ±0.90 | 9.24 ±1.10 | 12.30 ±3.90 | | 29.11 ±1.10 | 34.40 ±0.60 | | | 25.63 ±2.60 |
| 19 | | | 13.07 ±0.71 | 12.42 ±1.24 | | 31.10 ±5.11 | 9.79 ±1.04 | 18.48 ±3.82 | 19.30 ±1.90 |
| 20 | | | 8.46 ±0.28 | 7.17 ±1.53 | | 34.61 ±1.09 | 11.31 ±0.61 | 13.92 ±0.57 | 11.58 ±0.63 |
| 21 | | | 9.42 ±1.05 | 8.54 ±0.60 | | 29.62 ±1.33 | 10.65 ±0.60 | 12.94 ±1.38 | 12.60 ±1.10 |
| 22 | 6.82 ±1.62 | 25.83 ±1.61 | 15.67 ±5.05 | | 23.88 ±1.76 | 27.49 ±3.50 | | | 6.69 ±2.00 |
| 23 | 14.00 ±1.32 | 8.49 ±3.55 | 9.03 ±0.33 | | 14.77 ±1.92 | 26.37 ±1.90 | | | 5.58 ±1.50 |
| 24 | | | > 40 | > 40 | | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| 25 | | | > 40 | > 40 | | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| 26 | | | 13.58 ±0.72 | 11.42 ±0.67 | | 8.57 ±1.08 | 13.41 ±1.29 | 16.90 ±3.01 | 11.79 ±1.48 |
| 27 | | | 19.52 ±1.54 | 13.03 ±0.75 | | 10.15 ±0.79 | 20.95 ±2.37 | 22.35 ±1.71 | 11.06 ±1.07 |

| | 518A2 | 8505C | A2780 | MCF7 | A549 | HT29 | FaDu | SW 1736 | NIH- 3T3 |
|-----------|-------|-------|----------------|---------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 28 | | | 10.56 ±1.43 | 7.29 ±1.23 | | 8.47 ±0.88 | 10.84 ±2.21 | 14.30 ±2.18 | 9.27 ±1.01 |
| 29 | | | 11.04 ±2.01 | 9.79 ±2.70 | | 9.62 ±2.27 | 12.31 ±0.33 | 12.83 ±2.01 | 10.57 ±1.34 |
| 30 | | | 11.10 ±1.58 | 8.27 ±0.61 | | 18.62 ±1.44 | 11.47 ±6.05 | 14.93 ±0.79 | 11.10 ±2.30 |
| 31 | | | 13.73 ±1.22 | 8.01 ±0.76 | | 23.24 ±1.95 | 15.30 ±1.99 | 13.82 ±1.28 | 11.67 ±1.80 |
| 32 | | | 7.84 ±0.50 | 5.68 ±0.81 | | 17.68 ±0.91 | 11.23 ±1.18 | 11.31 ±1.39 | 11.52 ±1.39 |
| 33 | | | 10.08 ±0.79 | 8.15 ±1.09 | | 17.72 ±1.36 | 11.46 ±3.84 | 11.17 ±1.32 | 11.81 ±1.71 |
| 34 | | | 10.64 ±1.14 | 9.18 ±1.16 | | 8.45 ±1.09 | 11.02 ±1.72 | 12.17 ±2.88 | 14.42 ±1.37 |
| 35 | | | > 40 | > 40 | | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |

Generell lässt sich feststellen, dass die IC₅₀-Werte der meisten betulinhaltigen Substanzen (d.h. alle getesteten Substanzen außer **12**, **13**, **24**, **25** und **35**) etwa im Bereich der Werte von BA liegen, um oder etwas über 10 µM. Die höchste Gesamtzytotoxizität zeigt das 3-Acetylbetulinsulfamat **11**, welches auf die getesteten Tumorzelllinien durchweg mit einem Wert von unter 10 µM wirkt.

In der Tabelle lassen sich einige Substanzen erkennen, welche sehr spezifisch gegen eine oder wenige Zelllinien wirken. Beispielsweise ist die Wirkung des Betulinsäurederivats **7** gegen die Brustkrebslinie MCF7 bemerkenswert; sie ist mit einem IC₅₀-Wert von 4.39 µM etwa doppelt so stark wie die der Betulinsäure selbst. Das Hemiglutarat **19** wirkt recht selektiv gegen das Rachenkarzinom FaDu und die Hydroxyethylamide **22** und **23** zeigen sogar eine höhere Zytotoxizität gegen den Fibroblasten NIH-3T3 als gegen alle anderen getesteten Zelllinien.

Die unterschiedlichen Strukturen der Hemisuccinate und Hemiglutarate **14-21** und ihrer jeweiligen Sulfonamide **26-33** rufen kleine Unterschiede ihrer zytotoxischen Eigenschaften hervor. Zunächst ist zu bemerken, dass MCF7 in den meisten Fällen empfindlicher auf diese Substanzen reagiert als die anderen getesteten Zelllinien. Somit zeichnen sich die Spacerverbindungen durch eine erhöhte Selektivität gegen MCF7 aus, wenn auch oftmals nur leicht, mit einer maximalen Selektivität gegenüber NIH-3T3 von 2.03 bei **32**. Des Weiteren lässt sich ermitteln, dass die Sulfonamide **26-33** in den vielen Fällen kleinere IC₅₀-Werte haben als die jeweiligen Säuren **14-21**. Dies ist insbesondere bei der Darmkrebsart HT29 zu beobachten, wo sich der IC₅₀-Wert mit dem Anbringen der Sulfonamidfunktion mitunter halbiert (34.61 µM bei **20** und 17.68 µM bei **32**).

Die Form des Spacers hat ebenfalls einen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Stoffe. In den Zelllinien A2780 und MCF7 zeigen die 3-Methylsuccinate (**16, 20, 28, 32**) tendenziell die besten Werte, durchweg mit einem IC₅₀-Wert von unter oder knapp über 10 µM. Danach folgen 2-Methylsuccinat, Succinat und Glutarat als Spacereinheit. SW1736 wiederum zeigt eine leichte Präferenz von 3-Methylsuccinaten gegenüber den isomeren 2-Methylsuccinaten. Dem gegenüber reagiert der Mausfibroblast NIH-3T3 eher auf den Succinatspacer empfindlich, wie bereits erwähnt besonders auf die Hydroxyethylamide **22** und **23** mit IC₅₀-Werten von 5.58 bzw. 6.69 µM.

Auch bei der Substitutionsstelle im Wirkstoffmolekül gibt es Unterschiede, die sich besonders beim Schilddrüsenkarzinom SW1736 abzeichnen. Während die 3-Acetylbetulinderivate **19-21** sowie **30-33** bereits im Bereich von ca. 11-14 µM wirksam sind, liegen die Inhibitionsindices der 28-Acetylbetulinderivate **15-17** und **26-29** bis auf eine Ausnahme bei 14-23 µM. Einen ähnlichen Effekt zeigt auch MCF7, bei welchem die 3-Acetylbetulinderivate im Bereich von 5.68-9.78 µM ihre Wirkung entfalten, die 28-Acetylbetuline hingegen mit 7.29-13.03 µM etwas höhere Konzentrationen benötigen. Von den untersuchten Zelllinien zeigen ebenfalls 518A2 und FaDu dieses Verhalten, allerdings in schwächerer Ausprägung. Interessanterweise ist dieser Effekt der Angriffsstelle auf Populationen von HT29 gerade umgekehrt. Hier benötigen die 3-Acetylbetulinderivate die höheren Konzentrationen, um zu wirken, mit IC₅₀-Werten von 17.68-34.61 µM. 28-Acetyl hingegen zeigen eine Zytotoxizität gegen die Darmkrebslinie bereits bei Konzentrationen im Bereich von 8.47-11.20 µM. Einzig die Fibroblastenart zeigt keine Bevorzugung für eine Substitutionsstelle. Ihre

Inhibitionswerte liegen bei den meisten Substanzen um 11 μM . Lediglich das Hemisuccinat **18** ist mit 25.63 μM ein nennenswerter Ausreißer.

Zu bemerken ist insbesondere die schlechte Wirkung der Bisbetulinverbindungen **24** und **25**. Vermutlich senkt die Größe der Moleküle ihre Mobilität, sodass sie sich nicht ungehindert durch die Zellmembran bewegen können. Das Octyldisulfamat **12** zeigt überraschend eine deutliche Zytotoxizität gegenüber allen getesteten Zelllinien. Möglicherweise wirkt das langkettige Molekül mit den hydrophilen Endgruppen zellmembranauflösend, wodurch die angegriffene Zelle ihr Inneres freisetzt. Ob dies zutrifft, könnte durch ein Annexin-V-Assay bestätigt werden, welches in diesem Fall eine erhöhte Nekroserate zeigen würde. Hingegen haben das Octylmonosulfamat **13** sowie das Bernsteinsäure-Taurinamid-Konjugat **35** keinen messbaren zytotoxischen Effekt.

5.2 Selektivitäten

Selektivitätswerte können für die meisten der Substanzen ermittelt werden (Tab. 8). Lediglich die Substanzen **13**, **24**, **25** und **35**, die keine nachweisbare Zytotoxizität zeigen, fallen aus der Betrachtung heraus. Die Selektivitäten für viele Zell-Wirkstoff-Kombinationen liegen leider unter einem Wert von 1, was die Substanzen als toxischer für Normalzellen als für Krebszellen auszeichnet. Dieser Trend ist insbesondere bei den Hydroxyethylamiden **22** und **23** zu erkennen, deren IC_{50} -Werte gegen alle getesteten Tumorzelllinien höher liegen als jene für die Fibroblasten, bis zu einem Faktor von 4.73 bei der Wirkung von **23** auf die Linie HT29.

Drei der hergestellten Substanzen – das Carbamat-Sulfamat **8**, das Octyldisulfamat **12** und das Betulinsäurederivat **34** – zeigen jedoch ein breites Wirkungsspektrum, bei welchem die Selektivitätswerte durchweg größer als 1 sind. Die erhöhte Selektivität von **8**, mit einem SI von bis zu 3.04, lässt sich mit der äußerst selektiven Wirkung des Bis(ethylcarbanyl)betulins BECB verbinden, welches nicht nachweisbar toxisch gegen getestete Normalzellen ist [182]. Substanz **9**, das Carbamat-Sulfamat mit vertauschten Substituenten, weist hingegen keine solche besondere Wirkung gegen Krebszellen vor. Das Gros des Effekts von BECB kann also der Carbamatgruppe an der 28-Position zugeschrieben werden. Eine ähnliche Reaktion ruft auch das 28-Ethylcarbammat des 3-Acetylbetulins hervor [182], aber Derivate mit anderen Substituenten an der

Tabelle 8: Selektivitäten der Substanzen, für die IC₅₀-Werte von NIH-3T3 aufgenommen wurden. ^a Die Selektivitäten sind hier stattdessen gegenüber dem humanen Fibroblasten WWO70327 angegeben [218].

| | 518A2 | 8505C | A2780 | MCF7 | A549 | HT29 | FaDu | SW1736 |
|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|--------|
| 5 | | | 1,00 | 1,20 | | 1,03 | 0,94 | 0,66 |
| 6^a | 1,09 | 1,06 | 1,46 | 1,24 | 1,13 | | | |
| 7^a | 0,92 | 0,88 | 3,28 | 1,03 | 1,30 | | | |
| 8 | 1,32 | 3,01 | 3,04 | 2,31 | 1,77 | 2,39 | | |
| 9 | 0,82 | 1,27 | 0,72 | 1,16 | 1,29 | 1,14 | | |
| 10^a | 0,40 | 0,42 | 0,52 | 0,42 | 0,45 | | | |
| 11^a | 1,35 | 0,90 | 1,84 | 1,27 | 1,29 | | | |
| 12 | | | 1,16 | 2,36 | | 2,20 | 1,57 | 2,48 |
| 14 | 0,34 | 0,78 | 0,50 | | 0,77 | 1,41 | | |
| 15 | | | 1,14 | 1,48 | | 1,41 | 0,84 | 0,78 |
| 16 | | | 1,17 | 1,34 | | 1,10 | 0,67 | 0,72 |
| 17 | | | 0,69 | 1,12 | | 0,69 | 0,52 | 0,55 |
| 18 | 2,17 | 2,77 | 2,08 | | 0,88 | 0,75 | | |
| 19 | | | 1,48 | 1,55 | | 0,62 | 1,97 | 1,04 |
| 20 | | | 1,37 | 1,62 | | 0,33 | 1,02 | 0,83 |
| 21 | | | 1,34 | 1,48 | | 0,43 | 1,18 | 0,97 |
| 22 | 0,98 | 0,26 | 0,43 | | 0,28 | 0,24 | | |
| 23 | 0,40 | 0,66 | 0,62 | | 0,38 | 0,21 | | |
| 26 | | | 0,87 | 1,03 | | 1,38 | 0,88 | 0,70 |
| 27 | | | 0,57 | 0,85 | | 1,09 | 0,53 | 0,49 |
| 28 | | | 0,88 | 1,27 | | 1,09 | 0,85 | 0,65 |
| 29 | | | 0,96 | 1,08 | | 1,10 | 0,86 | 0,82 |
| 30 | | | 1,00 | 1,34 | | 0,60 | 0,97 | 0,74 |
| 31 | | | 0,85 | 1,46 | | 0,50 | 0,76 | 0,84 |
| 32 | | | 1,47 | 2,03 | | 0,65 | 1,03 | 1,02 |
| 33 | | | 1,17 | 1,45 | | 0,67 | 1,03 | 1,06 |
| 34 | | | 1,36 | 1,57 | | 1,71 | 1,31 | 1,18 |

3-Position zeigen keinen solchen Effekt [219]. Der tumorselektive Effekt von **34** lässt sich mit der spezifischen Wirkung der Ausgangssubstanz **4** erklären, welche Selektivitäten im Bereich ca. von 2.5 bis 5.0 zeigt [115]. Die Verknüpfung mit Taurinamid ändert die Zytotoxizität insgesamt nicht wesentlich, jedoch senkt sie die Tumorspezifität der Verbindung. Das Octyldisulfamat **12** zeigt mit SIs von bis zu 2.48 einen bemerkenswert selektiven Effekt gegenüber den Krebszelllinien. Sollte sich die zuvor genannte Vermutung erhärten, dass **12** eine Lysis der Zellmembran verursacht, spricht diese Wirkung für eine hohe Integrität der Membran des Mausfibroblasten, verglichen mit denen der Krebszellen.

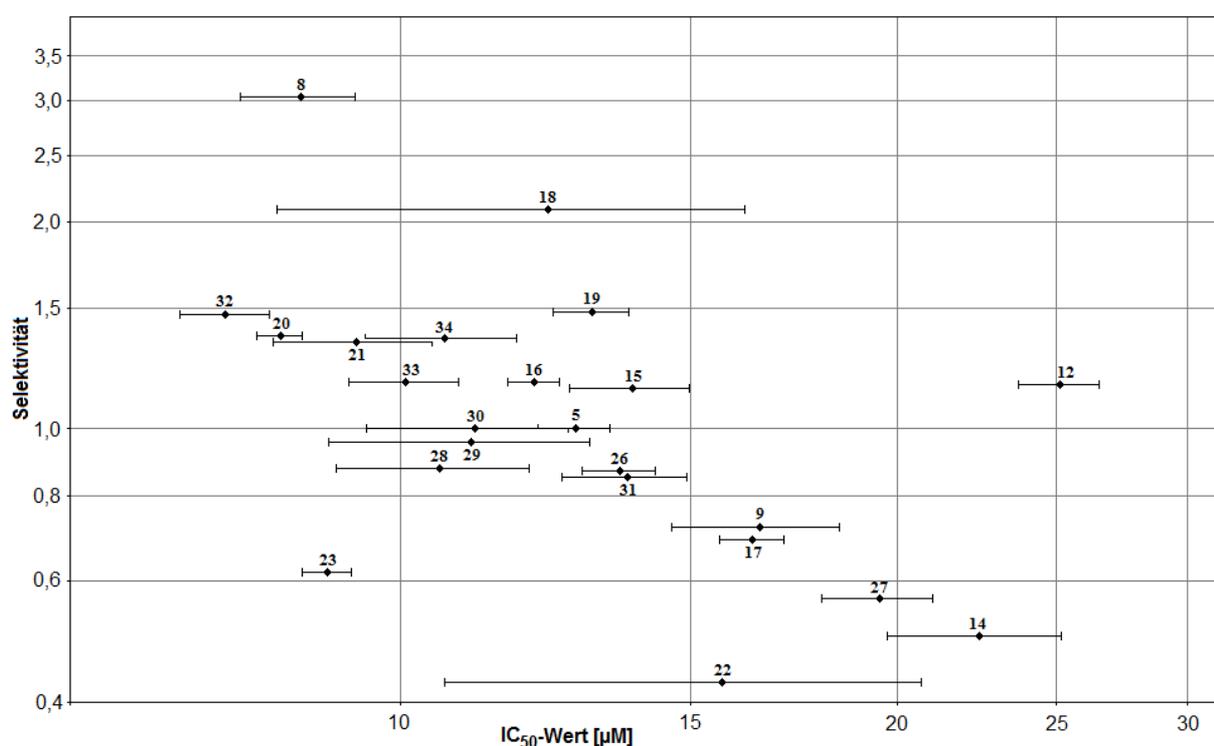


Abbildung 23: Auftragung der IC₅₀-Werte gegen die Selektivitäten für alle Substanzen, für die Selektivitätswerte ermittelt werden können. Die hier angegebenen Werte beziehen sich auf die Wirkung gegenüber der Zelllinie A2780. Standardabweichungen für die IC₅₀-Werte sind angegeben; jene für die Selektivitäten wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

Beim Vergleich der Selektivitätswerte in Tabelle 8 zeigen sich auch einige Substanzen, welche sehr spezifisch wirken. Beispielsweise sind das Hemisuccinat **14** sowie die Sulfonamide **26** und **27** deutlich zytotoxischer gegen HT29 als gegen andere getestete Zelllinien, während die Linie MCF7 besonders empfindlich auf die Sulfonamide **31** und **32** reagiert. Interessant ist auch die Wirkung des Hemisuccinats **18**, welches gegen die Linien 518A2, 8505C und A2780 mehr als doppelt so effektiv ist wie gegen die anderen

getesteten Zellarten. Insgesamt zeigt sich der Trend, dass die Substanzen wirksamer gegen MCF7 als gegen andere Krebszelllinien sind.

5.3 Struktur-Wirkungs-Korrelation

Betrachtet man die Unterschiede in den Wirkungen der Substanzen **14-21** und **26-33** und setzt diese in Beziehung zueinander, so kann man aus den sich ergebenden Trends Zusammenhänge zwischen der Struktur des Moleküls und der zytotoxischen Wirkung der Substanz ziehen. Im folgenden Abschnitt werden diese Betulinderivate nach vier Strukturkategorien klassifiziert und die jeweilige Wirkung gegenüber der Zelllinie A2780 ermittelt.

5.3.1 Position der Acetylgruppe

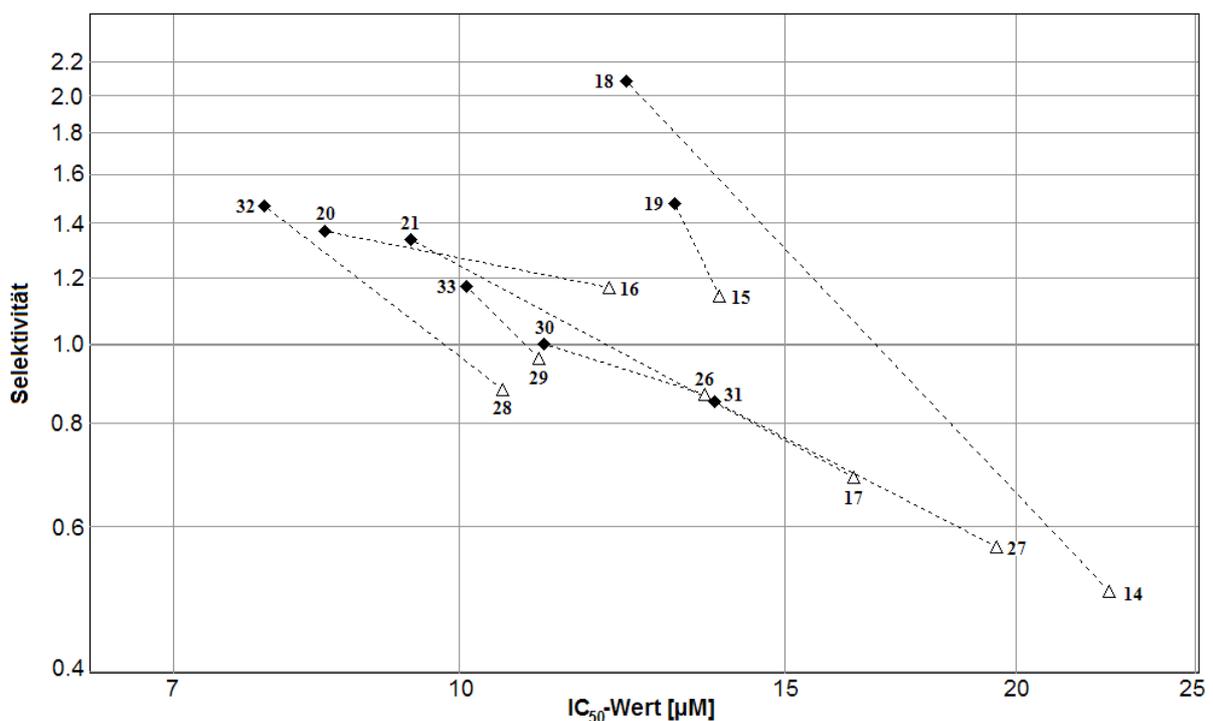


Abbildung 24: Selektivitäten und IC₅₀-Werte der Acetylbetulinderivate **14-21** und **26-33**, kategorisiert danach, ob sich das Molekül vom 28-Acetylbetulin (△) oder vom 3-Acetylbetulin (◆) ableitet. Gestrichelte Linien verbinden Substanzen, die sich nur in dieser Eigenschaft unterscheiden.

Diese Klassifizierung stellt den Unterschied zwischen 28-Acetylbetulinderivaten (**14-17** und **26-29**) und 3-Acetylbetulinderivaten (**18-21** und **30-33**) heraus (Abb. 24). Es zeigt sich ein deutlicher Trend der 3-Acetylbetulinderivate hin zu kleineren IC₅₀-Werten und höheren Selektivitäten, was beides wünschenswert ist. Besonders eindrucksvoll ist dies

zwischen den Substanzen **14** und **18** zu sehen, wobei die Selektivität von **18** um einen Faktor 4 höher liegt und die Zytotoxizität etwa um einen Faktor 2. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien, wonach das Anknüpfen von Acetylgruppen an den A-Ring eines Triterpens dessen Zytotoxizität steigert [220,221].

