



**BERGISCHE
UNIVERSITÄT
WUPPERTAL**

**Neue Inhibitoren von onkogenem KRas4B auf Grundlage
pentacyclischer Triterpene – Synthesen, biologische Daten und
Mode of Action Untersuchungen**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.
angefertigt an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal**

Vorgelegt von

GERRIT ERNST BENARY

Wuppertal im April 2026

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck
Arbeitsgruppe für Organische Chemie
Bergische Universität Wuppertal

Zweitgutachter: Prof. Dr. Fabian Mohr
Arbeitsgruppe für Anorganische Chemie
Bergische Universität Wuppertal

Eingereicht am: 13.04.2026

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Gerrit Ernst Benary, geboren am 01.12.1990 in Göttingen, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Neue Inhibitoren von onkogenem Kras4B auf Grundlage pentacyclischer Triterpene – Synthesen, biologische Daten und *Mode of Action* Untersuchungen“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Wuppertal, den 13.04.2026



Gerrit Ernst Benary

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

G. E. Benary, F. Kilgenstein, S. Koller, J. Scherkenbeck, " Monophthalates of Betulinic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes Inhibit the SOS-Mediated Nucleotide Exchange and Impact PI3K/AKT Signaling in Oncogenic K-RAS4B Proteins" *RSC Adv.* **2025**, 15, 883-895.

Weitere Veröffentlichungen des Autors:

O. Pilgram, A. Keils, G. E. Benary, J. Müller, S. Merkl, S. Ngaha, S. Huber, F. Chevillard, A. Harbug, V. Magdolen, A. Heine, E. Böttcher-Friebertshäuser, S. Steinmetzer, "Improving the Selectivity of 3-Amidinophenylalanine-Derived Matriptase Inhibitors" *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 238, 114437.

N. Nett, S. Duewel, L. Schmermund, G. E. Benary, K. Ranaghan, A. Mulholland, D. J. Opperman, S. Hoebeinreich, " A Robust and Stereocomplementary Panel of Ene-Reductase Variants for Gram-Scale Asymmetric Hydrogenation" *Mol. Cat.* **2021**, 502, 111404.

M. Sauvaget, F. Hutton, R. Coull, S. Vavassori, K. Wang, A. Reznik, T. Chyker, C. G. Newfield, E. Euston, G. Benary, L. M. Schweizer, M. Schweizer, "The NHR1-1 of Prs1 and the Pentameric Motif 284KKCPK288 of Prs3 Permit Multi-Functionality of the PRPP Synthetase in *Saccharomyces Cerevisiae*" *FEMS Yeast Res.* **2019**, 19, foz006.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die Möglichkeit danken in seiner Arbeitsgruppe diese Promotion durchzuführen. Ich habe in dieser Zeit ein sehr interessantes und herausforderndes Thema bearbeiten dürfen, bei dem Er mir immer mit Ratschlägen und Lösungsansätzen zur Seite stand und mich unterstützt hat. In dieser Zeit konnte ich eine Menge lernen.

Ich danke besonders Prof. Dr. Fabian Mohr für das Erstellen des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Julia Bornhorst und Prof. Dr. Robert Göstl, die sich bereit erklärt haben als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren.

Des Weiteren danke ich Dr. Markus Roggel. Er stand mir bei Fragen und Problemen während meiner Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite.

Mein weiterer Dank geht an die analytische Abteilung der Bergischen Universität Wuppertal in Person von Ilka Polanz, Boris Ihmenkamp und Andreas Siebert für das Messen meiner Spektren sowie die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen bei analytischen Problematiken. Weiterhin danke ich Dr. Bert Klebl, Dr. Uwe Koch, Carsten Degenhart und Dr. Axel Choidas von der Firma Lead Discovery Center GmbH in Dortmund für das Messen der biologischen Assays.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde und Kollegen aus der Arbeitsgruppe Scherkenbeck: Marc Röger, Frank Kilgenstein, Tijanyi Zhou, Daniel Gülden, Manuela Zouatom, Benjamin Nava-Hoer, Oliver Borzek und insbesondere mein Box-Partner Sascha Koller. Wir hatten eine unvergessliche Zeit miteinander, sowohl im Labor als auch außerhalb, unter anderem bei diversen DnD-Abenden. Außerdem danke ich allen Mitgliedern des Doktorandenstammtischs, dass sich auch bei dem regelmäßigen Austausch aus den unterschiedlichen Fachgebieten gute Freundschaften entwickelt haben.