5.3.2 Anbindung eines Taurinamidrests

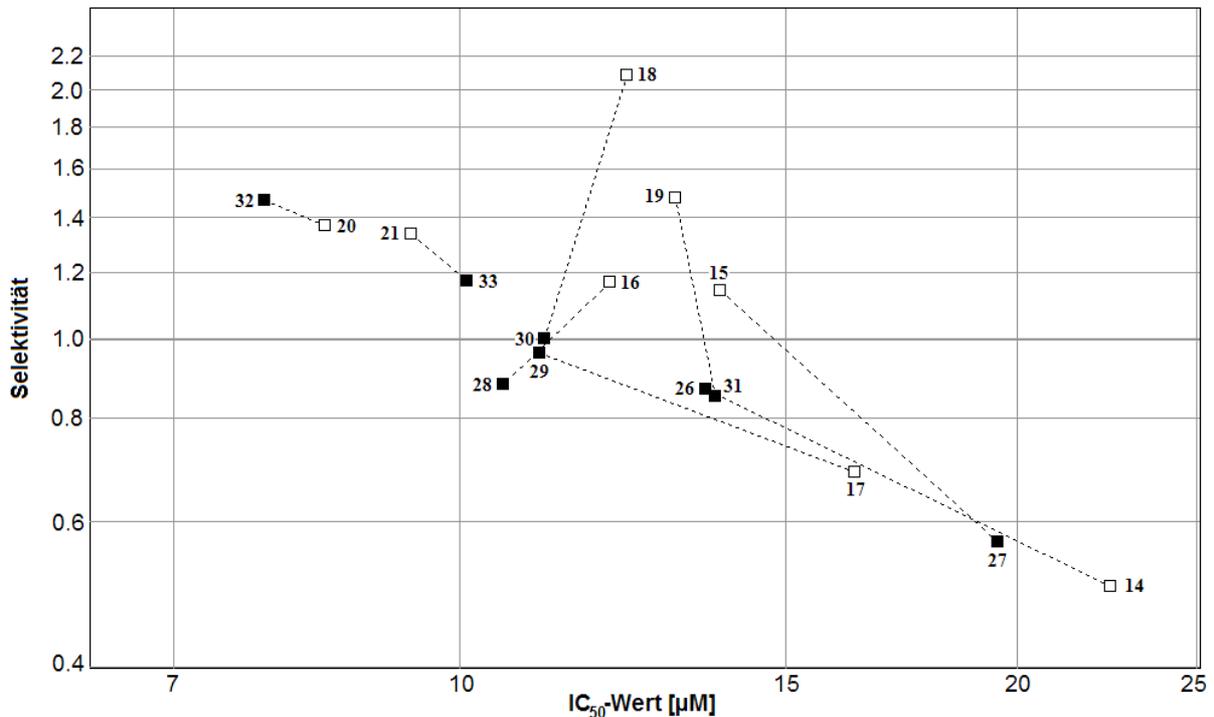


Abbildung 25: Selektivitäten und IC₅₀-Werte der Acteylbetulinderivate **14-21** und **26-33**, kategorisiert danach, ob das Molekül eine freie Carbonsäure als funktionelle Gruppe aufweist (□) oder es mit Taurinamid verknüpft ist (■). Gestrichelte Linien verbinden Substanzen, die sich nur in dieser Eigenschaft unterscheiden.

Hier werden die Substanzen danach klassifiziert, ob sie eine Carbonsäure als funktionelle Gruppe enthalten (**15-21**) oder diese mit Taurinamid zum Amid umgesetzt wurde (**26-33**; Abb. 25). In diesem Aspekt zeigt sich keine besondere Vorzugsrichtung, weder in Bezug auf die Zytotoxizität noch auf die Selektivität. Durch Auszählen lässt sich aber eine leichte Tendenz zu niedrigerem IC₅₀-Wert und geringerer Selektivität feststellen, wenn das Amid eingefügt wird.

5.3.3 Spacerlänge

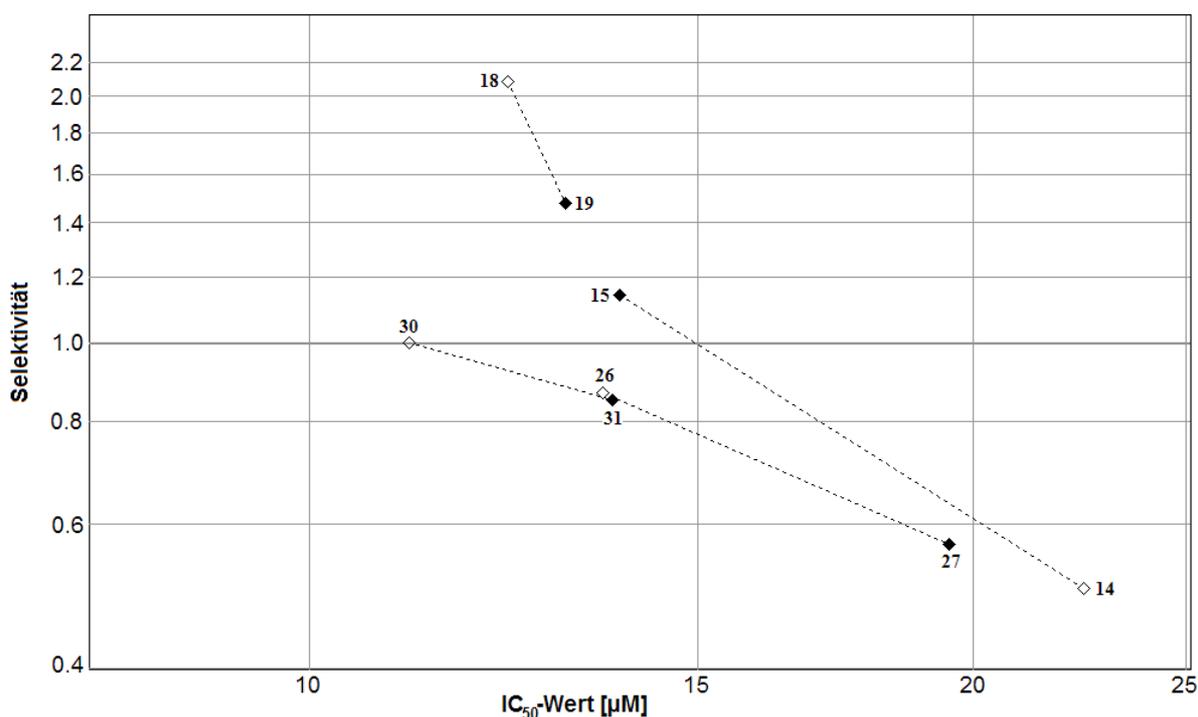


Abbildung 26: Selektivitäten und IC₅₀-Werte der Acteylbetulin derivative **14**, **15**, **18**, **19**, **26**, **27**, **30** und **31**, kategorisiert danach, ob der Spacerteil mit Bernsteinsäure- (◇) oder Glutarsäureanhydrid (◆) synthetisiert wurde. Gestrichelte Linien verbinden Substanzen, die sich nur in dieser Eigenschaft unterscheiden.

Diese Kategorisierung betrifft die Länger der Kohlenstoffkette im Spacer in Abhängigkeit davon, ob bei der Synthese Bernsteinsäure (**14**, **18**, **26**, **30**) oder die homologe Glutarsäure (**15**, **19**, **27**, **31**) verwendet wurde (Abb. 26). Man kann eine grobe Vorzugsrichtung hin zu höheren IC₅₀-Werten und geringeren Selektivitäten bei größerer Spacerlänge ausmachen, beim Derivat **15** ist es aber gerade umgekehrt.

5.3.4. Verzweigung des Spacers

In dieser letzten Kategorie wird der Einfluss der Verzweigung des Spacers auf die Zytotoxizität des Moleküls betrachtet. Hierbei werden die Wirkungen von Substanzen mit unverzweigtem Succinatspacer (**14**, **18**, **26**, **30**) verglichen mit denen mit Methylsuccinat als Spacer, wiederum unterschieden zwischen 3-Methylsuccinat- (**16**, **20**, **28**, **32**) und 2-Methylsuccinatderivaten (**17**, **21**, **29**, **33**; Abb. 27). Eine Tendenz zu geringeren IC₅₀-Werten ist bei der Methylierung des Spacers deutlich zu erkennen, wobei die Änderung der Selektivitäten eher gemischte Ergebnisse zeigt. Dabei spielt die exakte Anknüpfungsstelle des Methylrests eine geringere Rolle, dennoch stellt sich

heraus, dass 3-Methylderivate insgesamt eine höhere Zytotoxizität aufweisen als ihre Isomere.

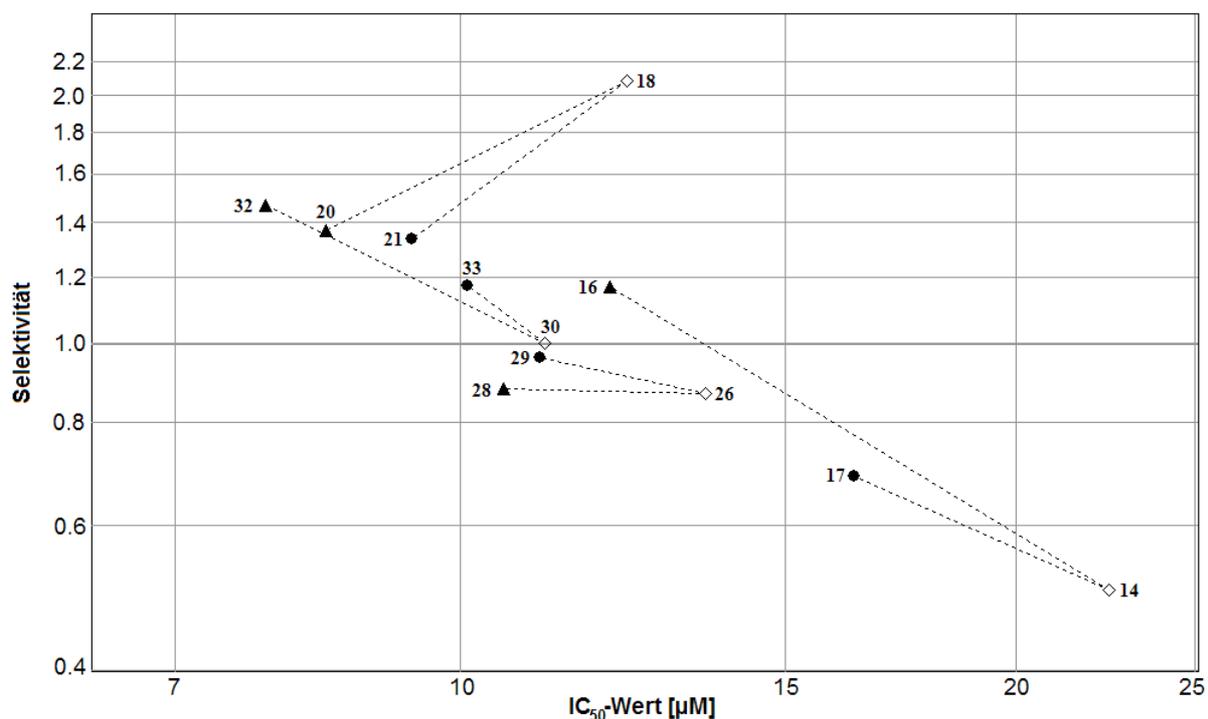


Abbildung 27: Selektivitäten und IC₅₀-Werte der Acetylbetulinderivate **14**, **16-18**, **20**, **21**, **26**, **28-30**, **32** und **33**, kategorisiert danach, ob die Kohlenstoffkette im Spacer unverzweigt ist (◇), eine 3-Methylgruppe (▲) oder eine 2-Methylgruppe (●) enthält. Gestrichelte Linien verbinden Substanzen, die sich nur in dieser Eigenschaft unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich die folgende Struktur-Wirkungs-Korrelation für die Zelllinie A2780 extrapolieren: Eine hohe Zytotoxizität und Selektivität wird durch die Wahl von 3-Acetylbetulin als Startsubstanz und einem verzweigten Spacer begünstigt. Der Spacer sollte dabei eher kurz gehalten werden. Ob Taurinamid angeknüpft wird, spielt keine wesentliche Rolle für die Zytotoxizität, aber ist natürlich ausschlaggebend, wenn man auch eine enzyminhibierende Wirkung der Substanz wünscht. Diese Korrelation wird auch im Verhalten der anderen getesteten Zelllinien MCF7, FaDu und SW1736 widerspiegelt, mit dem wesentlichsten Unterschied, dass die taurinamidhaltigen Substanzen eine stärkere Tendenz zu niedrigeren IC₅₀-Werten gegenüber MCF7 zeigen als die jeweiligen Säuren.

Das Kolorektalkarzinom HT29 zeigt hingegen wesentlich andere Korrelationen (Abb. 28). Im Gegensatz zu den anderen getesteten Zelllinien reagiert HT29 deutlich

empfindlicher auf 28-Acetylbetulinverbindungen als auf 3-Acetylderivate. Alle hier verglichenen 28-Acetylverbindungen zeigen einen niedrigeren IC₅₀-Wert und eine höhere Selektivität als die jeweiligen 3-Acetylverbindungen. Auch die Taurinamidverbindungen wirken generell effektiver gegen die Zelllinie als die entsprechenden Carbonsäuren, während die Selektivität in dieser Hinsicht keine eindeutige Korrelation zeigt. Im Bezug auf die Spacerlänge verhält sich HT29 jedoch wie die anderen Zelllinien: In den meisten Fällen erhöhen sich Zytotoxizität und Selektivität der Verbindungen, wenn Succinat statt Glutarat als Spacer verwendet wird. Schließlich zeigt das Kolorektalkarzinom auch eine veränderte Reaktion auf die Verzweigung des Spacers. Während die Wahl der Spacergruppe keine Korrelation zur Zytotoxizität der Verbindung zeigt, wirken Methylsuccinatverbindungen tendenziell weniger selektiv als Derivate mit unverzweigtem Spacer. Diese Eigenschaften von HT29 haben zur Folge, dass Substanz **14**, die von den hier verglichenen Substanzen am wenigsten zytotoxisch und selektiv auf A2780 wirkt, in diesem Fall am anderen Ende beider Skalen steht. Im umgekehrten Fall hat Substanz **20** auf HT29 nur eine geringe Wirkung, während sie gegen die anderen Zelllinien recht gute Werte zeigt.

Für HT29 muss deshalb eine separate Struktur-Wirkungs-Korrelation aufgestellt werden. Hohe Zytotoxizitäten und Selektivitäten zeigen sich bei dieser Zelllinie, wenn 28-Acetylbetulin als Ausgangsstoff gewählt, ein kurzer, unverzweigter Spacer verwendet und schließlich Taurinamid an die Carbonsäure geknüpft wird.

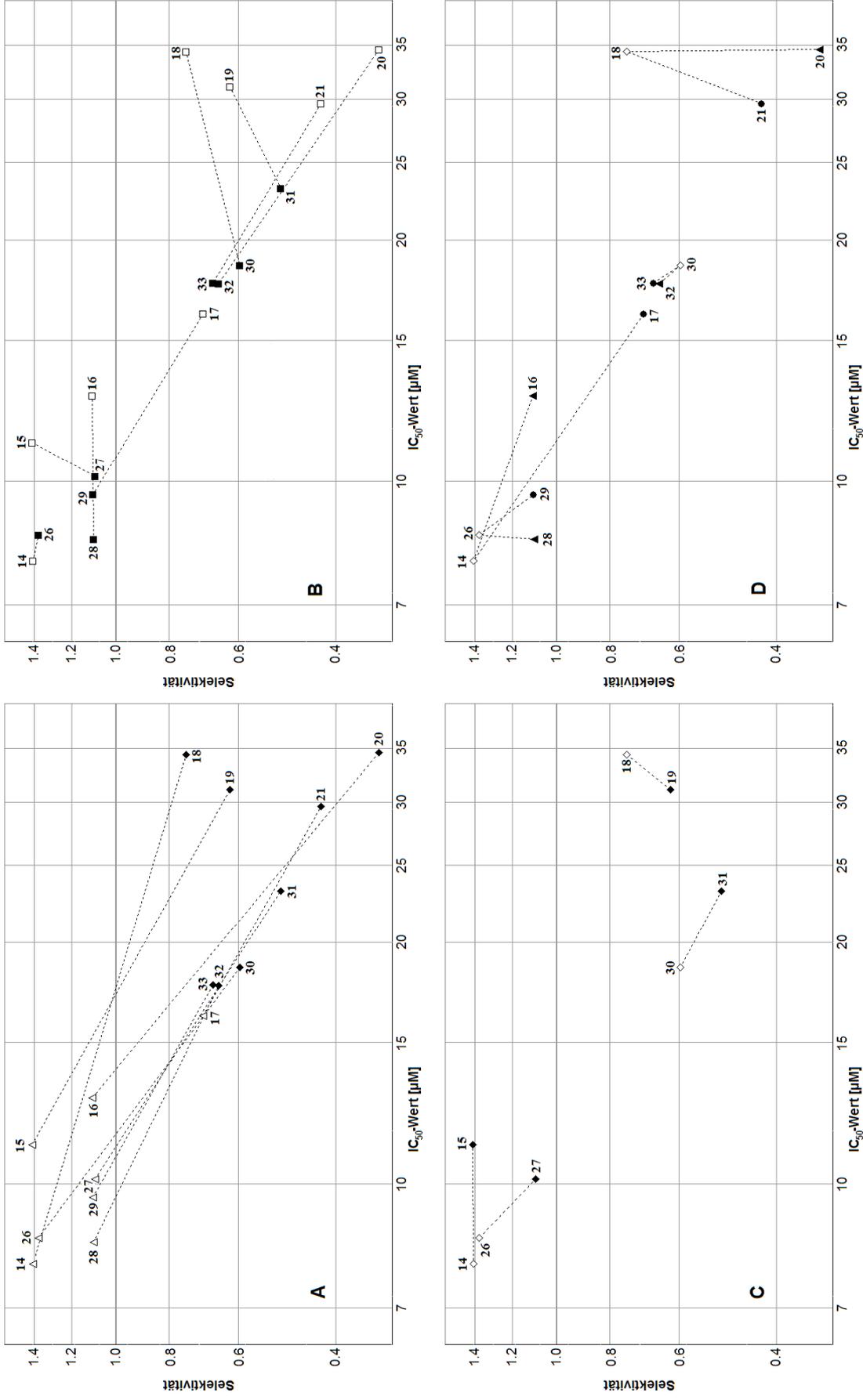


Abbildung 28: Struktur-Wirkungs-Vergleiche der Acetyl- und 3-Acetyl- (A) und 3-Acetyl- (B) und 3-Acetylverbindungen (C); B: Carbonsäuren (□) und Amide (■); C: Succinate (◇) und Glutarate (◆); D: unverzweigte (◇), 3-Methyl- (▲) und 2-Methylsuccinate (●).

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Promotion war es, Substanzen herzustellen, welche sowohl eine Betulin- oder Betulinsäurekomponente als auch eine Sulfonamidgruppe beinhalten, um CA-IX-abhängige Krebszellen von zwei Seiten anzugreifen: Die Sulfonamidgruppe soll die außenständige Carboanhydrase blockieren, während der Betulinrest in die Zelle eindringt und dort Apoptose auslöst. Die Substanzen wurden mittels chemischer Analysemethoden charakterisiert und ihre IC_{50} -Werte gegen verschiedene Krebszelllinien wurden gemessen.

Im Zuge der Arbeit wurden 32 Betulinderivate hergestellt (**1-11, 14-34**), von denen 17 (**4-11, 26-34**) eine Sulfonamidgruppe beinhalten. Der Rest besteht aus Zwischen- oder Nebenprodukten auf dem Weg dorthin. Zusätzlich wurden n-Octylsulfamate (**12, 13**) sowie ein Bernsteinsäure(taurinamid)amid (**35**) synthetisiert, um als Vergleichssubstanzen zur biologischen Evaluierung der Betulinverbindungen zu dienen. Von allen hergestellten Substanzen sind 26 (**5, 7-11, 15-17, 19-35**) noch nicht in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Von jeder Substanz wurden 1H - und ^{13}C -NMR-Messungen, Massenspektroskopien und Elementaranalysen durchgeführt, welche mit den theoretischen Erwartungen übereinstimmen. (Siehe Abschnitt 8.)

Von den Substanzen **5-35** wurden SRB-Assays zur Zytotoxizität gegen insgesamt neun verschiedene Zelllinien erstellt. Dabei zeigen die meisten der Stoffe IC_{50} -Werte um diejenigen von Betulinsäure, von etwa $10 \mu M$. Bemerkenswerte Ausreißer sind dabei das 3-Acetylbetulinsulfamat **11**, welches gegen alle getesteten Linien einen IC_{50} -Wert von unter $10 \mu M$ vorweist, sowie das Betulinsäuresulfamat **7**, welches bereits bei $4.39 \mu M$ die Zellproliferation der Linie A2780 um die Hälfte einschränkt. Auf dem anderen Ende der Skala zeigen die Betulinderivate **24** und **25** keine nachweisbare Zytotoxizität, was wohl ihrer schieren Größe zuzuschulden ist. Die Substanzen **13** und **35**, welche keine Betulinderivate sind, zeigen der Erwartung nach keine Wirkung, allerdings vermag das Octyldisulfamat **12** die Zellproliferation in einem gewissen Maß zu unterbinden. Möglicherweise spielen lysierende Eigenschaften hier eine Rolle.

Die Selektivitäten der Substanzen liegen oftmals bei oder unter einem Wert von 1 und nur in wenigen Kombinationen von Substanz und Zelllinie wird ein Index von über 2 erreicht. Interessant ist auch hier die Wirkung von **7** auf die Linie A2780 mit einem SI von 3.28, sowie das Betulincarbamat-Sulfamat **8**, das bei immerhin vier der sechs getesteten Zelllinien einen SI von über 2 zeigt, den höchsten wiederum gegenüber A2780 mit 3.04. Auch **12** zeigt wieder ein bemerkenswertes Verhalten, indem es um einiges besser gegen Tumorzellen wirkt als gegen den getesteten Mausfibroblasten.

Für die Zytotoxizität lassen sich im Falle der Acetylbetulinverbindungen mit verschiedenen Spacern Struktur-Wirkungs-Korrelationen ermitteln. Im Falle der getesteten Zelllinien A2780, MCF7, FaDu und SW1736 haben die Acetylbetulin-Sulfonamid-Verbindungen eine Tendenz zu hoher Zytotoxizität und hoher Selektivität, wenn die Acetylgruppe sich an der 3-Position des Betulins befindet und der Spacer relativ kurz aber verzweigt ist. Das Kolorektalkarzinom HT29 hingegen zeigt ein anderes Verhalten: Bei dieser Zelllinie erzielen Derivate die beste Wirkung, die von 28-Acetylbetulin ausgehen und einen kurzen, unverzweigten Spacer beinhalten, an welchen Taurinamid geknüpft ist.

7. Ausblick

Ein nächster Schritt in dieser Forschungsrichtung wäre es, Betulinverbindungen mit anderen Spacern zu synthetisieren. Zunächst könnte man in Anlehnung an diese Arbeit systematisch längere und verzweigte Disäuren an die Acetylbetuline **1** und **3** koppeln, wie Adipinsäure oder 2,2-Dimethylbernsteinsäure, dessen Betulinkonjugat bereits eine gute HIV-Suppressionswirkung zeigt [205,206]. Insbesondere Betulinverbindungen, deren 3-Position mit einer Acetylgruppe verestert ist, oder allgemein Triterpene mit einer oder mehreren Acetylgruppen am A-Ring, erweisen sich ebenfalls als besonders zytotoxisch gegenüber Tumorzellen [220,221]. Auch größere Seitengruppen wie Rhodamine haben ein beträchtliches Potential hinsichtlich der Steigerung der Toxizität unter Beibehaltung der guten Selektivität [222]. Weitere systematische Synthese mit vielversprechenden Spacern oder funktionellen Gruppen, die symmetrisch und insbesondere asymmetrisch an beide Substitutionsstellen im Betulin angebracht werden, wäre ebenfalls ein interessantes Forschungsobjekt.

Für eine medizinische Anwendung von Betulin- und Triterpenderivaten gegen Hautneoplasien bieten sich Salben an, die direkt auf die veränderte Stelle aufgetragen werden. In einigen Pilotstudien wurden Salben verschiedener Birkenrindenextrakte zur Behandlung von aktinischer Keratose durchgeführt, einer Vorstufe von Hautkrebs, in welchen jeweils um die 80% der Patienten eine Rückbildung der Keratose um mehr als 75% zeigten [25,223,224]. Außerdem eignen sich chemische oder physikalische Verkapselungen für eine *In-vivo*-Anwendung, welche die Bioverfügbarkeit von Betulinverbindungen im Körper erhöhen. Dazu zählen etwa Cyclodextrin [225], Liposome [226] oder geeignete Nanopartikel [227,228,229b].

8. Methoden und Synthese

8.1 Allgemeines zur Synthese

Die im folgenden Teil angegebenen Chemikalien und Lösungsmittel wurden, falls nicht anders beschrieben, ohne vorherige Reinigung verwendet. Dimethylformamid (DMF), Dimethylacetamid (DMA) und Pyridin wurden vor Gebrauch über 3-Å-Molsieb destilliert. Die Synthese erfolgte mit üblichen Schlenk-Techniken unter einer Stickstoff-Schutzatmosphäre.

Chromatographiesäulen wurden mit 60-Å-Kieselgel mit einer Korngröße von 63-200 µm beladen.

Dünnschichtchromatografie erfolgte auf Aluminiumplatten mit einer Beschichtung aus 60-Å-Kieselgel. Zum Nachweis der meist farblosen Substanzen wurde ein Phosphormolybdat-Farbspray verwendet, das sich bei Kontakt mit oxidierbaren Produkten beim Erhitzen blau färbt.

8.2 Analysemethoden

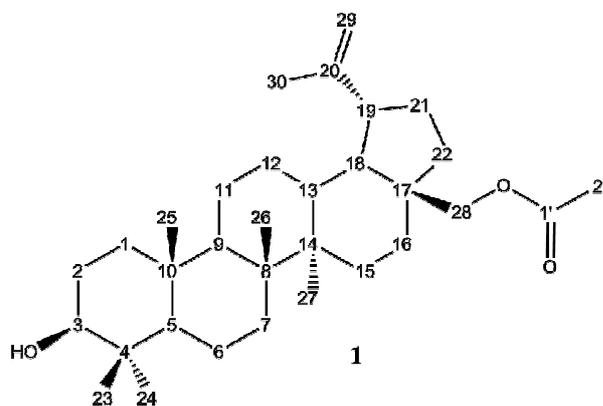
NMR-Spektren wurden auf Geräten des Typs „400 MHz VNMRS“ und „500 MHz DD2“ der Firma Agilent Technologies bei einer Temperatur von 27 °C aufgenommen. Die Arbeitsfrequenzen betragen dabei ca. 400 MHz für ¹H- und 100 MHz für ¹³C-Messungen bzw. 500 MHz für ¹H- und 125 MHz für ¹³C-Messungen. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet; die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. Die ¹³C-Spektren der Triterpenverbindungen wurden mit APT-Technik vermessen. Für eine genauere Zuordnung der NMR-Spektren der Betulinverbindungen wurden teilweise Literaturangaben zu Rate gezogen [230,231].

ESI-Massenspektroskopie wurde auf einem Thermo Finnigan LCQ-Classic in methanolischer Lösung durchgeführt.

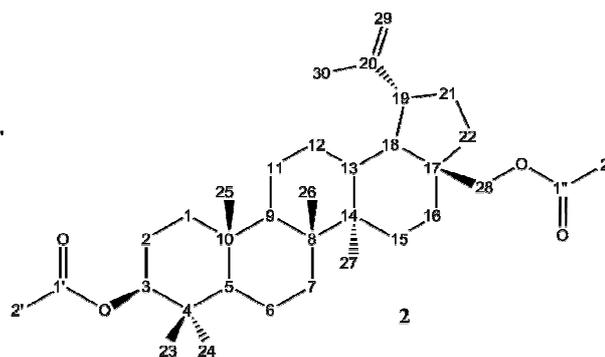
8.3 Synthesevorschriften

8.3.1 (3*S*)-3-Hydroxylup-20(29)-en-3-acetat **1** und (3*S*)-Lup-20(29)-en-3,28-diacetat **2**

Betulin (15.0 g, 33.9 mmol), DMAP (0.1 g, 0.8 mmol) und Triethylamin (5.0 mL, 3.64 g, 36.0 mmol) werden in DCM (150 mL) suspendiert und das Gemisch im Eisbad gekühlt. Unter kräftigem Rühren wird eine Lösung von Essigsäureanhydrid (3.4 mL, 3.68 g, 36.0 mmol) in DCM (30 mL) hinzuge tropft und anschließend 1 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat mit Na₂CO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck abgezogen. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt über eine Chromatographiesäule mit Petrolether / Essigester 9:1. Es entstehen **2** (3.88 g, 7.4 mmol, 22%) und **1** (5.08 g, 10.5 mmol, 31%) als farblose Kristalle.



CAS 27686-35-7



CAS 1721-69-3

Analyse von **1**:

¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 4.68 (d, 1H, ²J_{H-H} = 1.9 Hz, C29H), 4.55 (d, 1H, C29H), 4.34 (s, 1H, C3OH), 4.34 (m, 1H, C28H), 3.74 (m, 1H, C28H), 2.95 (m, 1H, C3H), 2.44 (m, 1H, C19H), 2.00 (s, 3H, C2'H₃), 1.95-0.60 (42H).

¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 171.1 (C1'), 150.3 (C20), 110.4 (C29), 77.2 (C3), 62.0 (C28), 55.3 (C5), 50.2 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.9 (C1), 38.7 (C4), 37.5 (C13), 37.1 (C10), 34.5 (C7), 34.2 (C22), 29.7 (C21), 29.4 (C16), 28.5 (C23), 27.6 (C2), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 21.2 (C2'), 20.7 (C11), 19.2 (C30), 18.4 (C6), 16.3 (C24), 16.2 (C25), 16.1 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₂H₅₂O₃, M = 484.39): 467.20 (40, [M-OH]⁺), 991.27 (100, [2M+Na]⁺).

Berechnet für C₃₂H₅₂O₃: C (79.29), H (10.81); gefunden: C (79.03), H (10.85).

Analyse von **2**:

^1H (400 MHz, CDCl_3): 4.68 (d, 1H, C29H), 4.58 (d, 1H, C29H), 4.46 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 10.2$ Hz + 5.9 Hz, C3H), 4.24 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.84 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.06 (s, 3H, C2''H₃), 2.03 (s, 3H, C2'H₃), 1.81-0.76 (42H).

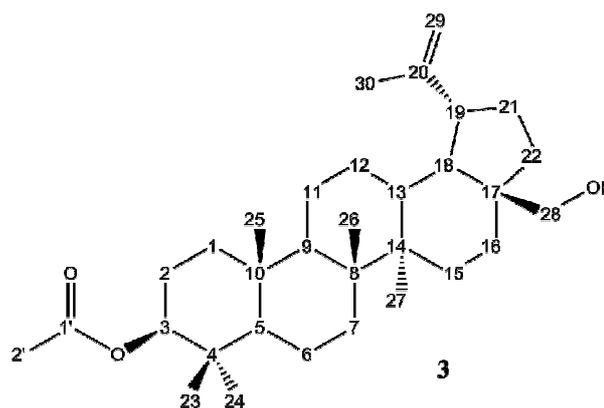
^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 171.5 (C1''), 170.9 (C1'), 150.1 (C20), 109.8 (C29), 80.8 (C3), 62.8 (C28), 55.4 (C5), 50.3 (C9), 48.7 (C18), 47.7 (C19), 46.3 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.4 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.1 (C22), 29.7 (C21), 29.6 (C16), 27.9 (C23), 27.0 (C15), 25.1 (C12), 23.6 (C2), 21.3 (C2'), 21.0 (C2''), 20.8 (C11), 19.1 (C30), 18.2 (C6), 16.5 (C24), 16.1 (C25), 16.0 (C26), 14.7 (C27).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$, M = 526.40): 467.27 (22, $[\text{M}-\text{H}_3\text{CCOO}]^+$), 1075.33 (100, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$: C (77.52), H (10.33); gefunden: C (77.69), H (10.37).

8.3.2 (3S)-28-Hydroxylup-20(29)-en-3-acetat **3**

2 (3.0 g, 5.7 mmol) wird in einem Gemisch aus Methanol (20 mL) und THF (20 mL) gelöst. Dazu wird eine katalytische Menge an Calciumhydrid gegeben. Die Mischung wird über Nacht bei RT gerührt, anschließend werden die Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in Essigester aufgenommen.



Die Suspension wird mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet, anschließend wird das Lösungsmittel erneut abgezogen. Das Rohprodukt wird per Säulenchromatografie mit Petrolether / Essigester 9:1 gereinigt. Es entsteht **3** (1.56 g, 3.2 mmol, 56%) als farblose Kristalle.

CAS 27570-20-3

^1H (500 MHz, $\text{dmsO}-d_6$): 4.65 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 2.5$ Hz, C29H), 4.53 (d, 1H, C29H), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz + 4.7 Hz, C3H), 4.20 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.4$ Hz, C28OH), 3.51 (m, 1H, C28H), 3.07 (m, 1H, C28H), 2.37 (m, 1H, C19H), 2.08 (s, 3H, C2'H₃), 1.98 (s, 3H, C2''H₃), 1.90-0.60 (42H).

^{13}C (125 MHz, $\text{dmsO}-d_6$): 170.6 (C1'), 150.8 (C20), 110.1 (C29), 80.4 (C3), 58.4 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.8 (C17), 47.8 (C19), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.2 (C13), 37.1 (C10), 34.3 (C7), 34.1 (C22), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1

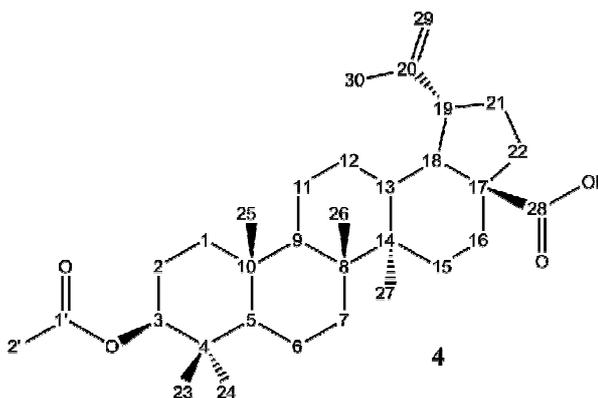
(C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2'), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.1 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₂H₅₂O₃, M = 484.39): 425.20 (28, [M-H₃CCOO]⁺), 991.33 (100, [2M+Na]⁺).

Berechnet für C₃₂H₅₂O₃: C (79.29), H (10.81); gefunden: C (78.80), H (10.87).

8.3.3 (3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-säure **4**

Betulinsäure (5.0 g, 10.9 mmol) und Essigsäureanhydrid (1.5 mL, 1.62 g, 15.9 mmol) werden in Pyridin (10 mL) gelöst und 3 h lang auf 100 °C erwärmt. Anschließend wird das auf RT abgekühlte Reaktionsgemisch mit DCM (100 mL) verdünnt und dreimal mit K₂CO₃-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische



Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt über Säulenchromatografie mit Petrolether / Essigester / NEt₃ 8:2:0.02. Das gereinigte Produkt wird schließlich nochmals in DCM (20 mL) gelöst, mit 3%iger Salzsäure (20 mL) gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel erneut abgezogen. Das Produkt **4** (1395 mg, 2.80 mmol, 26%) entsteht als weißes Pulver.

CAS 10376-50-8

¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 12.02 (s, br, 1H, COOH), 4.67 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.35 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 10.9 + 4.5 Hz, C3H), 2.92 (m, 1H, C19H), 2.21 (m, 1H, C22H), 2.10 (m, 1H, C18H), 1.97 (s, 3H, C2'H₃), 1.84-0.77 (40H).

¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 177.7 (C28), 170.5 (C1'), 150.7 (C20), 110.1 (C29), 80.4 (C3), 55.9 (C17), 55.1 (C5), 50.1 (C9), 49.0 (C18), 47.1 (C19), 42.5 (C14), 40.7 (C8), 38.2 (C1), 38.0 (C13), 37.8 (C4), 37.1 (C10), 36.8 (C22), 34.2 (C7), 32.1 (C16), 30.6 (C21), 29.7 (C15), 28.1 (C23), 25.5 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2'), 20.9 (C11), 19.4 (C30), 18.2 (C6), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.1 (C26), 14.8 (C27).

ESI-MS (-) (C₃₂H₅₀O₄, M = 498.37): 497.33 (23, [M-H]⁻), 995.20 (100, [2M-H]⁻), 1017.53 (52, [2M-2H+Na]⁻).

Berechnet für C₃₂H₅₀O₄: C (77.06), H (10.11); gefunden: C (77.31), H (10.34).

8.3.4 Sulfamylchlorid

Chlorsulfurylisocyanat (10 mL, 14.5 g, 115 mmol) wird im Eisbad vorgelegt. Dazu wird über Borsäureanhydrid getrocknete Ameisensäure (4.3 mL, 5.29 g, 115 mmol), vorsichtig und unter kräftigem Rühren zugetropft. Unter heftiger Reaktion entsteht ein weißer Schlamm. Das Eisbad wird entfernt und die Reaktion wird fortgesetzt, bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Das Produkt wird in trockenem Toluol (25 mL) gelöst, die Lösung filtriert und das Lösungsmittel vom Filtrat unter Erwärmung und bei vermindertem Druck abgezogen. Beim Abkühlen bildet das entstandene Sulfamylchlorid (12.0 g, 104 mmol, 91%) farblose, durch Toluolreste leicht bräunliche Kristalle.

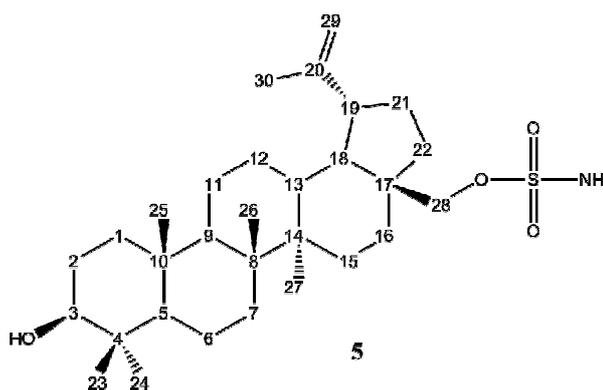
CAS 7778-42-9

8.3.5 Generelle Synthese der Sulfamate

Der entsprechende Alkohol wird in wenig DMA gelöst und dazu ein 1.5-facher Überschuss an Sulfamylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 1 h bei RT gerührt und anschließend in kräftig gerührtes Eiswasser (200 mL) gegossen. Die Suspension wird zweimal mit Essigester (80 mL) ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Dann wird das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt per Säulenchromatografie.

8.3.6 (3*S*)-3-Hydroxylup-20(29)-en-28-sulfamat **5**

Betulin (500 mg, 1.13 mmol) wird entsprechend Methode 8.3.5 in DMA (5 mL) mit Sulfamylchlorid (170 mg, 1.47 mmol) umgesetzt. Die chromatografische Reinigung erfolgt mit Petroläther / Essigester 8:2. Es entsteht **5** (210 mg, 0.40 mmol, 36%) als blassgelbes Pulver.



¹H (400 MHz, dmsd-d₆): 7.39 (s, 2H, NH₂), 4.68 (d, 1H, ²J_{H-H} = 1.7 Hz, C29H), 4.56 (d, 1H, C29H), 4.11 (d, 1H, ²J_{H-H} = 9.6 Hz, C28H), 3.74 (d, 1H, ²J_{H-H} = 9.5 Hz, C28H), 2.96 (m, 1H, C3H), 2.48 (m, 1H, C19H), 2.00-0.64 (42H).

¹³C (100 MHz, dmsd-d₆): 150.1 (C20), 110.5 (C29), 77.2 (C3), 67.8 (C28), 55.3 (C5), 50.2 (C9), 48.6 (C18), 47.6 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.9 (C4), 38.7 (C1), 37.6

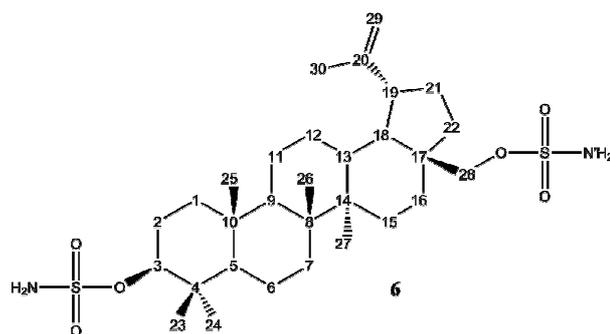
(C13), 37.1 (C10), 34.2 (C7), 34.1 (C22), 29.3 (C21), 29.3 (C16), 28.5 (C23), 27.6 (C2), 26.7 (C15), 25.2 (C12), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.4 (C6), 16.3 (C24), 16.2 (C25), 16.2 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (-) (C₃₀H₅₁NO₄S, M = 521.36): 520.47 (100, [M-H]⁻), 565.87 (46, [M+HCO₂]⁻).

Berechnet für C₃₀H₅₁NO₄S: C (69.00), H (9.85), N (2.68), S (6.14); gefunden: C (68.09), H (9.67), N (2.30), S (6.11).

8.3.7 (3*S*)-Lup-20(29)-en-3,28-disulfamat **6**

Betulin (500 mg, 1.13 mmol) wird entsprechend Methode 8.3.5 in DMA (5 mL) mit Sulfamylchlorid (350 mg, 3.40 mmol) umgesetzt. Nach chromatografischer Reinigung mit Petrolether / Essigester 7:3 erhält man **6** (453 mg, 0.75 mmol, 66%) als blassgelbes, amorphes Pulver.



CAS 844494-28-6

¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 7.40 (s, 2H, N'H₂), 7.31 (s, 2H, NH₂), 4.69 (d, 1H, ²J_{H-H} = 1.7 Hz, C29H), 4.56 (d, 1H, C29H), 4.11 (d, 1H, ²J_{H-H} = 9.6 Hz, C28H), 3.97 (m, 1H, C3H), 3.74 (d, 1H, ²J_{H-H} = 9.5 Hz, C28H), 2.41 (m, 1H, C19H), 1.97-0.73 (42H).

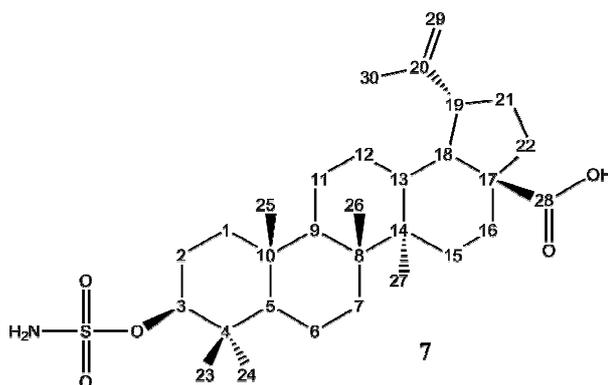
¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 150.1 (C20), 110.5 (C29), 88.1 (C3), 67.8 (C28), 55.5 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.6 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.8 (C8), 38.6 (C4), 38.4 (C1), 37.6 (C13), 36.9 (C10), 34.1 (C7), 34.1 (C22), 29.3 (C21), 29.3 (C16), 28.1 (C23), 26.8 (C15), 25.1 (C12), 24.3 (C2), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.6 (C24), 16.2 (C25), 16.1 (C26), 14.8 (C27).

ESI-MS (-) (C₃₀H₅₂N₂O₆S₂, M = 600.34): 599.52 (100, [M-H]⁻), 635.33 (27, [M+Cl]⁻).

Berechnet für C₃₀H₅₂N₂O₆S₂: C (59.97), H (8.72), N (4.66), S (10.67); gefunden: C (60.79), H (9.08), N (4.53), S (8.92).

8.3.8 (3*S*)-3-Sulfamyloxylup-20(29)-en-28-säure **7**

Betulinsäure (300 mg, 0.66 mmol) wird entsprechend Methode 8.3.5 in DMA (4 mL) umgesetzt. Die Chromatografie erfolgt mit Chloroform / Methanol 19:1 als Laufmittel. Es entsteht **7** (60 mg, 0.11 mmol, 17%) als blassgelbes Pulver.



^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 12.03 (s, br, 1H, COOH), 7.30 (s, 2H, NH_2), 4.67 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.8 \text{ Hz}$, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 3.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.9 \text{ Hz} + 4.4 \text{ Hz}$, C3H), 2.92 (m, 1H, C19H), 2.21 (m, 1H, C22H), 2.10 (m, 1H, C18H), 1.94-0.60 (40H).

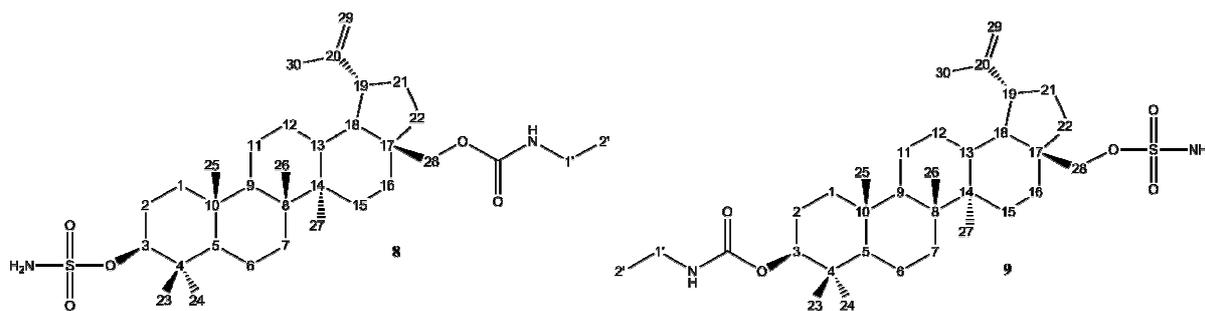
^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 177.7 (C28), 150.7 (C20), 110.1 (C29), 88.1 (C3), 55.9 (C17), 55.5 (C5), 50.2 (C9), 49.0 (C18), 47.1 (C19), 42.5 (C14), 40.7 (C8), 38.6 (C4), 38.4 (C1), 38.0 (C13), 37.0 (C10), 36.8 (C22), 34.3 (C7), 32.1 (C16), 30.6 (C21), 29.6 (C15), 28.1 (C23), 25.5 (C12), 24.3 (C2), 20.9 (C11), 19.4 (C30), 18.3 (C6), 16.6 (C24), 16.3 (C25), 16.1 (C26), 14.7 (C27).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_5\text{S}$, $M = 535.34$): 534.41 (100, $[\text{M-H}]^-$).

Berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}_5\text{S}$: C (67.26), H (9.22), N (2.61), S (5.98); gefunden: C (67.27), H (9.62), N (3.53), S (5.52).