Gar nicht genug Danken kann ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer bedingungslos auf meinem Weg unterstützt haben und mich, wenn nötig gepusht und vorangetrieben haben. Ohne euch wäre ich nicht an dem Punkt, an dem ich jetzt bin.

Abschließend danke ich allen Freunden und Weggefährten, die ich sowohl während meines Studiums in Marburg als auch in meiner Zeit in Wuppertal kennen lernen durfte und die mich nach wie vor begleiten.

Christina Grosch, Timo Zschau und Daniel Schmitz danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abstract	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Aktueller Stand der Krebsforschung	1
1.2 Aufbau und Funktion von Ras	3
1.3 GDP/GTP-Austausch im Ras-SOS-Komplex	8
1.4 Ras Signaltransduktionswege Erk und Akt	10
1.5 Aktuelle Inhibitoren der Ras-SOS-Interaktion	13
1.6 Pentacyclische Triterpene in der medizinischen Chemie	23
2. Zielsetzung	28
3. Ergebnisse und Diskussion	29
3.1 Naturstoffextraktion von Betulin	29
3.2 Synthese von Derivaten der pentacyclischen Triterpene	32
3.2.1 Synthese der Derivate des Lupantyps	32
3.2.2 Synthese der Derivate des Ursantyps	40
3.2.3 Synthese der Derivate des Oleantyps	43
3.3 Biologische Daten	49
3.4 Molecular Modelling	69
3.4.1 Docking auf die S I/II und S II Bindestelle von KRas	70
3.4.2 Docking auf die KRas4B:SOS1-Interface Pocket von SOS	73
3.4.3 Docking auf die Interaktionsstelle von Ras ^{kat} an SOS	75
3.4.4 Docking auf Mg-Bindestellen am Interface von Ras ^{allo} -SOS	76
3.4.5 Identifikation neuer potenzieller Inhibitorstrukturen für die Bindestelle am Interface von Ras ^{allo} -SOS	95
3.5 Bicyclische Diterpene als vereinfachte Analoga von Betulinsäure?	104
3.5.1 Andrographolid als Leitstruktur?	104
3.5.2 Synthese eines bicyclischen Diterpens	105
4. Zusammenfassung	109
5. Experimentalteil	112
5.1 Computerchemische Methoden	112
5.1.1 <i>In silico</i> Docking	112

5.1.2 MM-GBSA-Berechnungen	112
5.1.3 Molekulardynamik-Simulation	113
5.2 Biologische Assays	113
5.2.1 Nukleotid Austausch Assay	113
5.2.2 <i>CellTiter-Glo</i> Assay	115
5.2.3 HTRF Akt/Erk-Phosphorylierungs Assay	115
5.2.4 NanoBRET Target Engagement Assay	116
5.2.5 HTRF KRas ^{WT} :SOS Protein-Protein Interaktionsassay	117
5.3 Allgemeine Angaben zur Laborpraxis	118
5.3.1 Reagenzien, Lösungsmittel und Laborgeräte	118
5.3.2 Chromatographische Methoden	119
5.3.3 Spektroskopische und analytische Methoden	120
5.3.3.1 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	120
5.3.3.2 Infrarotspektroskopie	121
5.3.3.3 Analytische High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	121
5.3.3.4 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)	121
5.4 Synthesevorschriften	122
5.4.1 Synthese der Derivate des Lupan-Typs	122
5.4.2 Synthese der Derivate des Ursan-Typs	152
5.4.3 Synthese der Derivate des Oleanotyps	161
5.4.4 Synthese des bicyclischen Diterpens	185
6. Literaturverzeichnis	189