8.3.9 (3*S*)-28-(Ethylaminocarbonyloxy)lup-20(29)-en-3-sulfamat **8** und (3*S*)-3-(Ethylaminocarbonyloxy)lup-20(29)-en-28-sulfamat **9**

Betulin (1.0 g, 2.26 mmol) wird in trockenem Chloroform (50 mL) gelöst und zusammen mit Ethylisocyanat (460 μL , 420 mg, 5.90 mmol) für 6 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von Wasser (40 mL) unterbrochen und die wässrige Phase mit Essigester (40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel abgezogen. Der entstehende Feststoff wird entsprechend Methode 8.3.5 mit Sulfamylchlorid (350 mg, 3.03 mmol) in DMA (5 mL) umgesetzt. Die Reinigung erfolgt mit einem Laufmittel aus Petrolether / Essigester 8:2. Es entstehen **8** (201 mg, 0.34 mmol, 15%) und **9** (31 mg, 0.05 mmol, 2.3%) als weiße, amorphe Pulver.



Analyse von **8**:

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.30 (s, 2H, NH_2), 6.98 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.4$ Hz, NH), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, $\text{C}29\text{H}$), 4.54 (d, 1H, $\text{C}29\text{H}$), 4.18 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz, $\text{C}28\text{H}$), 3.97 (m, 1H, $\text{C}3\text{H}$), 3.67 (d, $^2J_{\text{H-H}} = 10.7$ Hz, 1H, $\text{C}28\text{H}$), 2.98 (m, 2H, $\text{C}1'\text{H}_2$), 2.43 (m, 1H, $\text{C}19\text{H}$), 0.98 (t, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{C}2'\text{H}_3$), 1.99-0.73 (42H).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 156.9 (CONH), 150.4 ($\text{C}20$), 110.3 ($\text{C}29$), 88.0 ($\text{C}3$), 61.6 ($\text{C}28$), 55.5 ($\text{C}5$), 50.1 ($\text{C}9$), 48.7 ($\text{C}18$), 47.6 ($\text{C}19$), 46.8 ($\text{C}17$), 42.7 ($\text{C}14$), 40.8 ($\text{C}8$), 38.6 ($\text{C}4$), 38.4 ($\text{C}1$), 37.4 ($\text{C}13$), 36.9 ($\text{C}10$), 35.5 ($\text{C}1'$), 34.6 ($\text{C}7$), 34.1 ($\text{C}22$), 29.8 ($\text{C}21$), 29.5 ($\text{C}16$), 28.1 ($\text{C}23$), 27.1 ($\text{C}15$), 25.2 ($\text{C}12$), 24.3 ($\text{C}2$), 20.8 ($\text{C}11$), 19.2 ($\text{C}30$), 18.3 ($\text{C}6$), 16.6 ($\text{C}24$), 16.2 ($\text{C}25$), 16.1 ($\text{C}26$), 15.5 ($\text{C}2'$), 14.5 ($\text{C}27$).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, $M = 592.40$): 521.04 (100, $[\text{M}-\text{CONHC}_2\text{H}_5]^-$), 556.59 (50, $[\text{M}-\text{CONHC}_2\text{H}_5+\text{HCl}]^-$), 591.72 (33, $[\text{M}-\text{H}]^-$).

Berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C (66.85), H (9.52), N (4.73), S (5.41); gefunden: C (66.64), H (9.31), N (4.44), S (5.77).

Analyse von **9**:

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.38 (s, 2H, NH_2), 6.88 (m, br, 1H, NH), 4.68 (m, 1H, $\text{C}29\text{H}$), 4.56 (m, 1H, $\text{C}29\text{H}$), 4.17 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 8.2$ Hz, $\text{C}28\text{H}$), 4.11 (m, 1H, $\text{C}3\text{H}$), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.2$ Hz, $\text{C}28\text{H}$), 2.96 (m, 2H, $\text{C}1'\text{H}_2$), 2.40 (m, 1H, $\text{C}19\text{H}$), 1.97-0.60 (45H).

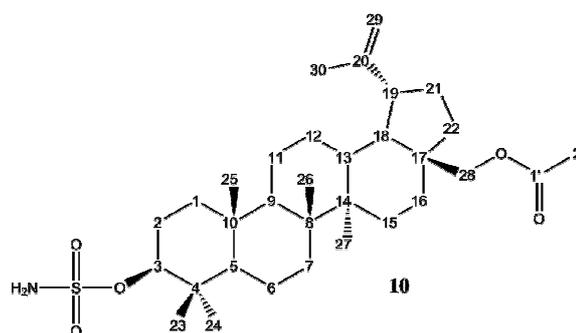
^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 170.7 (CONH), 150.8 ($\text{C}20$), 110.3 ($\text{C}29$), 77.2 ($\text{C}3$), 60.1 ($\text{C}28$), 55.3 ($\text{C}5$), 50.1 ($\text{C}9$), 48.6 ($\text{C}18$), 47.8 ($\text{C}19$), 46.5 ($\text{C}17$), 42.7 ($\text{C}14$), 40.9 ($\text{C}8$), 38.9 ($\text{C}1$), 38.1 ($\text{C}4$), 37.6 ($\text{C}13$), 37.0 ($\text{C}10$), 35.4 ($\text{C}1'$), 34.4 ($\text{C}7$), 34.1 ($\text{C}22$), 29.8 ($\text{C}21$), 29.5 ($\text{C}16$), 28.5 ($\text{C}23$), 27.6 ($\text{C}2$), 26.8 ($\text{C}15$), 25.1 ($\text{C}12$), 20.8 ($\text{C}11$), 19.2 ($\text{C}30$), 18.2 ($\text{C}6$), 16.3 ($\text{C}24$), 16.2 ($\text{C}25$), 16.1 ($\text{C}26$), 14.9 ($\text{C}2'$), 14.5 ($\text{C}27$).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, $M = 592.40$): 591.47 (100, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 627.07 (42, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$).

Berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C (66.85), H (9.52), N (4.73), S (5.41); gefunden: C (66.18), H (9.64), N (3.65), S (4.45).

8.3.10 (3*S*)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-sulfamat **10**

1 (250 mg, 0.52 mmol) wird gemäß Methode 8.3.5 in DMA (2 mL) umgesetzt. Die Reinigung erfolgt mit Petrolether / Essigester 7:3. Man erhält **10** (83 mg, 0.15 mmol, 29%) als blassgelbes, amorphes Pulver.



^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.30 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.8$ Hz, C29H), 4.55 (d, 1H, C29H), 4.23 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.8$ Hz, C28H), 3.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 12.0$ Hz + 4.4 Hz, C3H), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, C28H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.00 (s, 3H, C2'H₃), 1.95-0.54 (42H).

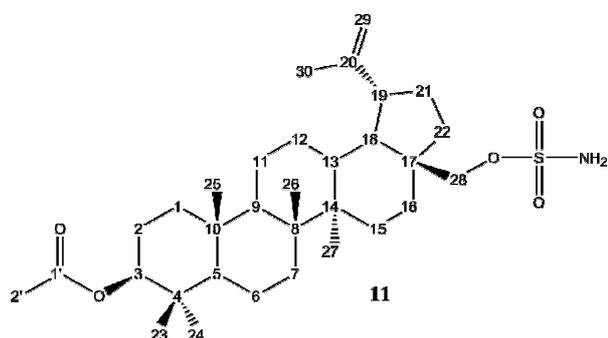
^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 171.1 (C1'), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 88.0 (C3), 62.0 (C28), 55.5 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.8 (C8), 38.6 (C4), 38.4 (C1), 37.5 (C13), 36.9 (C10), 34.5 (C22), 34.1 (C7), 29.7 (C21), 29.4 (C16), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 24.3 (C2), 21.2 (C2'), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.3 (C6), 16.6 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.8 (C27).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{NO}_5\text{S}$, $M = 563.37$): 562.40 (100, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 607.93 (60, $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$).

Berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{NO}_5\text{S}$: C (68.17), H (9.48), N (2.48), S (5.69); gefunden: C (63.20), H (8.70), N (2.03), S (5.17).

8.3.11 (3*S*)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-sulfamat **11**

3 (200 mg, 0.41 mmol) wird entsprechend Methode 8.3.5 in DMA (2 mL) umgesetzt. Die Reinigung erfolgt mit einem Laufmittel aus Petrolether / Essigester 7:3. Es entsteht **11** (164 mg, 0.29 mmol, 71%) als weißes, amorphes Pulver.



^1H (500 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.41 (s, 2H, NH_2), 4.69 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, C29H), 4.57 (d, 1H, C29H), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz + 4.7 Hz, C3H), 4.11 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.2$ Hz, C28H), 3.75 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.7$ Hz, C28H), 2.41 (m, 1H, C19H), 1.98 (s, 3H, C2'H₃), 1.95-0.65 (42H).

^{13}C (125 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 170.6 (C1'), 150.1 (C20), 110.5 (C29), 80.4 (C3), 67.8 (C28), 55.0 (C5), 49.9 (C9), 48.6 (C18), 47.6 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1),

37.8 (C4), 37.6 (C13), 37.0 (C10), 34.1 (C7), 34.1 (C22), 29.3 (C21), 29.3 (C16), 28.1 (C23), 26.9 (C15), 25.1 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2'), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.1 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (-) (C₃₂H₅₃NO₅S, M = 563.37): 562.59 (99, [M-H]⁻), 598.33 (100, [M+Cl]⁻).

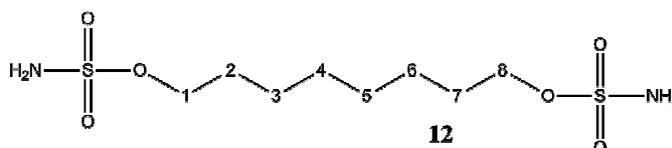
Berechnet für C₃₂H₅₃NO₅S: C (68.17), H (9.48), N (2.48), S (5.69); gefunden: C (68.03), H (9.48), N (2.34), S (6.39).

8.3.12 1,8-Octyldisulfamat **12**

1,8-Octandiol (200 mg, 1.37 mmol)

wird gemäß Methode 8.3.5 mit Sulfamylchlorid (460 mg, 4.0 mmol)

in DMA (2.5 mL) umgesetzt. Die



Reinigung des Rohprodukts erfolgt mit Petrolether / Essigester 7:3 als Laufmittel. Es entsteht **12** (352 mg, 1.16 mmol, 84%) als weißes Pulver.

CAS 98296-10-7

¹H (500 MHz, dms_o-d₆): 7.35 (s, 4H, N1H₂ + N2H₂), 3.98 (t, 4H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, C1H₂ + C8H₂), 1.61 (m, 4H, C2H₂ + C7H₂), 1.30 (m, 8H, C3H₂ + C4H₂ + C5H₂ + C6H₂).

¹³C (125 MHz, dms_o-d₆): 69.5 (C1 + C8), 28.8 (C4 + C5), 28.7 (C2 + C7), 25.4 (C3 + C6).

ESI-MS (+) (C₈H₂₀N₂O₆S₂, M = 304.08): 327.07 (100 [M+Na]⁺).

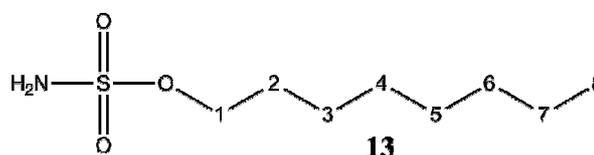
Berechnet für C₈H₂₀N₂O₆S₂: C (31.57), H (6.62), N (9.20), S (21.07); gefunden: C (32.01), H (6.63), N (9.22), S (20.69).

8.3.13 1-Octylsulfamat **13**

1-Octanol (0.2 mL, 163 mg, 1.25 mmol)

wird in DMA (2 mL) gelöst und mit Sulfamylchlorid (200 mg, 1.73 mmol)

entsprechend Methode 8.3.5 umgesetzt.



Das Produkt wird über Säulenchromatografie mit Petrolether / Essigester 8:2 gereinigt. **13** (97 mg, 0.46 mmol, 37%) entsteht als weißer, wachsartiger Feststoff.

CAS 282725-75-1

¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 7.35 (s, 2H, NH₂), 3.98 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, C1H₂), 1.61 (m, 2H, C2H₂), 1.24 (m, 10H, C3H₂ + C4H₂ + C5H₂ + C6H₂ + C7H₂), 0.85 (t, 3H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, C8H₃).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 69.4 (C1), 31.6 (C6), 29.0 (C5), 28.9 (C4), 28.8 (C2), 25.5 (C3), 22.5 (C7), 14.4 (C8).

ESI-MS (+) ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$, $M = 209.11$): 231.88 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 263.62 (49, $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$).

ESI-MS (-) ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$, $M = 209.11$): 95.97 (58, $[\text{H}_2\text{NSO}_3]^-$), 208.07 (100, $[\text{M}-\text{H}]^-$).

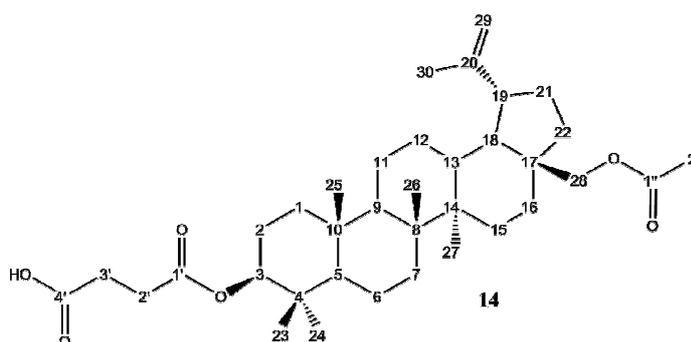
Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$: C (45.91), H (9.15), N (6.69), S (15.32); gefunden: C (47.54), H (9.33), N (6.32), S (14.03).

8.3.14 Generelle Synthese der Betulinhalbester

Der entsprechende Alkohol wird mit einem fünffachen Überschuss des entsprechenden Säureanhydrids und einer stöchiometrischen Menge an DMAP in Pyridin gelöst. Das Gemisch wird 2 h unter Rückfluss gekocht und weiter bei RT über Nacht gerührt, anschließend in kräftig gerührtes Eiswasser (400 mL) gegossen. 10%ige Salzsäure (50 mL) wird hinzugegeben und die entstandene Suspension zweimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird abgezogen. Die Reinigung erfolgt über Säulenchromatografie. Abschließend wird das gereinigte Produkt nochmals in Essigester (10 mL) aufgenommen und mit 3%iger Salzsäure (10 mL) gewaschen, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet, und das Lösungsmittel abgezogen.

8.3.15 4-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-4-oxobutansäure **14**

1 (2.0 g, 4.52 mmol), Bernstein-säureanhydrid (2.0 g, 20.0 mmol) und DMAP (560 mg, 4.58 mmol) werden in Pyridin (25 mL) gemäß Methode 8.3.14 umgesetzt. Gereinigt wird das Rohprodukt über Säulenchromatografie mit



DCM / Methanol 15:1. Es entsteht **14** (1.48 g, 2.53 mmol, 56%) als weißer, amorpher Feststoff.

CAS 887906-42-5

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 12.15 (s, br, 1H, COOH), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, C29H), 4.55 (d, 1H, C29H), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.24 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz,

C28H), 3.74 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.0$ Hz, C28H), 2.47 (m, 5H, C19H + C2'H₂ + C3'H₂), 2.07 (s, 3H, C2''H₃), 2.00-0.77 (42H).

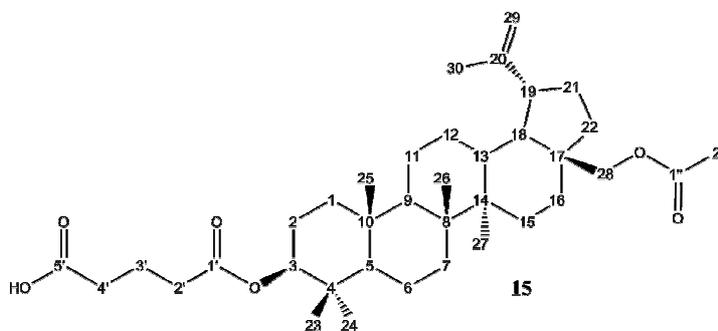
¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 173.8 (C4'), 172.0 (C1'), 171.1 (C1''), 150.3 (C20), 110.4 (C29), 80.4 (C3), 62.0 (C28), 55.3 (C5), 49.9 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.8 (C8), 38.2 (C4), 37.9 (C1), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.1 (C22), 29.7 (C21), 29.6 (C3'), 29.4 (C16), 29.2 (C2'), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.2 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (-) (C₃₆H₅₆O₆, M = 584.41): 584.16 (100, [M-H]⁻), 1167.73 (96, [2M-H]⁻).

Berechnet für C₃₆H₅₆O₆: C (73.93), H (9.65); gefunden: C (71.63), H (9.42).

8.3.16 5-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-5-oxopentansäure **15**

1 (500 mg, 1.13 mmol), Glutarsäureanhydrid (630 mg, 5.52 mmol) und DMAP (140 mg, 1.15 mmol) werden gemäß Methode 8.3.14 in Pyridin (10 mL) umgesetzt. Die Reinigung erfolgt mit DCM / Methanol / NEt₃ 15:1:0.03. Es entsteht **15** (336 mg, 0.56 mmol, 50%) als weißer, amorpher Feststoff.



¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 4.67 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{H-H} = 11.1$ Hz + 4.9 Hz, C3H), 4.22 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.0$ Hz, C28H), 3.74 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.3$ Hz, C28H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.29 (m, 2H, C3'H₂), 2.21 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 7.4$ Hz, C4'H₂), 1.99 (s, 3H, C2''H₃), 1.71 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 7.3$ Hz, C2'H₂), 1.94-0.77 (42H).

¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 174.4 (C5'), 172.5 (C1'), 171.0 (C1''), 150.2 (C20), 110.3 (C29), 80.3 (C3), 61.9 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.4 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 33.6 (C2'), 33.2 (C4'), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.1 (C12), 23.8 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 20.6 (C3'), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

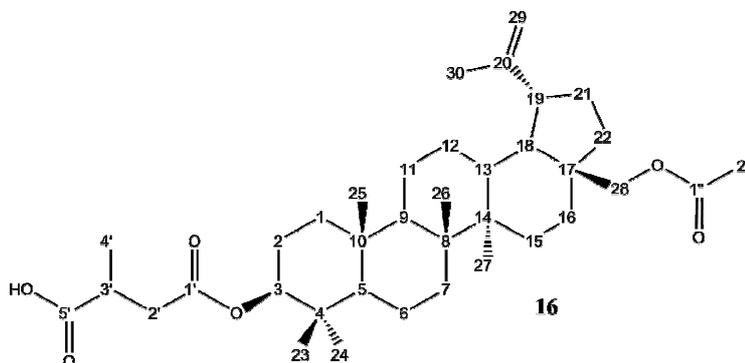
ESI-MS (+) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 467.27 (30, [M-HOOC(CH₂)₃COO]⁺), 621.27 (100, [M+Na]⁺).

ESI-MS (-) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 597.27 (100, [M-H]⁻), 643.13 (51, [M+HCO₂]⁻).

Berechnet für C₃₇H₅₈O₆: C (74.21), H (9.76); gefunden: C (74.01), H (9.60).

8.3.17 4-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-2-methyl-4-oxobutansäure **16** und 4-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-3-methyl-4-oxobutansäure **17**

1 (1.0 g; 2.26 mmol),
Methylbernsteinsäureanhydrid
(1.26 g, 11.0 mmol) und DMAP
(280 mg, 2.30 mmol) werden
nach Methode 8.3.14 in Pyridin
(15 mL) umgesetzt. Die
Aufreinigung erfolgt mit DCM /



Methanol / NEt_3 19:1:0.04. Es entstehen **16** (403 mg, 0.67 mmol, 30%) und **17** (165 mg, 0.28 mmol, 12%) als weiße, amorphe Feststoffe.

Analyse von **16**:

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 4.67 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, C29H), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.23 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.73 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 2.68 (m, 1H, C3'H), 2.54 (m, 1H, C2'H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.34 (m, 1H, C2'H), 1.99 (s, 3H, C2''H₃), 1.08 (d, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, C4'H₃), 1.94-0.76 (42H).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 176.7 (C5'), 171.5 (C1'), 171.0 (C1''), 150.2 (C20), 110.3 (C29), 80.4 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.4 (C17), 42.7 (C14), 40.8 (C8), 38.2 (C1), 38.1 (C2'), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 35.9 (C3'), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.1 (C12), 23.7 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 17.2 (C4'), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

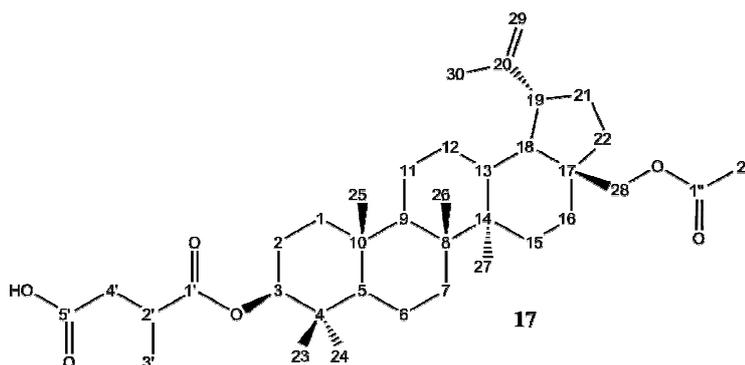
ESI-MS (+) ($\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$, $M = 598.42$): 467.27 (31, $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_4]^+$), 621.33 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$, $M = 598.42$): 597.27 (100, $[\text{M}-\text{H}]^-$), 643.07 (73, $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$), 665.27 (21, $[\text{M}+\text{NaCO}_2]^-$).

Berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$: C (74.21), H (9.76); gefunden: C (73.09), H (9.62).

Analyse von **17**:

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 4.67 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.4$ Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.23



(d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.73 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 2.69 (m, 1H, C2'H), 2.45 (m, 1H, C4'H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.31 (m, 1H, C4'H), 1.99 (s, 3H, C2''H₃), 1.10 (d, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, C3'H₃), 1.94-0.76 (42H).

^{13}C (100 MHz, dms O-d_6): 174.8 (C1'), 173.4 (C5'), 171.1 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.2 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.4 (C17), 42.7 (C14), 40.8 (C8), 38.1 (C1), 37.9 (C4), 37.8 (C4'), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 36.2 (C2'), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 29.7 (C21), 29.4 (C16), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.1 (C12), 23.7 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.1 (C6), 17.4 (C3'), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

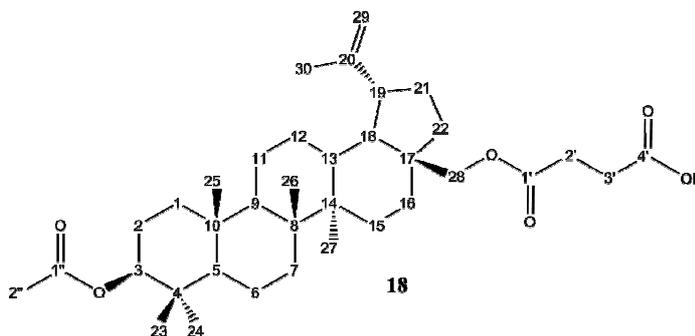
ESI-MS (+) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 467.27 (43, [M-C₅H₇O₄]⁺), 621.33 (100, [M+Na]⁺), 637.33 (22, [M+K]⁺).

ESI-MS (-) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 597.33 (100, [M-H]⁻), 643.00 (59, [M+HCO₂]⁻).

Berechnet für C₃₇H₅₈O₆: C (74.21), H (9.76); gefunden: C (74.36), H (9.80).

8.3.18 4-((3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-4-oxobutansäure **18**

3 (1.0 g, 2.26 mmol), Bernstein-säureanhydrid (1.1 g, 11.0 mmol) und DMAP (300 mg, 2.46 mmol) werden gemäß Methode 8.3.14 in Pyridin (15 mL) umgesetzt. Die Reinigung erfolgt mit DCM / Methanol / NEt₃ 15:1:0.03 als



Laufmittel. **18** (888 mg, 1.52 mmol, 67%) entsteht als weißer, amorpher Feststoff.

CAS 297172-70-4

^1H (500 MHz, dms O-d_6): 4.69 (d, 1H, C29H), 4.55 (d, 1H, C29H), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz + 4.6 Hz, C3H), 4.24 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, C28H), 3.77 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz, C28H), 2.45 (m, 5H, C19H + C2'H₂ + C3'H₂), 1.97 (s, 3H, C2''H₃), 1.90-0.79 (42H).

^{13}C (125 MHz, dms O-d_6): 173.9 (C4'), 172.7 (C1'), 170.4 (C1''), 150.2 (C20), 110.3 (C29), 80.3 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.7 (C18), 47.5 (C19), 46.6 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.3 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.1 (C22), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 29.5 (C3'), 29.5 (C2'), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₆H₅₆O₆, M = 584.41): 607.33 (100, [M+Na]⁺).

ESI-MS (-) (C₃₆H₅₆O₆, M = 584.41): 583.20 (100, [M-H]⁻).

Berechnet für C₃₆H₅₆O₆: C (73.93), H (9.65); gefunden: C (72.05), H (9.42).

8.3.19 5-((3*S*)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-5-oxopentansäure **19**

Gemäß Methode 8.3.14 werden

3 (500 mg, 1.13 mmol),

Glutarsäureanhydrid (630 mg,

5.52 mmol) und DMAP

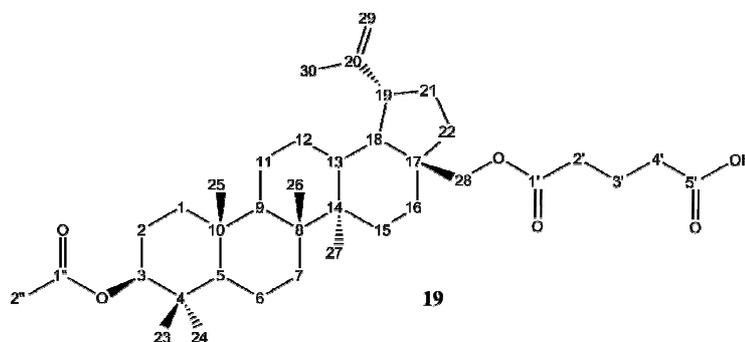
(140 mg, 1.15 mmol) in Pyridin

(10 mL) umgesetzt. Das

Rohprodukt wird chromato-

grafisch mit DCM / Methanol / NEt₃ 15:1:0.03 gereinigt. **19** (424 mg, 0.71 mmol, 63%)

entsteht als weißer, amorpher Feststoff.



¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 4.67 (d, ²J_{H-H} = 1.4 Hz, C29H), 4.53 (d, C29H), 4.34 (dd, ³J_{H-H} = 11.1 Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.25 (d, ²J_{H-H} = 11.1 Hz, C28H), 3.75 (d, ²J_{H-H} = 11.0 Hz, C28H), 2.42 (m, C19H), 2.32 (m, C3'H₂), 2.21 (t, ³J_{H-H} = 7.4 Hz, C4'H₂), 1.96 (s, C2''H₃), 1.72 (t, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, C2'H₂), 1.92-0.77 (42H).

¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 174.4 (C5'), 173.1 (C1'), 170.4 (C1''), 150.2 (C20), 110.3 (C29), 80.3 (C3), 61.9 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.8 (C8), 38.3 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 33.3 (C2'), 33.2 (C4'), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.3 (C2''), 20.8 (C11), 20.5 (C3'), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 621.40 (100, [M+Na]⁺).

ESI-MS (-) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 597.27 (100, [M-H]⁻), 643.00 (22, [M+HCO₂]⁻).

Berechnet für C₃₇H₅₈O₆: C (74.21), H (9.76); gefunden C (72.96), H (9.63).

8.3.20 4-((3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-2-methyl-4-oxobutansäure **20** und 4-((3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-3-methyl-4-oxobutansäure **21**

3 (1.0 g; 2.26 mmol),

Methylbernsteinsäureanhydrid

(1.26 g, 11.0 mmol) und DMAP

(280 mg, 2.30 mmol) werden

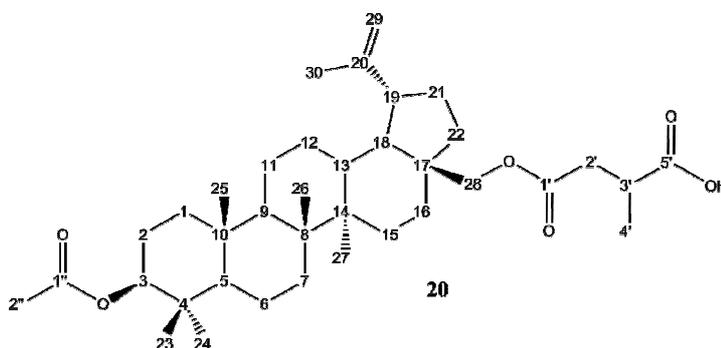
gemäß Methode 8.3.14 in Pyridin

(15 mL) umgesetzt. Die

Reinigung erfolgt mit DCM /

Methanol / NEt₃ 19:1:0.04 als Laufmittel. Es entstehen **20** (375 mg, 0.63 mmol, 28%)

und **21** (174 mg, 0.29 mmol, 13%) als weiße, amorphe Feststoffe.



Analyse von **20**:

¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 4.67 (d, 1H, ²J_{H-H} = 1.4 Hz, C29H), 4.53 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.1 Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.23 (d, 1H, ²J_{H-H} = 11.0 Hz, C28H), 3.74 (d, 1H, ²J_{H-H} = 11.0 Hz, C28H), 2.69 (m, 1H, C3'H), 2.56 (m, 1H, C2'H), 2.41 (m, 1H, C19H), 2.38 (m, 1H, C2'H), 1.96 (s, 3H, C2''H₃), 1.08 (d, 3H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, C4'H₃), 1.94-0.77 (42H).

¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 176.7 (C5'), 172.1 (C1'), 170.5 (C1''), 150.2 (C20), 110.3 (C29), 80.3 (C3), 62.1 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.7 (C2'), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 35.8 (C3'), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 29.6 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 17.3 (C4'), 16.8 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 621.40 (100, [M+Na]⁺).

ESI-MS (-) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 597.27 (100, [M-H]⁻), 642.93 (21, [M+HCO₂]⁻).

Berechnet für C₃₇H₅₈O₆: C (74.21), H (9.76); gefunden: C (74.36), H (9.94).

Analyse von **21**:

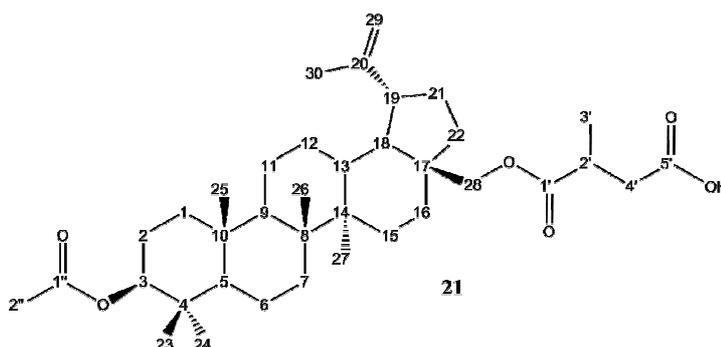
¹H (500 MHz, dms_o-d₆): 4.70 (d,

1H, C29H), 4.55 (d, 1H, C29H),

4.36 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.6 Hz + 4.6

Hz, C3H), 4.25 (m, 1H, C28H),

3.75 (m, 1H, C28H), 2.76 (m, 1H,



C2'H), 2.50 (m, 1H, C4'H), 2.45 (m, 1H, C19H), 2.37 (m, 1H, C4'H), 1.98 (s, 3H, C2''H₃), 1.11 (d, 3H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, C3'H₃), 1.92-0.79 (42H).

¹³C (125 MHz, dms_o-d₆): 175.4 (C1'), 173.3 (C5'), 170.5 (C1''), 150.3 (C20), 110.3 (C29), 80.3 (C3), 62.1 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.7 (C18), 47.5 (C19), 46.6 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.7 (C4'), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 36.0 (C2'), 34.4 (C7), 34.0 (C22), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.8 (C11), 19.3 (C30), 18.2 (C6), 17.3 (C3'), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 621.40 (100, [M+Na]⁺).

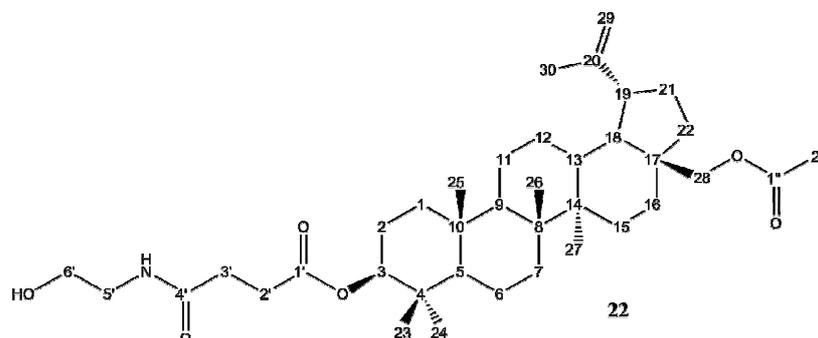
ESI-MS (-) (C₃₇H₅₈O₆, M = 598.42): 597.20 (100, [M-H]⁻).

Berechnet für C₃₇H₅₈O₆: C (74.21), H (9.76); gefunden: C (72.39), H (9.60).

8.3.21 Generelle Synthese der Amidoalkohole und Sulfonamide

Die entsprechende Carbonsäure wird zusammen mit einem Überschuss DIPEA in DMF (3 mL) gelöst. Unter Rühren wird bei RT zunächst eine stöchiometrische Menge an HOBT, gelöst in DMF (2 mL), hinzugegeben, anschließend eine stöchiometrische Menge an HATU, gelöst in DMF (3 mL), und nach einer Aktivierungszeit von 10 min eine stöchiometrische Menge des jeweiligen Amins, gelöst in DMF (2 mL). Die Reaktionslösung wird über Nacht gerührt, dann wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Der Rückstand wird in Essigester (60 mL) aufgenommen und zunächst mit 5%iger Salzsäure (50 mL), dann mit K₂CO₃-Lösung (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel abgezogen und das verbliebene Produkt chromatografisch mit DCM / Methanol 15:1 als Laufmittel gereinigt.

8.3.22 4-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-4-oxobutansäure-
(2-hydroxyethyl)amid **22**



14 (250 mg, 0.43 mmol) wird gemäß Methode 8.3.21 mit DIPEA (75 μ L, 56.9 mg, 0.44 mmol), HOBt (57.7 mg, 0.43 mmol), HATU (162 mg, 0.43 mmol) und 2-Aminoethanol (27 μ L, 27.5 mg, 0.45 mmol) umgesetzt. Es entsteht **22** (194 mg, 0.31 mmol, 72%) als weißer, amorpher Feststoff.

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.81 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz, CONH), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 2.0$ Hz, C29H), 4.61 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.5$ Hz, OH), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz + 4.9 Hz, C3H), 4.23 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz, C28H), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.35 (m, 2H, C5'H₂), 3.07 (m, 2H, C6'H₂), 2.44 (m, 3H, C19H + C2'H₂), 2.33 (m, 2H, C3'H₂), 2.00 (s, 3H, C2''H₃), 1.88-0.76 (42H).

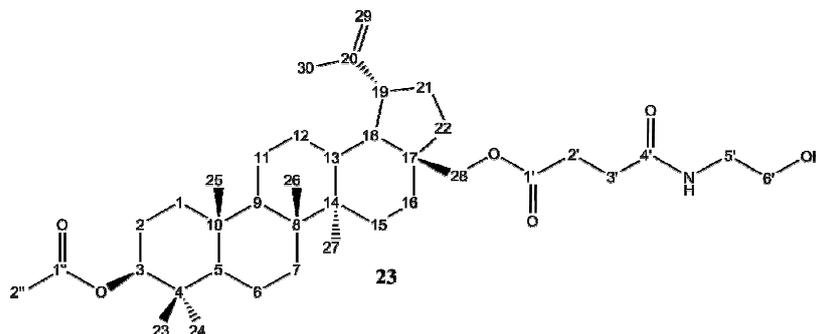
^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 172.3 (C1'), 171.2 (C4'), 171.1 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.3 (C3), 62.0 (C28), 60.3 (C5'), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 41.9 (C6'), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.9 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 30.4 (C3'), 29.9 (C2'), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₈H₆₁NO₆, M = 627.45): 651.38 (100, [M+Na]⁺), 1277.81 (68, [2M+Na]⁺).

ESI-MS (-) (C₃₈H₆₁NO₆, M = 627.45): 662.98 (38, [M+Cl]⁻), 1290.50 (66, [2M+Cl]⁻).

Berechnet für C₃₈H₆₁NO₆: C (72.69), H (9.79), N (2.23); gefunden: C (71.62), H (9.77), N (1.93).

8.3.23 4-((3*S*)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-4-oxobutansäure-
(2-hydroxyethyl)amid **23**



18 (250 mg, 0.43 mmol) wird entsprechend Methode 8.3.21 mit DIPEA (100 μ L, 76.0 mg, 0.59 mmol), HOBT (57.7 mg, 0.43 mmol), HATU (162 mg, 0.43 mmol) und 2-Aminoethanol (27 μ L, 27.5 mg, 0.43 mmol) zur Reaktion gebracht. Es entsteht **23** (210 mg, 0.33 mmol, 78%), ein weißer, amorpher Feststoff.

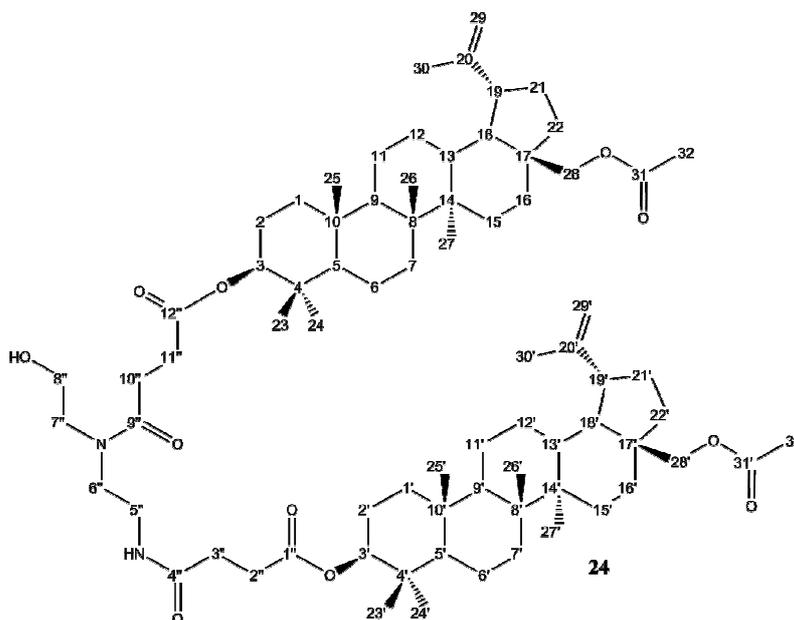
^1H (500 MHz, dms o-d_6): 7.82 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz, CONH), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, C29H), 4.60 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.5$ Hz, OH), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz + 4.6 Hz, C3H), 4.22 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, C28H), 3.73 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.33 (m, 2H, C5'H₂), 3.07 (m, 2H, C6'H₂), 2.48 (m, 2H, C2'H₂), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.34 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, C3'H₂), 1.97 (s, 3H, C2''H₃), 1.90-0.78 (42H).

^{13}C (125 MHz, dms o-d_6): 173.0 (C1'), 171.2 (C4'), 170.6 (C1''), 150.3 (C20), 110.4 (C29), 80.4 (C3), 62.0 (C28), 60.3 (C5'), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.7 (C18), 47.5 (C19), 46.6 (C17), 42.7 (C14), 41.9 (C6'), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 30.3 (C3'), 29.7 (C2'), 29.6 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.7 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₈H₆₁NO₆, M = 627.45): 650.47 (100, [M+Na]⁺).

Berechnet für C₃₈H₆₁NO₆: C (72.69), H (9.79), N (2.23); gefunden: C (72.14), H (9.65), N (2.13).

8.3.24 *N,N'*-Bis[4-((*3S*)-28-acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-1,4-dioxobut-1-yl]-2-(2-hydroxyethylamino)ethylamin **24**



14 (250 mg, 0.43 mmol) wird gemäß Methode 8.3.21 mit DIPEA (75 μ L, 56.9 mg, 0.44 mmol), HOBT (57.7 mg, 0.43 mmol), HATU (162 mg, 0.43 mmol) und 2-(2-Aminoethylamino)-ethanol (45 μ L, 45.8 mg, 0.44 mmol) umgesetzt. Es entsteht **24** (116 mg, 0.094 mmol, 44%) als weißlicher, amorpher Feststoff.

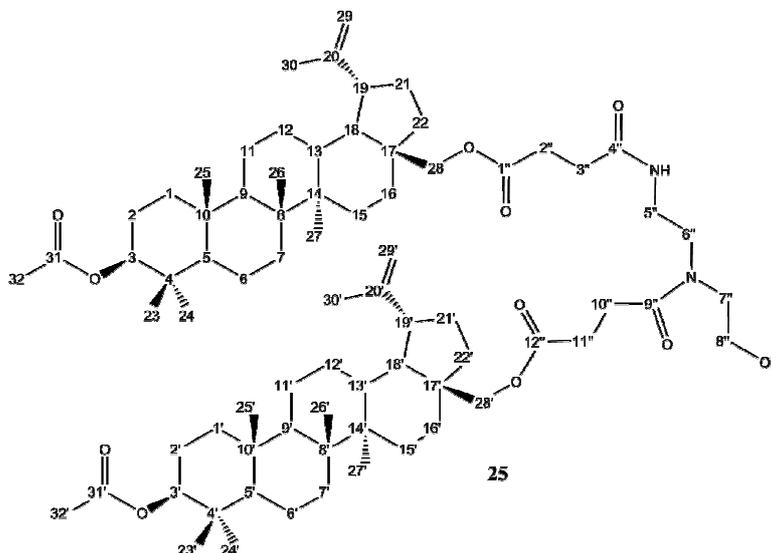
^1H (500 MHz, dms o-d_6): 7.80 (m, 1H, CONH), 4.69 (d, 2H, C29H + C29'H), 4.56 (d, 2H, C29H + C29'H), 4.35 (m, 2H, C3H + C3'H), 4.25 (m, 2H, C28H + C28'H), 3.75 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}}$ = 10.9 Hz, C28H + C28'H), 3.45 (m, 2H, C7''H₂), 3.30 (m, 2H, C5''H₂), 3.10 (m, 2H, C8''H₂), 2.54 (m, 2H, C6''H₂), 2.46 (m, 6H, C19H + C19'H + C2''H₂ + C11''H₂), 2.34 (m, 4H, C3''H₂ + C10''H₂), 2.01 (s, 6H, C32H₃ + C32'H₃), 1.95-0.77 (84H).

^{13}C (125 MHz, dms o-d_6): 172.4 (C1'' + C12''), 171.7 (C9''), 171.1 (C31 + C31'), 171.1 (C4''), 150.3 (C20 + C20'), 110.4 (C29 + C29'), 80.3 (C3 + C3'), 62.0 (C28 + C28'), 60.8 (C8''), 59.3 (C5''), 55.1 (C5 + C5'), 51.9 (C7''), 50.0 (C9 + C9'), 49.0 (C6''), 48.6 (C18 + C18'), 47.5 (C19 + C19'), 46.5 (C17 + C17'), 42.7 (C14 + C14'), 40.9 (C8 + C8'), 38.2 (C1 + C1'), 37.9 (C4 + C4'), 37.5 (C13 + C13'), 37.0 (C10 + C10'), 34.5 (C7 + C7'), 34.1 (C22 + C22'), 30.4 (C3'' + C10''), 30.0 (C2'' + C11''), 29.7 (C21 + C21'), 29.5 (C16 + C16'), 28.1 (C23 + C23'), 27.1 (C15 + C15'), 25.2 (C12 + C12'), 23.8 (C2 + C2'), 21.2 (C32 + C32'), 20.8 (C11 + C11'), 19.2 (C30 + C30'), 18.2 (C6 + C6'), 16.9 (C24 + C24'), 16.3 (C25 + C25'), 16.0 (C26 + C26'), 14.9 (C27 + C27').

ESI-MS (+) (C₇₆H₁₂₀N₂O₁₁, M = 1236.89): 1237.40 (61, [M+H]⁺), 1259.73 (100, [M+Na]⁺).

Berechnet für C₇₆H₁₂₀N₂O₁₁: C (73.75), H (9.77), N (2.26); gefunden: C (72.56), H (9.50), N (2.29).

8.3.25 *N,N'*-Bis[4-((3*S*)-3-acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-1,4-dioxobut-1-yl]-2-(2-hydroxyethylamino)ethylamin **25**



18 (200 mg, 0.34 mmol) wird nach Methode 8.3.21 umgesetzt mit DIPEA (60 μ L, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBt (46.2 mg, 0.34 mmol), HATU (130 mg, 0.34 mmol) und 2-(2-Aminoethylamino)ethanol (35 μ L, 35.6 mg, 0.34 mmol). Das Produkt ist **25** (102 mg, 0.082 mmol, 48%), ein weißlicher, amorpher Feststoff.

¹H (500 MHz, dms_o-d₆): 7.80 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.8 Hz, CONH), 4.67 (d, 2H, C29H + C29'H), 4.64 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.4 Hz, OH), 4.54 (d, 2H, C29H + C29'H), 4.34 (dd, 2H, ³J_{H-H} = 11.5 Hz + 4.7 Hz, C3H + C3'H'), 4.21 (m, 2H, C28H + C28'H'), 3.73 (d, 2H, ²J_{H-H} = 10.9 Hz, C28H + C28'H), 3.41 (m, 2H, C7''H₂), 3.26 (m, 2H, C5''H₂), 3.10 (m, 2H, C8''H₂), 2.55 (m, 2H, C6''H₂), 2.48 (m, 4H, C2''H₂ + C11''H₂), 2.42 (m, 2H, C19H + C19'H), 2.30 (t, 4H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, C3''H₂ + C10''H₂), 1.96 (s, 6H, C32H₃ + C32'H₃), 1.90-0.77 (84H).