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström	DMP	Dess-Martin-Periodinan
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	DMSO	Dimethylsulfoxid
AcOH	Essigsäure	DS	Dockingscore
Akt	Proteinkinase	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Ala	Alanin	EGFR	<i>EGF receptor</i>
allo	allosterisch		Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Äq	Äquivalent	EGTA	
Arf	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor		<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
Arg	Arginin	Erk	
Asn	Asparagin	EtOAc	Ethylacetat
Asp	Aspartat	ESI	<i>electro-spray ionisation</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FA	Ameisensäure
ber.	berechnet	FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
BnBr	Benzylbromid	Ftase	Farnesyltransferase
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	GAP	GTPase-aktivierende Proteine
BRAF	Serin/Threonin Kinase	GDP	Guanosindiphosphat
BzCl	Benzoylchlorid	GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>	gef.	gefunden
cat.	<i>catalytic</i>	ges.	gesättigt
CC ₂₀	<i>20% cytotoxicity concentration</i>	Gln	Glutamin
CDC25	<i>cell division cycle gene</i>	Glu	Glutamat
Cp	Cyclopentadien	Gly	Glycin
CTG	Cell Titer Glo®	Grb2	Adapterprotein in der Signalweiterleitung
CycHex	Cyclohexan	GTP	Guanosintriphosphat
CYPA	Cyclophilin A		[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
Cys	Cystein	HATU	
Da	Dalton		
DC	Dünnschichtchromatographie	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
DCM	Dichlormethan		
DH-Domäne	Dbl-Homology-Domäne	HER2	<i>human epidermal growthfactor-receptor 2</i>
DIPEA	N,N'-Diisopropylethylamin	His	Histidin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin		
DMF	N,N'-Dimethylformamid		

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	MM/GBSA	<i>Molecular Mechanics with Generalized Born Surface Area</i>
HPLC-MS	HPLC-Mass Spectrometry	MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
HRas	<i>Harvey Rat Sarcoma Virus</i>	µm	Micrometer
		µM	Micromol
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>	NBA	N-Bromacetamid
		NBS	N-Bromosuccinimide
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>	NF1	Neurofibrin1
		NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>	nM	Nanomol
HVR	Hyper-Variable Region	NMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
		NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Ile	Isoleucin	NRas	<i>Neuroblast Ras-Virus-okogene-homologue</i>
Icmt	<i>isoprenylcysteine carboxy-methyltransferase</i>	ns	Nanosekunden
		PDE6δ	Phosphodiesterase 6δ
IRS	Adapterprotein	PDK1	PIP ₃ -dependent kinase-1
<i>J</i>	Kopplungskonstante	PH-Domäne	Plackstrin-Homology-Domäne
<i>kat.</i>	katalytisch	Phe	Phenylalanin
<i>K_D</i>	Dissoziationskonstante	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
<i>K_I</i>	Inhibitionskonstante	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
KRas	<i>Kirsten Rat Sarcoma Virus</i>	PIP ₃	Phosphatidylinositol-4,5-triphosphat
LDC	Lead Discovery Center GmbH in Dortmund	PKB	Proteinkinase B
Leu	Leucin	P-Loop	<i>Phosphate-binding loop</i>
Lys	Lysin	POI	Protein of Interest
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-kinase	PPI	Protein-Protein-Interaktion
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure	ppm	<i>parts per million</i>
MEF	Maus-Embryofibroblasten	Pro	Prolin
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-kinase-Kinase	PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homologue</i>
MeOH	Methanol		
Met	Methionin	Rab	<i>Ras-related in brain protein</i>
MHz	Megahertz		
Min	Minute		
mM	Millimol		

Ran	<i>Ras-related Nuclear protein</i>
Rem	<i>Ras Exchange Motif</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
Rt	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung
Ser	Serin
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
S-II P	Switch II Pocket
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
TBAF	<i>tert</i> -Butylammoniumfluorid
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
t _r	Retentionszeit
Trp	Tryptophan
Ub	Ubiquitin
Val	Valin
Wt	Wildtyp