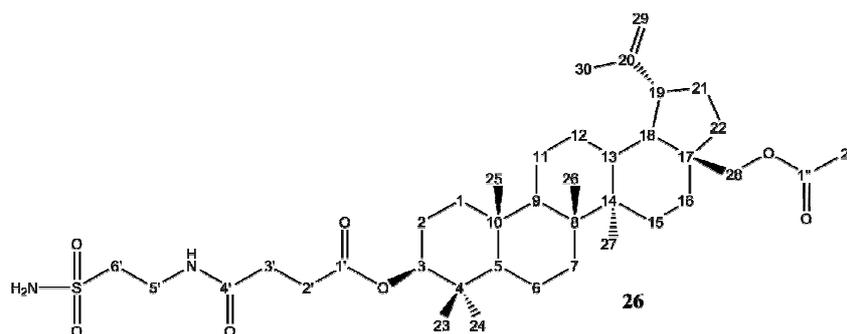
¹³C (125 MHz, dsmo-d₆): 173.0 (C1'' + C12''), 171.6 (C9''), 171.2 (C4''), 170.5 (C31 + C31'), 150.2 (C20 + C20'), 110.3 (C29 + C29'), 80.3 (C3 + C3'), 61.9 (C28 + C28'), 60.2 (C8''), 59.3 (C5''), 55.1 (C5 + C5'), 50.3 (C7''), 50.0 (C9 + C9'), 8.7 (C18 + C18'), 48.6 (C6''), 47.5 (C19 + C19'), 46.6 (C17 + C17'), 42.7 (C14 + C14'), 40.9 (C8 + C8'), 38.2 (C4 + C4'), 37.8 (C1 + C1'), 37.5 (C13 + C13'), 37.0 (C10 + C10'), 34.5 (C7 + C7'), 34.0 (C22 + C22'), 30.4 (C3'' + C10''), 30.3 (C2'' + C11''), 29.6 (C21 + C21'), 29.5 (C16 + C16'), 28.1 (C23 + C23'), 27.1 (C15 + C15'), 25.2 (C12 + C12'), 23.8 (C2 + C2'), 21.4 (C32 + C32'), 20.8 (C11 +

C11'), 19.2 (C30 + C30'), 18.2 (C6 + C6'), 16.8 (C24 + C24'), 16.3 (C25 + C25'), 16.0 (C26 + C26'), 14.9 (C27 + C27').

ESI-MS (+) (C₇₆H₁₂₀N₂O₁₁, M = 1236.89): 1237.53 (24, [M+H]⁺), 1259.73 (100, [M+Na]⁺).

Berechnet für C₇₆H₁₂₀N₂O₁₁: C (73.75), H (9.77), N (2.26); gefunden C (72.68), H (9.65), N (2.17).

8.3.26 4-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-4-oxobutansäure-(2-amidosulfonethyl)amid **26**



Entsprechend Methode 8.3.21 werden **14** (150 mg, 0.26 mmol), DIPEA (60 µL, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBt (34.6 mg, 0.26 mmol), HATU (97.3 mg, 0.26 mmol) und Taurinamid (33.5 mg, 0.27 mmol) umgesetzt. Es entsteht **26** (159 mg, 0.23 mmol, 90%) als weißer, amorpher Feststoff.

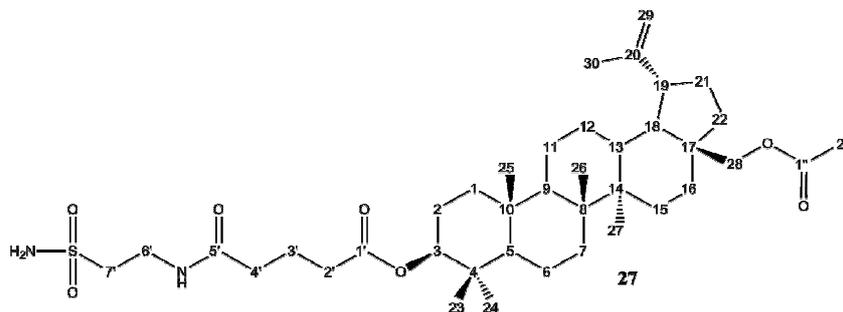
¹H (500 MHz, dms_o-d₆): 8.00 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.7 Hz, CONH), 6.83 (s, 2H, NH₂), 4.67 (d, 1H, C29H), 4.53 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.4 Hz + 4.6 Hz, C3H), 4.22 (d, 1H, ²J_{H-H} = 11.0 Hz, C28H), 3.73 (d, 1H, ²J_{H-H} = 11.0 Hz, C28H), 3.37 (m, 2H, C5'H₂), 3.05 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.3 Hz, C6'H₂), 2.46 (m, 2H, C2'H₂), 2.42 (m, 1H, C19H), 2.33 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, C3'H₂), 1.99 (s, 3H, C2''H₃), 1.90-0.75 (42H).

¹³C (125 MHz, dms_o-d₆): 172.2 (C1'), 171.4 (C4'), 171.1 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.3 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 54.1 (C5'), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.4 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.9 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.5 (C6'), 34.0 (C22), 30.4 (C3'), 29.8 (C2'), 29.7 (C21), 29.4 (C16), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.1 (C12), 23.8 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₈H₆₂N₂O₇S, M = 690.43): 714.02 (94, [M+Na]⁺), 1403.44 (19, [2M+Na]⁺).

Berechnet für C₃₈H₆₂N₂O₇S: C (66.05), H (9.04), N (4.05), S (4.64); gefunden: C (66.47), H (8.83), N (3.91), S (5.44).

8.3.27 5-((3S)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-5-oxopentansäure-
(2-amidosulfonethyl)amid **27**



15 (150 mg, 0.25 mmol) wird gemäß Methode 8.3.21 mit DIPEA (60 μ L, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBT (33.8 mg, 0.25 mmol), HATU (95.1 mg, 0.25 mmol) und Taurinamid (31.1 mg, 0.25 mmol) zur Reaktion gebracht. Als Produkt fällt **27** (154 mg, 0.22 mmol, 87%) als weißer, amorpher Feststoff an.

^1H (400 MHz, dms o-d_6): 4.67 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz + 4.9 Hz, C3H), 4.22 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, C28H), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, C28H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.29 (m, 2H, C3'H $_2$), 2.21 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.4$ Hz, C4'H $_2$), 1.99 (s, 3H, C2''H $_3$), 1.71 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, C2'H $_2$), 1.94-0.77 (42H).

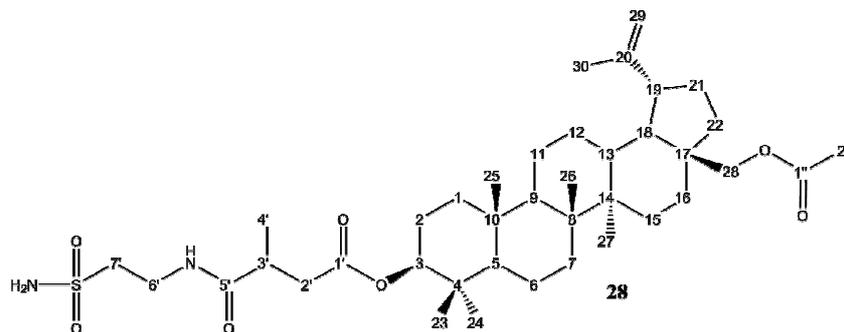
^{13}C (100 MHz, dms o-d_6): 174.4 (C5'), 172.5 (C1'), 171.0 (C1''), 150.2 (C20), 110.3 (C29), 80.3 (C3), 61.9 (C28), 55.1 (C5), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.4 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 33.6 (C2'), 33.2 (C4'), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.1 (C12), 23.8 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 20.6 (C3'), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.2 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C $_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$, M = 598.42): 467.27 (30, [M-HOOC(CH $_2$) $_3$ COO] $^+$), 621.27 (100, [M+Na] $^+$).

ESI-MS (-) (C $_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$, M = 598.42): 597.27 (100, [M-H] $^-$), 643.13 (51, [M+HCO $_2$] $^-$).

Berechnet für C $_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$: C (74.21), H (9.76); gefunden: C (74.01), H (9.60).

8.3.28 4-((3*S*)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-3-methyl-4-oxobutansäure-(2-amidosulfonethyl)amid **28**



16 (150 mg, 0.25 mmol) wird gemäß Methode 8.3.21 mit DIPEA (60 μ L, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBt (33.8 mg, 0.25 mmol), HATU (95.1 mg, 0.25 mmol) und Taurinamid (31.1 mg, 0.25 mmol) zur Reaktion gebracht. Es entsteht **28** (148 mg, 0.21 mmol, 84%) als weißer, amorpher Feststoff.

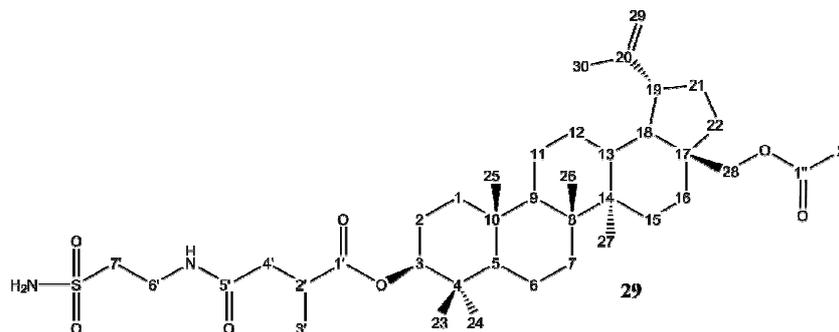
¹H (400 MHz, dms_o-d₆): 8.00 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.1 Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH₂), 4.67 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.33 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.3 Hz + 4.6 Hz, C3H), 4.23 (d, 1H ²J_{H-H} = 11.1 Hz, C28H), 3.73 (d, 1H, ³J_{H-H} = 11.0 Hz, C28H), 3.37 (m, 2H, C6'H₂), 3.05 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, C7'H₂), 2.62 (m, 1H, C3'H), 2.55 (m, 1H, C2'H), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.25 (m, 1H, C2'H), 1.99 (s, 3H, C2''H₃), 1.01 (d, 3H, ³J_{H-H} = 6.8 Hz, C4'H₃), 1.94-0.74 (42H).

¹³C (100 MHz, dms_o-d₆): 175.0 (C5'), 171.7 (C1'), 171.1 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.4 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 54.1 (C6'), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 38.2 (C2'), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 36.6 (C3'), 34.5 (C7), 34.5 (C7'), 34.0 (C22), 29.7 (C21), 29.4 (C16), 28.0 (C23), 27.1 (C15), 25.1 (C12), 23.8 (C2), 21.1 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 18.1 (C4'), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C₃₉H₆₄N₂O₇S, M = 704.44): 705.13 (29, [M+H]⁺), 727.40 (100, [M+Na]⁺).

Berechnet für C₃₉H₆₄N₂O₇S: C (66.44), H (9.15), N (3.97), S (4.55); gefunden: C (65.91), H (9.18), N (3.93), S (5.45).

8.3.29 4-((3*S*)-28-Acetyloxylup-20(29)-en-3-yloxy)-2-methyl-4-oxobutansäure-(2-amidosulfonethyl)amid **29**



17 (100 mg, 0.17 mmol) wird nach Methode 8.3.21 umgesetzt mit DIPEA (40 μ L, 30.4 mg, 0.24 mmol), HOBt (22.6 mg, 0.17 mmol), HATU (63.4 mg, 0.17 mmol) und Taurinamid (20.4 mg, 0.17 mmol). Es entsteht **32** (88 mg, 0.12 mmol, 75%) als weißer, amorpher Feststoff.

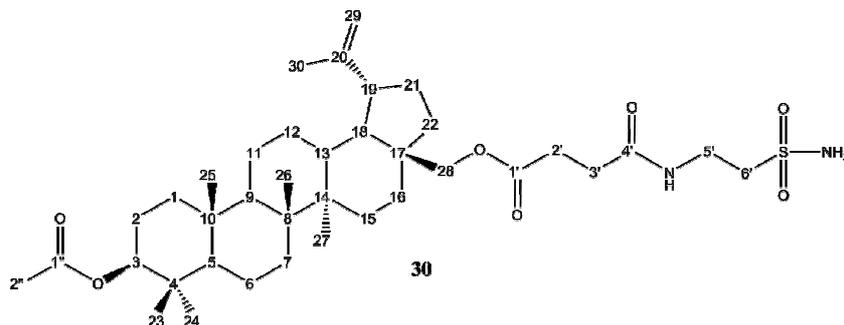
^1H (500 MHz, dms o-d_6): 8.01 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz, CONH), 6.85 (s, 2H, NH_2), 4.70 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, C29H), 4.56 (d, 1H, C29H), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz + 4.5 Hz, C3H), 4.25 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, C28H), 3.75 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.39 (m, 2H, C6'H $_2$), 3.07 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, C7'H $_2$), 2.77 (m, 1H, C2'H), 2.44 (m, 2H, C19H + C4'H), 2.18 (m, 1H, C4'H), 2.01 (s, 3H, C2''H $_3$), 1.08 (d, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, C3'H $_3$), 1.92-0.76 (42H).

^{13}C (125 MHz, dms o-d_6): 174.9 (C1'), 171.1 (C1''), 170.9 (C5'), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.2 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 54.2 (C6'), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.8 (C4'), 38.1 (C1), 37.9 (C4), 37.5 (C13), 37.1 (C10), 36.3 (C2'), 34.5 (C7), 34.5 (C7'), 34.0 (C22), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.7 (C2), 21.8 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 17.4 (C3'), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.1 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) (C $_{39}$ H $_{64}$ N $_2$ O $_7$ S, M = 704.44): 705.13 (41, [M+H] $^+$), 727.40 (100, [M+Na] $^+$).

Berechnet für C $_{39}$ H $_{64}$ N $_2$ O $_7$ S: C (66.44), H (9.15), N (3.97), S (4.55); gefunden: C (65.90), H (9.61), N (3.75), S (4.63).

8.3.30 4-((3*S*)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-4-oxobutansäure-
(2-amidosulfonyl)amid **30**



18 (150 mg, 0.26 mmol) wird nach Methode 8.3.21 zusammen mit DIPEA (60 μ L, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBt (34.6 mg, 0.26 mmol), HATU (97.3 mg, 0.26 mmol) und Taurinamid (33.5 mg, 0.27 mmol) umgesetzt. Es entsteht **30** (162 mg, 0.23 mmol, 92%) als weißer, amorpher Feststoff.

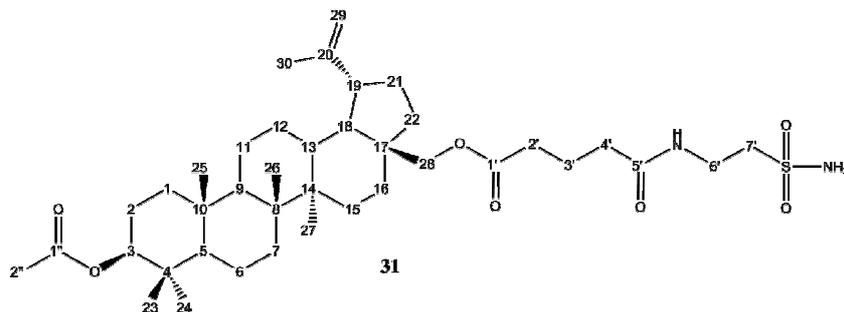
^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 8.00 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.7$ Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.23 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz, C28H), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.39 (m, 2H, C5'H₂), 3.05 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, C6'H₂), 2.50 (m, 2H, C2'H₂), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.34 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, C3'H₂), 1.97 (s, 3H, C2''H₃), 1.90-0.77 (42H).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 172.9 (C1'), 171.4 (C4'), 170.5 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.4 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 54.1 (C5'), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.5 (C6'), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 30.3 (C3'), 29.6 (C21), 29.5 (C2'), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.7 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, $M = 690.43$): 691.13 (22, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 713.40 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: C (66.05), H (9.04), N (4.05), S (4.64); gefunden: C (65.74), H (8.96), N (3.96), S (6.25).

8.3.31 5-((3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-5-oxopentansäure-
(2-amidosulfonethyl)amid 31



19 (150 mg, 0.25 mmol) wird gemäß Methode 8.3.21 mit DIPEA (60 μ L, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBT (33.8 mg, 0.25 mmol), HATU (95.1 mg, 0.25 mmol) und Taurinamid (31.1 mg, 0.25 mmol) umgesetzt. Als Produkt entsteht **31** (147 mg, 0.21 mmol, 83%) als weißer, amorpher Feststoff.

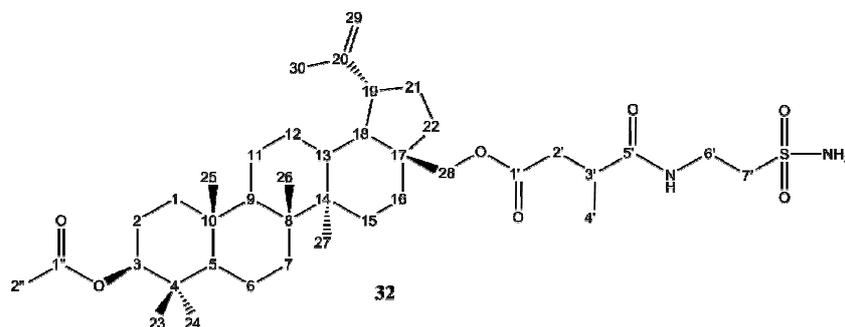
^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.93 (t, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 5.5$ Hz, CONH), 6.83 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz + 4.6 Hz, C3H), 4.25 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, C28H), 3.75 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.1$ Hz, C28H), 3.38 (m, 2H, C6'H₂), 3.07 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, C7'H₂), 2.43 (m, 1H, C19H), 2.29 (m, 2H, C3'H₂), 2.08 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, C4'H₂), 1.96 (s, 3H, C2''H₃), 1.72 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, C2'H₂), 1.92-0.77 (42H).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 173.3 (C1'), 172.2 (C5'), 170.5 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.3 (C3), 61.9 (C28), 55.1 (C5), 54.1 (C6'), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 34.7 (C4'), 34.5 (C7), 34.4 (C7'), 34.0 (C22), 33.4 (C2'), 29.7 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 21.0 (C3'), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, $M = 704.44$): 705.13 (18, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 727.40 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: C (66.44), H (9.15), N (3.97), S (4.55); gefunden: C (66.32), H (9.32), N (3.82), S (4.93).

8.3.32 4-((3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-3-methyl-4-oxobutansäure-
(2-amidosulfonethyl)amid 32



20 (150 mg, 0.25 mmol) wird gemäß Methode 8.3.21 mit DIPEA (60 μ L, 45.6 mg, 0.35 mmol), HOBT (33.8 mg, 0.25 mmol), HATU (95.1 mg, 0.25 mmol) und Taurinamid (31.1 mg, 0.25 mmol) umgesetzt. Das Produkt ist **29** (128 mg, 0.18 mmol, 73%), ein weißer, amorpher Feststoff.

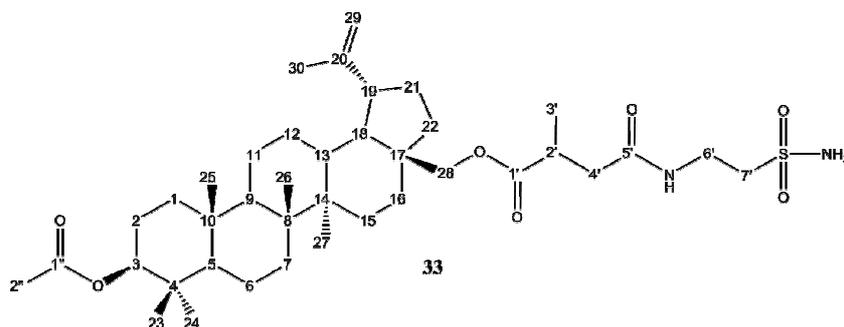
^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 8.02 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz + 4.8 Hz, C3H), 4.22 (m, 1H, C28H), 3.73 (m, 1H, C28H), 3.38 (m, 2H, C6'H₂), 3.05 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, C7'H₂), 2.61 (m, 1H, C3'H), 2.58 (m, 1H, C2'H), 2.42 (m, 1H, C19H), 2.29 (m, 1H, C2'H), 1.97 (s, 3H, C2''H₃), 1.01 (d, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, C4'H₃), 1.90-0.78 (42H).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 175.0 (C5'), 173.2 (C1'), 170.5 (C1''), 150.2 (C20), 110.4 (C29), 80.3 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 54.1 (C6'), 50.0 (C9), 48.6 (C18), 47.5 (C19), 46.5 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.2 (C1), 37.9 (C2'), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 36.4 (C3'), 34.5 (C7'), 34.5 (C7), 34.0 (C22), 29.6 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.8 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C4'), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, $M = 704.44$): 705.13 (17, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 727.40 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: C (66.44), H (9.15), N (3.97), S (4.55); gefunden: C (68.31), H (9.07), N (3.87), S (5.96).

8.3.33 4-((3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-yloxy)-2-methyl-4-oxobutansäure-
(2-amidosulfonyl)amid 33



21 (100 mg, 0.17 mmol) wird entsprechend Methode 8.3.21 mit DIPEA (40 μ L, 30.4 mg, 0.24 mmol), HOBT (22.6 mg, 0.17 mmol), HATU (63.4 mg, 0.17 mmol) und Taurinamid (20.4 mg, 0.17 mmol) umgesetzt. Es entsteht **33** (83 mg, 0.12 mmol, 70%) als weißer, amorpher Feststoff.

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 8.02 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 4.9$ Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, C29H), 4.54 (d, 1H, C29H), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 10.6$ Hz + 4.2 Hz, C3H), 4.24 (m, 1H, C28H), 3.73 (m, 1H, C28H), 3.38 (m, 2H, C6'H₂), 3.05 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, C7'H₂), 2.79 (m, 1H, C2'H), 2.41 (m, 2H, C4'H + C19H), 2.19 (m, 1H, C4'H), 1.97 (s, 3H, C2''H₃), 1.06 (d, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, C3'H₃), 1.91-0.78 (42H).

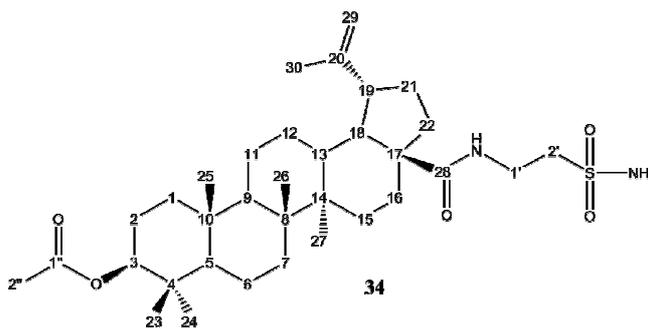
^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 175.6 (C1'), 170.8 (C5'), 170.5 (C1''), 150.3 (C20), 110.4 (C29), 80.3 (C3), 62.0 (C28), 55.1 (C5), 54.2 (C6'), 50.0 (C9), 48.7 (C18), 47.5 (C19), 46.6 (C17), 42.7 (C14), 40.9 (C8), 38.9 (C4'), 38.2 (C1), 37.8 (C4), 37.5 (C13), 37.0 (C10), 36.1 (C2'), 34.5 (C7'), 34.4 (C7), 34.0 (C22), 29.6 (C21), 29.5 (C16), 28.1 (C23), 27.1 (C15), 25.2 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 20.7 (C11), 19.2 (C30), 18.2 (C6), 17.2 (C3'), 16.9 (C24), 16.3 (C25), 16.0 (C26), 14.9 (C27).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, $M = 704.44$): 705.20 (26, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 727.40 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: C (66.44), H (9.15), N (3.97), S (4.55); gefunden: C (66.27), H (9.06), N (3.69), S (4.90).