Abstract

Deutsche Version

Pentacyclische Triterpene stellen aufgrund ihres starren Grundgerüsts eine strukturell anspruchsvolle Naturstoffklasse dar. Ziel dieser Arbeit war die gezielte chemische Modifikation von Betulin, Betulinsäure, Oleanol- und Ursolsäure zur Entwicklung neuer KRas4B-Inhibitoren. Durch Acylierungen, Amidkupplungen, Oxidationen und die Einführung von Phthalat-, Hydroxamsäure- und Tetrazolgruppen wurde eine Bibliothek funktionalisierter Derivate synthetisiert. Besonders Phthalat-Substituenten in Position 3 führten zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay (IC_{50} -Werte bis in den nanomolaren Bereich gegen KRas^{G12D} und im einstellig mikromolaren Bereich gegen KRas^{G12V}). Glide-Docking- und Moleküldynamikstudien identifizierten eine bislang unbeschriebene allosterische Bindetasche an dem KRas4B^{allo}:SOS-Interface, in der die Dimethoxyphthalat-Derivate stabile Komplexe (Dockingscores bis -12.2 kcal/mol) bilden. Das zentrale Bindungsmotiv beschreibt die Chelatisierung des Mg²⁺-Ions durch einen Phthalat-Rest, während sich das Grundgerüst entlang der Ras^{allo}-SOS^{Rem}-Interface anlagert. Dadurch wird die Tyr64^{Ras}-SOS^{Rem}-Interaktion gestört, die für die Stabilisierung der aktiven SOS-Konformation verantwortlich ist. Durch die Störung dieser Wechselwirkung kann der GDP/GTP-Austausch nicht mehr stattfinden. Trotz begrenzter „drug-likeness“ markieren phthalatmodifizierte Triterpene einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung strukturell distinkter, allosterischer Pan-Ras-Inhibitoren, die auch die schwer adressierbare KRasG12V-Mutante erfassen.

English Version

Pentacyclic triterpenes represent a structurally demanding class of natural products due to their rigid polycyclic carbon framework. The aim of this study was the targeted chemical modification of betulin, betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid to develop novel KRas4B inhibitors. A library of functionalized derivatives was synthesized by employing acylations, amide couplings, oxidations, and the introduction of phthalate, hydroxamic acid, and tetrazole moieties. Phthalate substituents in position 3 proved particularly effective, leading to a pronounced increase in activity in the GDP/GTP exchange assay (IC_{50} values in the nanomolar range against KRas^{G12D} and low micromolar range against KRas^{G12V}). Glide docking and molecular dynamics simulations revealed a previously uncharacterized allosteric binding pocket at the KRas4B^{allo}:SOS interface, in which dimethoxyphthalate derivatives form stable complexes (up to -12.2 kcal/mol). The key binding motif involves chelation of the Mg²⁺ ion by a phthalate residue, while the triterpene scaffold aligns along the Ras^{allo}-SOS^{Rem} interface. This interaction disrupts the Tyr64^{Ras}-SOS^{Rem} contact, which is essential for stabilizing the catalytically active SOS conformation, thereby preventing GDP/GTP exchange. Despite their limited drug-likeness, phthalate-modified triterpenes represent a promising starting point for the development of structurally distinct, allosteric pan-Ras inhibitors capable of targeting even the pharmacologically challenging KRas^{G12V} mutant.

1. Einleitung

1.1 Aktueller Stand der Krebsforschung

Die Entstehung von Krebserkrankungen durch Mutation und Metastasierung gesunder Körperzellen ist ein evolutionäres Phänomen, dass die Menschheit seit jeher begleitet. Trotz erheblicher Fortschritte in der Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten stellen maligne Erkrankungen nach wie vor eine der größten globalen Gesundheitsbedrohungen dar. Im Jahr 2020 wurden laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) weltweit nahezu 10 Millionen krebsbedingte Todesfälle registriert. Zu den häufigsten Krebsformen zählen Brust-, Lungen-, Darm-, Prostata-, Haut- und Magenkrebs, die jedoch teils stark divergente Mortalitätsraten aufweisen. Die letalste Form war dabei der Lungenkrebs mit einer Sterblichkeitsrate von 82%.^[1]

Eine weitere klinisch besonders herausfordernde Entität ist das Pankreaskarzinom. Die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose liegt hier bei lediglich 11%.^[2] Angesichts dieser alarmierenden Zahlen richtet sich ein erheblicher Teil der aktuellen biomedizinischen Forschung auf ein vertieftes Verständnis der Tumorbilogie sowie auf die Entwicklung innovativer Therapieansätze.