8.3.34 (3S)-3-Acetyloxylup-20(29)-en-28-säure-(2-amidosulfonethyl)amid **34**

4 (300 mg, 0.60 mmol) wird in DCM (3 mL) gelöst und anschließend unter Rühren bei RT mit Thionylchlorid (100 μ L, 164 mg, 1.38 mmol) für 30 min zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Unter Erhitzen und vermindertem Druck



wird das Lösungsmittel abgezogen. In einem separaten Kolben werden Taurinamid (149 mg, 1.2 mmol) und NEt_3 (300 μ L, 218 mg, 2.15 mmol) in einem Gemisch aus DCM (20 mL) und DMF (5 mL) gelöst. Das zuvor gewonnene Carbonsäurechlorid wird in DCM (10 mL) gelöst und vorsichtig und unter Rühren hinzuge tropft. Das Gemisch wird über Nacht gerührt, dann wird das Lösungsmittel abgezogen, in Essigester aufgenommen und mit 5%iger Salzsäure (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird erneut abgezogen. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatografisch mit DCM / Methanol 15:1 als Laufmittel. Es entsteht **34** (247 mg, 0.41 mmol, 68%) als blassgelber, amorpher Feststoff.

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 7.68 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.2$ Hz, CONH), 6.86 (s, 2H, NH_2), 4.63 (d, 1H, C29H), 4.51 (d, 1H, C29H), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz + 4.3 Hz, C3H), 3.39 (m, 2H, C1'H₂), 3.06 (m, 2H, C2'H₂), 3.00 (m, 1H, C19H), 2.48 (m, 1H, C22H), 2.05 (m, 1H, C18H), 1.96 (s, 3H, C2''H₃), 1.76-0.77 (40H).

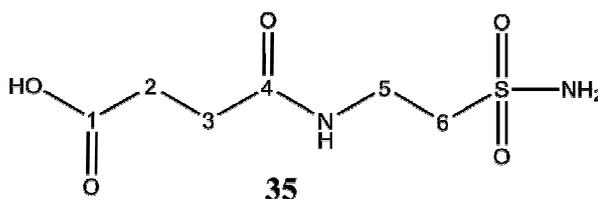
^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 176.3 (C28), 170.5 (C1''), 151.2 (C20), 109.7 (C29), 80.3 (C3), 55.3 (C17), 55.2 (C5), 54.2 (C1'), 50.3 (C18), 50.0 (C9), 46.6 (C19), 42.3 (C14), 40.8 (C8), 38.3 (C1), 37.8 (C4), 37.2 (C13), 37.1 (C10), 34.5 (C2'), 34.5 (C22), 34.2 (C7), 32.7 (C16), 30.8 (C21), 29.3 (C15), 28.1 (C23), 25.6 (C12), 23.8 (C2), 21.4 (C2''), 21.0 (C11), 19.5 (C30), 18.2 (C6), 16.8 (C24), 16.3 (C25), 16.2 (C26), 14.7 (C27).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, $M = 604.40$): 605.27 (84, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 627.40 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C (67.51), H (9.33), N (4.63), S (5.30); gefunden: C (65.97), H (9.13), N (4.75), S (6.92).

8.3.35 4-(2-Amidosulfonethylamino)-4-oxobutansäure **35**

Bernsteinsäureanhydrid (100 mg, 1.00 mmol) wird in Aceton (10 mL) gelöst. Taurinamid (124 mg, 1.00 mmol) wird in DMF (1 mL) gelöst, welches dann zu Aceton (9 mL) gegeben wird. Die beiden



Gemische werden zeitgleich unter Eiskühlung langsam über eine Dauer von 30 min in kräftig rührendes Aceton (10 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wird weiter über Nacht bei RT gerührt, anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt über Umkristallisierung aus Acetonitril. Es entsteht **35** (102 mg, 0.45 mmol, 45%) als weißes Pulver.

CAS 1156820-78-8

^1H (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 11.99 (s, 1H, COOH), 7.97 (t, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH_2), 3.39 (m, 2H, $\text{C}5\text{H}_2$), 3.06 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, $\text{C}6\text{H}_2$), 2.40 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, $\text{C}2\text{H}_2$), 2.28 (t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, $\text{C}3\text{H}_2$).

^{13}C (100 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$): 174.2 (COOH), 171.7 (CONH), 54.1 (C5), 34.5 (C6), 30.5 (C3), 29.5 (C2).

ESI-MS (+) ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, $M = 224.05$): 225.03 (36, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 244.12 (39, $[2\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$), 247.12 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 294.82 (30, $[\text{M}+\text{K}+\text{MeOH}]^+$).

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C (32.14), H (5.39), N (12.49), S (14.30); gefunden: C (33.27), H (5.25), N (12.51), S (15.31).

8.4 SRB-Assay

Die Methoden der Zellkultivierung und des SRB-Tests beruhen zum Großteil auf früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Paschke [229b, 232, 218].

8.4.1 Zelllinien

Tabelle 9: Schlüssel der beim SRB-Test verwendeten Zelllinien. Diese wurden von Herrn Dr. Thomas Müller (Universitätsklinikum Halle-Wittenberg, Fachbereich Innere Medizin IV, Onkologie/Hämatologie) zur Verfügung gestellt.

| Zelllinie | Zellart |
|-----------|------------------------------------|
| 518A2 | Melanom (human) |
| 8505C | Schilddrüsenkarzinom (human) |
| A2780 | Ovarienkarzinom (human) |
| A549 | Lungenkarzinom (human) |
| FaDu | Karzinom aus Rachenbereich (human) |
| HT29 | Kolorektales Adenokarzinom (human) |
| MCF7 | Adenokarzinom der Brust (human) |
| NIH-3T3 | Fibroblasten (murin) |
| SW1736 | Schilddrüsenkarzinom (human) |

8.4.2 Methode

Proliferative Krebszellen werden in einer Nährlösung in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte eingebracht. Dabei wird die Anzahl der eingestreuten Zellen so gewählt, dass bei exponentiellem Wachstum nach der viertägigen Testdauer noch keine Konfluenz eintritt. Nach 24 h werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (1-60 μM) der Substanzen behandelt sowie eine Vergleichsprobe ohne Substanz initiiert. Nach einer Einwirkzeit von 96 h wird die überstehende Lösung in den Vertiefungen entfernt und die verbliebenen Zellen mit 10%iger TCA-Lösung fixiert. Die Platten werden mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend mit 0.4%iger SRB-Lösung für etwa 45 min angefärbt. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1%iger Essigsäure, um ungebundene Farbe zu entfernen, werden die Platten an der Luft trocknen gelassen. Das gefärbte Zellmaterial wird schließlich in 10 mM Tris-Lösung gelöst und die Absorption bei 570 nm gemessen.

Literaturverzeichnis

- [1] Pommerening T. *Wege zur Identifikation altägyptischer Drogennamen – eine kritische Betrachtung*. In: Dils P, Popko L (Hrsg). *Zwischen Philologie und Lexikographie des Ägyptisch-Koptischen. Akten der Leipziger Abschlusstagung des Akademienprojekts "Altägyptisches Wörterbuch"*. Stuttgart, Leipzig: S. Hirzel Verlag. 2016;82-111.
- [2] Maul SM, Westendorf W. *Erste Medizinkonzepte zwischen Magie und Vernunft*. In: Schott H (Hrsg). *Die Chronik der Medizin*. Dortmund: Chronik-Verlag. 1993;16-33.
- [3] Burde C. *Hethitische medizinische Texte. Studien zu den Boğazköy-Texten Heft 19*. Wiesbaden: Otto Harrassowitz. 1974.
- [4] Bennett RN, Wallsgrave RM. *New Phytol*. 1994;127:617-633.
- [5] Ankri S, Mirelman D. *Microbes Infect*. 1999;2:125-129.
- [6] Brinker AM, Seigler DS. *Determination of Cyanide and Cyanogenic Glycosides from Plants*. In: Linskens HF, Jackson JF (Hrsg). *Plant Toxins Analysis. Modern Methods of Plant Analysis Vol. 13*. Berlin, Heidelberg: Springer. 1992;359-381.
- [7] Bouvier F, Rahier A, Camara B. *Prog Lipid Res*. 2005;44:357-429.
- [8] Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk M, Scheffler A. *Molecules*. 2009;14:2016-2031.
- [9] Hayek EWH, Jordis U, Moche W, Sauter F. *Phytochem*. 1989;28(9):2229-2242.
- [10] Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. *Eur J Pharm Sc*. 2006;29:1-13.
- [11] Eckerman C, Ekman R. *Paperi ja Puu*. 1985;67(3):100-106.
- [12] Galgon T, Höke D, Dräger B. *Phytochem Anal*. 1999;10:187-190.
- [13] Bruckner V, Kovács J, Koczka I. *J Chem Soc*. 1948;948-951.
- [14] Kim DSHL, Chen Z, Nguyen VT, Pezzuto JM, Qiu S, Lu ZZ. *Synth Comm*. 1997;27(9):1607-1612.
- [15] Li J, Zhang Y. *J Biosci Bioeng*. 2015;119(5):77-81.
- [16] Chen QH, Liu J, Zhang HF, He GQ, Fu ML. *Enzyme Microb Tech*. 2009;45:175-180.
- [17] Hayashi H, Huang P, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M, Ebizuka Y. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(7):1086-1092.
- [18] Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. *Phytochem*. 2011;72:435-457.

- [19] Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT. *Phytochem.* 2004;65:261-291.
- [20] Zhang H, Shibuya M, Yokota S, Ebizuka Y. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(5):642-650.
- [21] Abe I, Rohmer M, Prestwich GD. *Chem Rev.* 1993;93(6):2189-2206.
- [22] Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, Ono E, Umemoto N, Mizutani M, Saito K, Muranaka T. *Plant Cell Physiol.* 2011;52(12):2050-2061.
- [23] Ríos JL, Máñez S. *Planta Med.* 2018;84:8-19.
- [24] Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K, Bukhari SNA. *Chem Biol Drug Des.* 2016;87:517-536.
- [25] Król SK, Kiełbus M, Rivero-Müller A, Stepulak A. *BioMed Res Intl.* 2015;584189.
- [26] Laszczyk MN. *Planta Med.* 2009;75:1549-1560.
- [27] Dzubak P, Hajdich M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J. *Nat Prod Rep.* 2006;23:394-411.
- [28] Qian K, Nakagawa-Goto K, Yu D, Morris-Natschke SL, Nitz TJ, Kilgore N, Allaway GP, Lee KH. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17(23):6553-6557.
- [29] Kashiwada Y, Chiyo J, Nagao T, Okabe H, Cosentino LM, Fowke K, Lee KH. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001;11:183-185.
- [30] Sun IC, Shen JK, Wang HK, Cosentino LM, Lee KH. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8:1267-1272.
- [31] Flekhter OB, Boreko EI, Nigmatullina LR, Tretyakova EV, Pavlova NI, Baltina LA, Nikolaeva SN, Savinova OV, Galin FZ, Tolstikov GA. *Russ J Bioorg Chem.* 2003;29(6):594-600.
- [32] Kanamoto T, Kashiwada Y, Kanbara K, Gotoh K, Yoshimori M, Goto T, Sano K, Nakashima H. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1225-1230.
- [33] Ziegler HL, Franzyk H, Sairafianpour M, Tabatabai M, Tehrani MD, Bagherzadeh K, Hägerstrand H, Stärk D, Jaroszewski JW. *Bioorg Med Chem.* 2004;12:119-127.
- [34] Steele JCP, Warhust DC, Kirby GC, Simmonds MSJ. *Phytother Res.* 1999;13:115-119.
- [35] Karachurina LT, Sapozhnikova TA, Zarudii FS, Flekhter OB, Galin FZ. *Pharm Chem J.* 2002;36(8):432-433.
- [36] Bernard P, Scior T, Didier B, Hilbert M, Berthon JY. *Phytochem.* 2001;58:865-874.
- [37] Gheorgheosu D, Duicu O, Dehelean C, Şoica C, Muntean D. *Anti-Cancer Agents Med Chem.* 2014;14(7):936-945.
- [38] Fulda S, Debatin KM. *Neoplasia.* 2005;7(2):162-170.
- [39] Fulda A, Jeremias I, Debatin KM. *Oncogene.* 2004;23:7611-7620.

- [40] Šarek J, Klinot J, Džubák P, Klinotová E, Nosková V, Křeček V, Kořínková G, Thomson JO, Janošťáková A, Wang S, Parsons S, Fischer PM, Zhelev NZ, Hajdúch M. *J Med Chem.* 2003;46(25):5402-5415.
- [41] Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nuñez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. *Cancer Res.* 1997;57:4956-4964.
- [42] Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CWW, Fong HHS, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Hieken TJ, Das Gupta TK, Pezzuto JM. *Nature Med.* 1995;1(10):1046-1051.
- [43] Statistisches Bundesamt. *Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen.* 2015. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html> abgerufen am 04. Okt. 2018.
- [44] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *CA Cancer J Clin.* 2018;1-31.
- [45] *Global health estimates: deaths by cause, age, sex, and country, 2000-2012.* Genua: World Health Organisation. 2014.
- [46] Schwartz L, Supuran CT, Alfarouk KO. *Anti-Cancer Agents Med Chem.* 2017;17(2):164-170.
- [47] Hanahan D, Weinberg RA. *Cell.* 2011;144:646-674.
- [48] Davies MA, Samuels Y. *Oncogene.* 2010;29:5545-5555.
- [49] Yuan TL, Cantley LC. *Oncogene.* 2008;27:5497-5510.
- [50] O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. *Cancer Res.* 2006;66(3):1500-1508.
- [51] Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. *Mol Cancer Res.* 2008;6(10):1521-1533.
- [52] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. *Nature.* 2004;432:332-337.
- [53] Ikushima H, Miyazono K. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:415-424.
- [54] Massagué J. *Cell.* 2008;134:215-230.
- [55] Partanen JI, Nieminen AI, Klefstrom J. *Cell Cycle.* 2009;8(5):716-724.
- [56] Nelson DA, White E. *Genes Dev.* 2004;18:1223-1226.
- [57] Apel A, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. *Int J.Cancer.* 2009;125:991-995.
- [58] White E, DiPaola RS. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5308-5316.
- [59] Aguirre-Ghiso JA. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:834-846.
- [60] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. *Cancer Cell.* 2006;10:51-64.

- [61] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. *Cell*. 2010;140:883-899.
- [62] Qian BZ, Pollard JW. *Cell*. 2010;141:39-51.
- [63] Artandi SE, DePinho RA. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):9-18.
- [64] Raynaud CM, Hernandez J, Llorca FP, Nuciforo P, Mathieu MC, Commo F, Delalogue S, Sabatier L, André F, Soria JC. *Am J Clin Oncol*. 2010;33(4):341-345.
- [65] Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. *Nucl Acids Res*. 2007;35(22):7505-7513.
- [66] Zhu H, Fu W, Mattson MP. *J Neurochem*. 2000;75(1):117-124.
- [67] Fu W, Begley JG, Killen MW, Mattson MP. *J Biol Chem*. 1999;274(11):7264-7271.
- [68] Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(18):10308-10313.
- [69] Fu W, Killen M, Culmsee C, Dhar S, Pandita TK, Mattson MP. *J Mol Neurosci*. 2000;14:3-15.
- [70] Baeriswyl V, Christofori G. *Sem Cancer Biol*. 2009;19:329-337.
- [71] Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JAH. *Endocr Rev*. 2003;24(5):600-632.
- [72] Hanahan D, Folkman J. *Cell*. 1996;86:353-364.
- [73] Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. *Am J Hematol*. 2010;85:593-598.
- [74] Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:102-111.
- [75] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. *Am J Pathol*. 2000;156(4):1363-1380.
- [76] Zumsteg A, Christofori G. *Curr Opin Oncol*. 2008;21:60-70.
- [77] De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. *Trends Immunol*. 2007;28(12):519-524.
- [78] Polyak K, Weinberg RA. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:265-273.
- [79] Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. *Cell*. 2009;139:871-890.
- [80] Klymkowsky MW, Savagner P. *Am J Pathol*. 2009;174(5):1588-1593.
- [81] Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. *J Cell Physiol*. 2007;213:374-383.
- [82] Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, Cano A. *J Cell Sci*. 2004;117(13):2827-2839.
- [83] Joyce JA, Pollard JW. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:239-252.
- [84] Supuran CT. *Metabolites*. 2017;7:48.
- [85] Jones RG, Thompson CB. *Genes Dev*. 2009;23:537-548.
- [86] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. *Cell Metab*. 2008;7:11-20.

- [87] Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, Yang C, Do QN, Doucette S, Burguete D, Li H, Huet G, Yuan Q, Wigal T, Butt Y, Ni M, Torrealba J, Oliver D, Lenkinski RE, Malloy CR, Wachsmann JW, Young JD, Kernstine K, DeBerardinis RJ. *Cell*. 2017;171:358-371.
- [88] Feron O. *Radiother Oncol*. 2009;92:329-333.
- [89] Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3930-3942.
- [90] Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, Signori E, Honoki K, Georgakilas AG, Amin A, Helferich WG, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Fukii H, Aquilano K, Ashraf SS, Newsheer S, Yang X, Choi BK, Kwon BS. *Sem Cancer Biol*. 2015;35:S185-S198.
- [91] Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. *J Leukoc Biol*. 2008;84:988-993.
- [92] Kim R, Emi M, Tanabe K. *Immunology*. 2007;121:1-14.
- [93] Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2010;5:51-75.
- [94] Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:220-228.
- [95] Jackson SP, Bartek J. *Nature*. 2009;461:1071-1078.
- [96] Kastan MB. *Mol Cancer Res*. 2008;6(4):517-524.
- [97] de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. *Nat Rev Cancer* 2006;6:24-37.
- [98] DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:309-316.
- [99] Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. *Clin Cancer Res*. 2009;15(2):425-430.
- [100] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Nature*. 2008;454:436-444.
- [101] Balkwill F, Mantovani A. *Lancet*. 2001;357(9255):539-545.
- [102] Li Y, He K, Huang Y, Zheng D, Gao C, Cui L, Jin YH. *Mol Carcinogen*. 2010;49:630-640.
- [103] Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. *PloS ONE*. 2009;4(4):e5361.
- [104] Fulda S. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(1):140-146.
- [105] Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM. *J Biol Chem*. 1998;273(51):33942-33948.
- [106] Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Yu J. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93:417-425.
- [107] Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. *Dalton Trans*. 2018;47(19):6645.

- [108] van Hasselt JGC, Boekhout AH, Beijnen JH, Schellens JHM, Huitema ADR. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(1):127-132.
- [109] Sliesoraitis S, Tawfik B. *J Am Osteopath Assoc.* 2011;111(7):437-441.
- [110] Milosavljevic N, Duranton C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT, Rauch C, Tauc M, Counillon L, Poët M. *Cancer Res.* 2010;70(19):7514-7522.
- [111] Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. *Cardiology.* 2010;115:155-162.
- [112] Littleton RE, Homesley HD, Richards II F. *Gynecol Oncol.* 1984;19:268-277.
- [113] Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Juszczak M, Grabarska A, Sifringer M, Kaczor J, Kandefor-Szerszeń M. *Bas Clin Pharmacol Toxicol.* 2009;105:425-432.
- [114] Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F. *Cancer Lett.* 2002;175:17-25.
- [115] Emmerich D, Vanchanagiri K, Baratto LC, Schmidt H, Paschke R. *Eur J Med Chem.* 2014;75:460-466.
- [116] K. Newkirk, J. Heffern, E. Sloman-Moll, R. B. Sessions, A. A. Rasmussen, P. A. Andrews, K. J. Cullen, *Cancer Chemother Pharmacol.* 40 (1997), 75-80.
- [117] Laszczyk M. *Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork (Betula alba cortex) [Diss].* Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. 2007;65.
- [118] Jonnalagadda SC, Corsello MA, Sleet CE. *Anti-Cancer Agents Med Chem.* 2013;13(10):1477-1499.
- [119] Kommera H, Kaluđerović GN, Bette M, Kalbitz J, Fuchs P, Fulda S, Mier W, Paschke R. *Chem Biol Interact.* 2010;185:128-136.
- [120] Kommera H, Kaluđerović GN, Kalbitz J, Dräger B, Paschke R. *Eur J Med Chem.* 2010;45:3346-3353.
- [121] Drag-Zalesinska M, Kulbacka J, Saczko J, Wysocka T, Zabel M, Surowiak P, Drag M. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19:4814-4817.
- [122] Krasutsky PA. *Nat Prod Rep.* 2006;23:919-942.
- [123] Cichewicz RH, Kouzi SA. *Med Res Rev.* 2004;24(1):90-114.
- [124] Mukherjee R, Kumar V, Srivastava SK, Agarwal SK, Burman AC. *Anti-Cancer Agents Med Chem.* 2006;(3):271-279.
- [125] Yogeewari P, Sriram D. *Curr Med Chem.* 2005;12(6):657-666.
- [126] Supuran CT, Scozzafava A. *Curr Med Chem Imm Endoc Metab Agents.* 2001;1(1):61-97.
- [127] Sly WS, Hu PY. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:375-401.

- [128] Tashian RE. *BioEssays*. 1989;10(6):186-192.
- [129] Silverman DN, Lindskog S. *Acc Chem Res*. 1988;21:30-36.
- [130] Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM. *Nature*. 2006;441:437-443.
- [131] Romero MF, Fulton CM, Boron WF. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;447:495-509.
- [132] Christianson DW, Cox JD. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:33-57.
- [133] Christianson DW, Fierke CA. *Acc Chem Res*. 1996;29(7):331-339.
- [134] Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taguchi T, Onishi S. *J Biol Chem*. 1999;274(30):21228-21233.
- [135] Supuran CT. *Expert Opin Ther Patents*. 2018;28(10):709-712.
- [136] Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. *Expert Opin Ther Patents*. 2006;16(12):1627-1664.
- [137] Supuran CT. *Biochem J*. 2016;473:2023-2032.
- [138] Whittington DA, Waheed A, Ulmasov B, Shah GN, Grubb JH, Sly WS, Christianson DW. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(17):9545-9550.
- [139] Švastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zaťovičová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. *FEBS Lett*. 2004;577:439-445.
- [140] Alterio V, Hilvo M, Di Fiore A, Supuran CT, Pan P, Parkkila S, Scaloni A, Pastorek J, Pastorekova S, Pedone C, Scozzafava A, Monti SM, De Simone G. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(38):16233-16238.
- [141] Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, Scaloni A, Matulis D, Innocenti A, Scozzafava A, Monti SM, Di Fiore A, De Simone G, Lindfors M, Jänis J, Valjakka J, Pastoreková S, Pastorek J, Kulomaa MS, Nordlund HR, Supuran CT, Parkkila S. *J Biol Chem*. 2008;283(41):27799-27809.
- [142] Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. *Cancer Res*. 2000;60:7075-7083.
- [143] Neri D, Supuran CT. *Nature Rev Drug Discov*. 2011;10:767-777.
- [144] Scheurer SB, Rybak JN, Rösli C, Neri D, Elia G. *Proteomics*. 2004;4:1737-1760.
- [145] Gatenby RA, Gillies RJ. *Nature Rev Cancer*. 2004;4:891-899.
- [146] Warburg O. *Science*. 1956;124:269-270.
- [147] Huang LE, Bunn HF. *J Biol Chem*. 2003;278(22):19575-19578.
- [148] Tafreshi NK, Lloyd MC, Proemsey JB, Bui MM, Kim J, Gillies RJ, Morse DL. *Mol Imaging Biol*. 2016;18:219-231.

- [149] Staab A, Loeffler J, Said HM, Diehlmann D, Katzer A, Beyer M, Fleischer M, Schwab F, Baier K, Einsele H, Flentje M, Vordermark D. *BMC Cancer*. 2007;7:213.
- [150] McDonald DM, Baluk P. *Cancer Res*. 2002;62:5381-5385.
- [151] Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9030-9037.
- [152] Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):515-527.
- [153] Arismendi-Morillo G. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807:602-608.
- [154] Hall A, Damm Meyle K, Krarup Lange M, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, Abildgaard C, Thorup K, Moghimi SM, Jensen PB, Bartek J, Guldborg P, Christensen C. *Oncotarget*. 2013;4:584-599.
- [155] Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(17):5992-5997.
- [156] Warburg O, Wind F, Negelein E. *J Gen Physiol*. 1927;8:519-530.
- [157] Ebbesen P, Pettersen EO, Gorr TA, Jost G, Williams K, Kieninger J, Wenger RH, Pastorekova S, Dubois L, Lambin P, Wouters BG, Van Den Beucken T, Supuran CT, Poellinger L, Ratcliffe P, Kanopka A, Görlach A, Gasmann M, Harris AL, Maxwell P, Scozzafava A. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009;24(S1):1-39.
- [158] Williams KJ, Telfer BA, Xenaki D, Sheridan MR, Desbaillets I, Peters HJW, Honess D, Harris AL, Dachs GU, van der Kogel A, Stratford IJ. *Radiother Oncol*. 2005;75:89-98.
- [159] Moeller BJ, Cao Y, Chuan YL, Dewhirst MW. *Cancer Cell*. 2004;5:429-441.
- [160] Semenza GL. *Trends Mol Med*. 2001;7(8):345-350.
- [161] Supuran CT. *Nature Rev Drug Discov*. 2008;7:168-181.
- [162] Supuran CT, Scozzafava A. *Expert Opin Ther Patents*. 2000;10(5):575-600.
- [163] Vitale RM, Alterio V, Innocenti A, Winum JY, Monti SM, De Simone G, Supuran CT. *J Med Chem*. 2009;52(19):5990-5998.
- [164] Temperini C, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18:4282-4286.
- [165] Abbate F, Supuran CT, Scozzafava A, Orioli P, Stubbs MT, Klebe G. *J Med Chem*. 2002;45(7):3583-3587.
- [166] Bache M, Bernhardt S, Passin S, Wichmann H, Hein A, Zschornak M, Kappler M, Taubert H, Paschke R, Vordermark D. *Int J Mol Sci*. 2014;15:19777-19790.
- [167] Bache M, Zschornak MP, Passin S, Keßler J, Wichmann H, Kappler M, Paschke R, Kaluđerović GN, Taubert H, Vordermark D. *Radiat Oncol*. 2011;6:111.

- [168] Karna E, Szoka L, Palka JA. *Mol Cell Biochem.* 2010;340:15-20.
- [169] Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, Kyle A, auf dem Keller U, Leung S, Huntsman D, Clarke B, Sutherland BW, Waterhouse D, Bally M, Roskelley C, Overall CM, Minchinton A, Pacciano F, Carta F, Scozzafava A, Tousini N, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. *Cancer Res.* 2011;71(9):3364-3376.
- [170] U. S. National Library of Medicine. *A Study of SLC-0111 and Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Ductal Cancer in Subjects Positive for CAIX (SLC-0111-17-01)*. 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03450018> abgerufen am 11. Dez. 2019.
- [171] Lopez M, Vu H, Wang CK, Wolf MG, Groenhof G, Innocenti A, Supuran CT, Poulsen SA. *J Am Chem Soc.* 2011;133:18452-18462.
- [172] Pocker Y, Stone JT. *Biochem.* 1967;6(3):668-678.
- [173] Eng H, Niosi M, McDonald TS, Wolford A, Chen Y, Simila STM, Bauman JN, Warmus J, Kalgutkar AS. *Xenobiotica.* 2010;40(6):369-380.
- [174] Wachsberger PR, Burd R, Wahl ML, Leeper DB. *Int J Hyperthermia.* 2002;18(2):153-164.
- [175] Noda Y, Kaiya T, Kohda K, Kawazoe Y. *Chem Pharm Bull.* 1997;45(10):1665-1670.
- [176] Winum JY, Pastorekova S, Jakubickova L, Montero JL, Scozzafava A, Pastorek J, Vullo D, Innocenti A, Supuran CT. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15:579-584.
- [177] Okada M, Iwashita S, Koizumi N. *Tetrahedron Lett.* 2000;41:7047-7051.
- [178] Appel R, Berger G. *Chem Ber.* 1958;91:1339-1341.
- [179] Becker H, Berger W, Domschke G, Fanghänel E, Faust J, Fischer M, Gentz F, Gewalt K, Gluch R, Mayer R, Müller K, Pavel D, Schmidt H, Schollberg K, Schwetlick K, Seiler E, Zeppenfeld G. *Organikum, organisch-chemisches Grundpraktikum*. 11. Auflage. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften. 1972; 622.
- [180] Schwarz S, Thieme I, Richter M, Undeutsch B, Henkel H, Elger W. *Steroids.* 1996;61:710-717.
- [181] Winum JY, Vullo D, Casini A, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT. *J Med Chem.* 2003;46(11):2197-2204.
- [182] Kommera H, Kaluderović GN, Dittrich S, Kalbitz J, Dräger B, Mueller T, Paschke R. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20:3409-3412.
- [183] Csuk R, Barthel A, Schwarz S, Kommera H, Paschke R. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:2549-2558.

- [184] Holleman AF, Wiberg E, Wiberg N. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Berlin: Walter de Gruyter. 2007;2006.
- [185] Bats JW, Coppens P, Koetzle TF. *Acta Cryst*. 1977;B33:37-45.
- [186] Mohamed IE, Choudhary MI, Ali S, Anjum S, Atta-ur-Rahman. *Acta Cryst*. 2006;E62:o1352-o1354.
- [187] da Silva GNS, Maria NRG, Schuck DC, Cruz LN, de Moraes MS, Nakabashi M, Graebin C, Gosman G, Garcia CRS, Gnoatto SCP. *Malaria J*. 2013;12:89.
- [188] Bildziukevich U, Vida N, Rárová L, Kolář M, Šaman D, Havlíček L, Drašar P, Wimmer Z. *Steroids*. 2015;100:27-35.
- [189] Flekhter OB, Karachurina LT, Poroikov VV, Nigmatullina LP, Baltina LA, Zarudii FS, Davydova VA, Spirikhin LV, Baikova IP, Galin FZ, Tolstikov GA. *Rus J Bioorg Chem*. 2000;26(3):192-200.
- [190] Flekhter OB, Medvedeva NI, Karachurina LT, Baltina LA, Galin FZ, Zarudii FS, Tolstikov GA. *Pharm Chem J*. 2005;39(8):401-404.
- [191] Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, Janzen WP, Chen IS, Lee KH. *J Nat Prod*. 1994;57(2):243-247.
- [192] Bruno E, Buemi MR, De Luca L, Ferro S, Monforte AM, Supuran CT, Vullo D, De Sarro G, Russo E, Gitto R. *ChemMedChem*. 2016;11:1812-1818.
- [193] Gitto R, Agnello S, Ferro S, De Luca L, Vullo D, Brynda J, Mader P, Supuran CT, Chimirri A. *J Med Chem*. 2010;53(6):2401-2408.
- [194] Casini A, Winum JY, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:837-840.
- [195] Maharani R, Brownlee RTC, Hughes AB, Abbott BM. *Tetrahedron*. 2014;70:2351-2358.
- [196] Carpino LA. *J Am Chem Soc*. 1993;115(10):4397-4398.
- [197] König W, Geiger R. *Chem Ber*. 1970;103:788.
- [198] Valeur E, Bradley M. *Chem Soc Rev*. 2009;38:606-631.
- [199] Thea S, Cevasco G, Guanti G, Williams A. *J Chem Soc Chem Commun*. 1986;1582-1583.
- [200] Cohen E, Klarberg B. *J Am Chem Soc*. 1962;84:1994-2002.
- [201] Brodfuehrer JI, Powis G. *J Chromatogr*. 1988;427:247-255.
- [202] Sun IC, Wang HK, Kashiwada Y, Shen JK, Cosentino LM, Chen CH, Yang LM, Lee KH. *J Med Chem*. 1998;41:4648-4657.

- [203] Coric P, Turcaud S, Souquet F, Briant L, Gay B, Royer J, Chazal N, Bouaziz S. *Eur J Med Chem.* 2013;62:453-465.
- [204] U. S. National Library of Medicine. *A Phase 2 Study to Assess the Pharmacokinetics of Bevirimat 100 mg Tablets Given to HIV-1 Positive Patient for 15 Days.* 2010. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01097070> abgerufen am 01. Nov. 2018.
- [205] Hashimoto F, Kashiwada Y, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH. *Bioorg Med Chem.* 1997;5(12):2133-2143.
- [206] Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH. *J Med Chem.* 1996;39(5):1016-1017.
- [207] Lan P, Wang J, Zhang DM, Shu C, Cao HH, Sun PH, Wu XM, Ye WC, Chen WM. *Eur J Med Chem.* 2011;46:2490-2502.
- [208] Soler F, Poujade C, Evers M, Carry JC, Hénin Y, Bousseau A, Huet T, Pauwels R, De Clercq E, Mayaux JF, Le Pecq JB, Dereu N. *J Med Chem.* 1996;39(5):1069-1083.
- [209] Urban M, Sarek J, Klinot J, Korinkova G, Hajduch M. *J Nat Prod.* 2004;67(7):1100-1105.
- [210] Yin J, Wu T, Song J, Zhang Q, Liu S, Xu R, Duan H. *Chem Mater.* 2011;23:4756-4764.
- [211] Roskoski R. *Michaelis-Menten Kinetics.* In: Enna SJ, Bylund DB (Hrsg). *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* Elsevier. 2008;1-10.
- [212] Michaelis L, Menten ML. *Biochem Z.* 1913;49:333-369.
- [213] Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT. *J Bio Chem.* 1967;242(18):4221-4229.
- [214] Bayram E, Senturk M, Kufrevioglu OI, Supuran CT. *Bioorg Med Chem.* 2008;16:9101-9105.
- [215] Serjeant EP, Dempsey B (Hrsg). *Ionisation constants of organic acids in aqueous solution.* Oxford, New York: Pergamon Press. 1979;295.
- [216] Bowers Jr GN, McComb RB, Christensen RG, Schaffer R. *Clin Chem.* 1980;26(6):724-729.
- [217] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Boeksch H, Kenney S, Boyd MR. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-1112.
- [218] Vanchanagiri K, Emmerich D, Brusckke M, Bache M, Seifert F, Csuk R, Vordermark D, Paschke R. *Chem Biol Interact.* 2018;284:12-23.
- [219] Wiemann J, Heller L, Perl V, Kluge R, Ströhl D, Csuk R. *Eur J Med Chem.* 2005;106:194-210.
- [220] Sommerwerk S, Heller L, Kuhfs J, Csuk R. *Eur J Med Chem.* 2016;122:452-464.

- [221] Siewert B, Pianowski E, Obernauer A, Csuk R. *Bioorg Med Chem.* 2014;22:594-615.
- [222] Sommerwerk S, Heller L, Kerzig C, Kramell AE, Csuk R. *Eur J Med Chem.* 2017;127:1-9.
- [223] Huyke C, Reuter J, Rodig M, Kersten A, Laszczyk M, Scheffler A, Nashan D, Schempp C. *J Ger Soc Dermatol.* 2009;7(2):128-133.
- [224] Huyke C, Laszczyk M, Scheffler A, Ernst R, Schempp CM. *J Ger Soc Dermatol.* 2006;4(2):132-136.
- [225] Sun YF, Song CK, Viernstein H, Unger F, Liang ZS. *Food Chem.* 2013;138(4):1998-2007.
- [226] Mullauer FB, van Bloois L, Daalhuisen JB, Ten Brink MS, Storm G, Medema JP, Schiffelers RM, Kessler JH. *Anti-Cancer Drugs.* 2011;22(3):223-233.
- [227] Dutta D, Brahamacharry P, Mukherjee B, Mondal L, Sen S, Chowdhury C, Debnath MC. *Nature Sci Rep.* 2019;9:11506.
- [228] Dai L, Yang T, He J, Deng L, Liu J, Wang L, Lei J, Wang L. *J Mater Chem B.* 2014;2:6749-6757.
- [229] Liebscher G. *Testung neuer Antitumorwirkstoffe an primären Pferdetumorzelllinien und Beiträge zur Aufklärung des Wirkmechanismus [Masterarbeit].* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 2014.
darin **a:** 3-4, **b:** 16-20.
- [230] Tijjani A, Ndukwe IG, Ayo RG. *Trop J Pharm Res.* 2012;11(2):259-262.
- [231] Patra A, Chaudhuri SK, Panda SK. *J Nat Prod.* 1988;51(2):217-200.
- [232] Emmerich D. *Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Anti-Tumor-Wirkung von Acetylbetulinsäure-cis-Platin-Konjugaten [Masterarbeit].* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 2012;46-49.

Abbildungsverzeichnis

| | Seite |
|--|--------------|
| Abbildung 1: Strukturformel von Betulin. | 1 |
| Abbildung 2: Biosynthese von Squalen. | 2 |
| Abbildung 3: Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen. | 3 |
| Abbildung 4: Reaktionsschema der Umwandlung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat in der Carboanhydrase. | 8 |
| Abbildung 5: Ein Modellvorschlag des Proteinkomplexdimers der humanen CA IX. | 9 |
| Abbildung 6: Koordination eines Sulfonamids an das katalytische Zentrum einer Carboanhydrase. | 11 |
| Abbildung 7: Schema der erwarteten Wirkung eines Betulinsulfamats auf eine Tumorzelle mit exprimierter CA IX am Beispiel von Substanz 30 . | 13 |
| Abbildung 8: Abbau von Chlorsulfurylisocyanat zu Sulfamylchlorid. | 15 |
| Abbildung 9: Syntheschema für die Betulinsulfamate 5 und 6 . | 15 |
| Abbildung 10: Syntheschema für das Betulinsäuresulfamat 7 . | 17 |
| Abbildung 11: Syntheschema für die Betulincarbamatsulfate 8 und 9 . | 17 |
| Abbildung 12: Syntheschema für die Betulinacetate 1-3 und die daraus hergestellten Sulfamate 10 und 11 . | 19 |
| Abbildung 13: Syntheschema für die Octylsulfamate 12 und 13 . | 20 |
| Abbildung 14: Syntheschema für das Betulinhemisuccinat 14 und die daraus hergestellten Amidalkohole 22 und 24 . | 20 |
| Abbildung 15: Mechanismus der HOBt/HATU-Kopplung. | 21 |
| Abbildung 16: Syntheschema für das Betulinhemisuccinat 15 und die daraus hergestellten Amidalkohole 23 und 25 . | 22 |
| Abbildung 17: Syntheschema für die Hemisuccinate und Hemiglutarate 14-21 und die daraus hergestellten Sulfonamide 26-33 . | 24 |

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 18: Syntheschema für Acetylbetulinsäure 4 und das daraus hergestellte Sulfonamid 34 . | 26 |
| Abbildung 19: Syntheschema für das Sulfonamid 35 . | 27 |
| Abbildung 20: Beispiel eines Michaelis-Menten-Plots. | 29 |
| Abbildung 21: Beispiel eines Lineweaver-Burk-Plots. | 30 |
| Abbildung 22: Strukturformel von Sulforhodamin B. | 32 |
| Abbildung 23: Auftragung der IC ₅₀ -Werte gegen die Selektivitäten für alle Substanzen, für die Selektivitätswerte ermittelt werden können. | 39 |
| Abbildung 24: Selektivitäten und IC ₅₀ -Werte der Acetylbetulinderivate 14-21 und 26-33 , kategorisiert danach, ob sich das Molekül vom 28-Acetylbetulin oder vom 3-Acetylbetulin ableitet. | 40 |
| Abbildung 25: Selektivitäten und IC ₅₀ -Werte der Acetylbetulinderivate 14-21 und 26-33 , kategorisiert danach, ob das Molekül eine freie Carbonsäure als funktionelle Gruppe aufweist oder es mit Taurinamid verknüpft ist. | 41 |
| Abbildung 26: Selektivitäten und IC ₅₀ -Werte der Acetylbetulinderivate 14, 15, 18, 19, 26, 27, 30 und 31 , kategorisiert danach, ob der Spacerteil mit Bernsteinsäure- oder Glutarsäureanhydrid synthetisiert wurde. | 42 |
| Abbildung 27: Selektivitäten und IC ₅₀ -Werte der Acetylbetulinderivate 14, 16-18, 20, 21, 26, 28-30, 32 und 33 , kategorisiert danach, ob die Kohlenstoffkette im Spacer unverzweigt ist, eine 3-Methylgruppe oder eine 2-Methylgruppe enthält. | 43 |
| Abbildung 28: Struktur-Wirkungs-Vergleiche der Acetylbetulinderivate gegenüber der Zelllinie HT29. | 45 |

Tabellenverzeichnis

| | Seite |
|---|--------------|
| Tabelle 1: Ausgewählte NMR-Daten von Betulin, 5 und 6 . | 16 |
| Tabelle 2: Einige NMR-Daten von Betulinsäure und ihrem Sulfamat 7 . | 17 |
| Tabelle 3: ¹ H-NMR-Verschiebungen in den Substituenten der Verbindungen 8 und 9 im Vergleich mit dem Disulfamat 6 und Bis(ethylcarbamy)betulin BECB. | 18 |
| Tabelle 4: Ausgewählte ¹ H- und ¹³ C-NMR-Verschiebungen des Hemisuccinats 14 und des daraus hergestellten Sulfonamids 26 im Vergleich mit ihren Ausgangsstoffen. | 25 |
| Tabelle 5: Ausgewählte ¹ H- und ¹³ C-NMR-Verschiebungen des Betulinsäurederivats 34 im Vergleich mit den Ausgangsstoffen 4 und TA. | 26 |
| Tabelle 6: Ausgewählte ¹ H- und ¹³ C-NMR-Verschiebungen des Bernsteinsäurederivats 35 im Vergleich mit den Ausgangsstoffen Bernsteinsäure und TA. | 27 |
| Tabelle 7: IC ₅₀ -Werte der Substanzen in µM mit ihren Standardabweichungen gegenüber verschiedenen Zelllinien. | 33 |
| Tabelle 8: Selektivitäten der Substanzen, für die IC ₅₀ -Werte von NIH-3T3 aufgenommen wurden. | 38 |
| Tabelle 9: Schlüssel der beim SRB-Test verwendeten Zelllinien. | 80 |

Bisherige Publikationen

Daniel Emmerich, Kranthi Vanchanagiri, Leopoldo C. Baratto, Harry Schmidt, Reinhard Paschke.

Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment.

European Journal of Medicinal Chemistry. 2014;75:460-466.

doi:10.1016/j.ejmech.2014.01.031

Matthias Bache, Christin Münch, Antje Güttler, Henri Wichmann, Katharina Theuerkorn, Daniel Emmerich, Reinhard Paschke, Dirk Vordermark.

Betulinyl Sulfamates as Anticancer Agents and Radiosensitizers in Human Breast Cancer Cells.

International Journal of Molecular Sciences. 2015;16:26249-26262.

doi:10.3390/ijms161125953

Kranthi Vanchanagiri, Daniel Emmerich, Monique Brusckke, Matthias Bache, Franziska Seifert, René Csuk, Dirk Vordermark, Reinhard Paschke.

Synthesis and biological investigation of new carbonic anhydrase IX (CAIX) inhibitors.

Chemico-Biological Interactions. 2018;284:12-23.

doi:10.1016/j.cbi.2018.02.014

Anja Hein, Marina Petrenko, Antje Güttler, Jacqueline Keßler, Henri Wichmann, Matthias Kappler, Daniel Emmerich, Reinhard Paschke, Dirk Vordermark, Matthias Bache.

Evaluation of the Betulinic Acid–Cisplatin Conjugate APC and its Precursor DE9B for the Treatment of Human Malignant Glioma.

Chemico-Biological Interactions. 2019;314:108841.

doi:10.1016/j.cbi.2019.108841

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Leuten bedanken, die es mir ermöglicht haben meine Promotion bis zum Ende durchzuhalten und diese Arbeit zu verfassen. Allen voran Prof. Dr. Reinhard Paschke, der mich unter seine Fittiche nahm, auch wenn wir aus verschiedenen Fakultäten stammen. Außerdem gebührt mein Dank Prof. Dr. René Csuk und Prof. Dr. Ekkehard Sinn, die sich bereiterklärt haben, meine Dissertation zu begutachten.

Besonderen Dank möchte ich Anne Funtan aussprechen, die mich im Labor tatkräftig unterstützte und die zusammen mit Valentin Schmidt, Monique Brusckke und Dr. Kranthi Vanchanagiri die Zytotoxizitätstests der Substanzen durchgeführt hat.

Ich danke Dr. Franziska Seifert dafür, dass sie sich trotz ihres engen Zeitplans und zahlreicher Rückschläge engagiert hat, mit Anne, Valentin und mir Enzymtests zu entwickeln.

Ferner danke ich den Leuten, die die chemischen Analysen meiner Substanzen durchgeführt haben: Das Team um Dr. Dieter Ströhl für die NMR-Messungen, Kerstin Schwarzer für die Elementaranalysen und insbesondere Dr. Ralph Kluge, der die Massenspektren aufnahm und mir den entscheidenden Hinweis für die ungewöhnliche Struktur der Substanzen **24** und **25** gab.

Besonderer Dank gebührt Charlotte Blake und Jan Ebenhan, die mich trotz der Schwierigkeiten und des nervenzerreibend langsamen Fortschritts dieser Promotion bei Laune gehalten haben.

Meiner Familie danke ich für moralische sowie finanzielle Unterstützung über die Jahre, auch wenn sich einige Mitglieder nicht mehr an den Früchten dieser Arbeit erfreuen können.

Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Daten

Daniel Emmerich

| | |
|---------------------|----------------------|
| Geburtsdatum | 21. Februar 1989 |
| Geburtsort | Lutherstadt Eisleben |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Ausbildung

| | |
|-------------------|---|
| seit 10.2012 | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Promotionsstudium Chemie (Dr. rer. nat.) Titel der Dissertation: „Betulinsulfonamide als Prodrug gegen hypoxische Tumoren“ |
| 10.2010 - 09.2012 | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Masterstudium Chemie Masterarbeit: „Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Anti-Tumor-Wirkung von Acetylbetulinsäure- <i>cis</i> -Platin-Konjugaten“ Abschluss: Master of Science (M. Sc.) |
| 10.2007 - 09.2010 | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Bachelorstudium Chemie Bachelorarbeit: „Synthese und Charakterisierung von funktionalisierten Aminosilanen“ Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.) |
| 08.2001 - 07.2007 | Georg-Cantor-Gymnasium Halle (Saale) Abschluss: Abitur |

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Betulinsulfonamide als Prodrug gegen hypoxische Tumoren“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Außer den im Anhang genannten Schriften wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus diesen Quellen entnommene Angaben wurden im Text kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in dieser oder ähnlicher Form bisher an keiner weiteren Universität oder Hochschule vorgelegt und weitere Promotionsversuche – besonders vergebliche – wurden nicht getätigt.

Halle (Saale), den 17. Dezember 2019

Daniel Emmerich