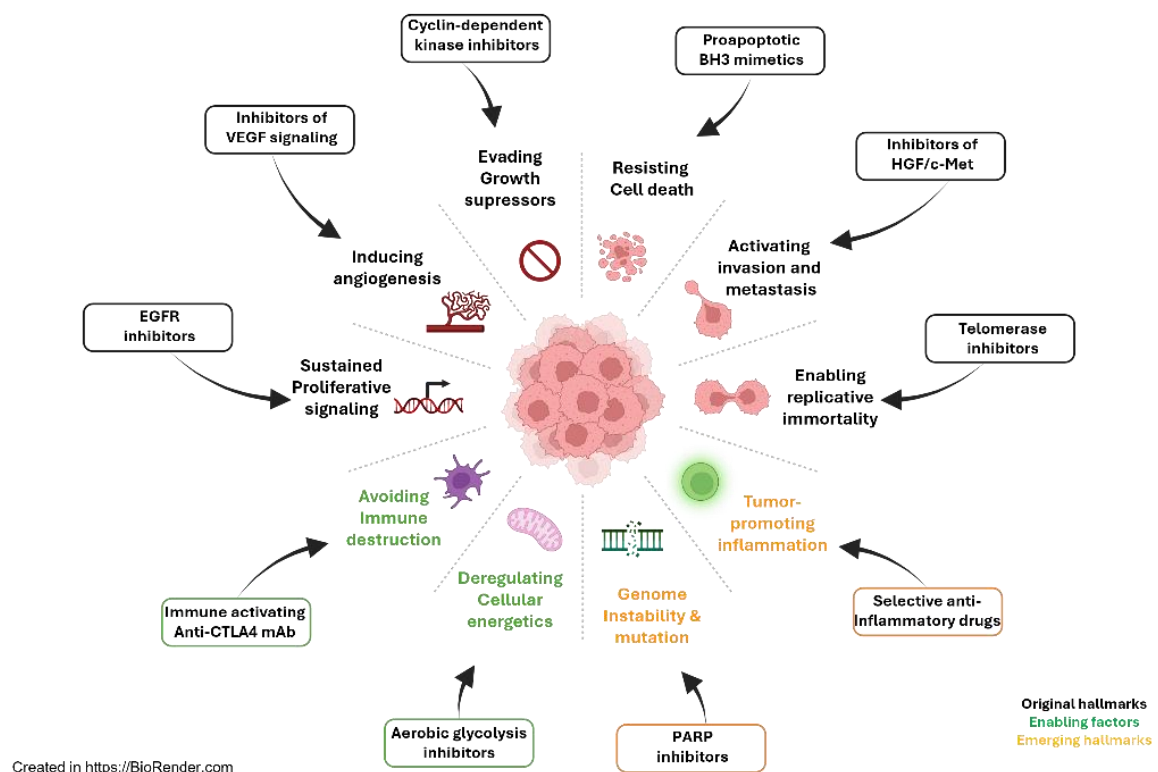


Abbildung 1: Darstellung der Hallmarks of Cancer nach HANAHAN und WEINBERG.^[3-5]

Angesichts der Tatsache, dass Tumore prinzipiell jedes Organ betreffen können und sich in zahlreichen Formen manifestieren, stellt Krebs kein einheitliches Krankheitsbild, sondern ein hochkomplexes pathophysiologisches Syndrom dar. Einen paradigmatischen Beitrag zur Systematisierung dieser Komplexität lieferten HANAHAN und WEINBERG im Jahr 2000 mit der Einführung des Konzepts der „Hallmarks of Cancer“.^[5] Dieses Modell beschreibt fundamentale biologische Fähigkeiten, die maligne Zellen zur Ermöglichung von Tumorprogression und -persistenz erwerben müssen. In den Jahren 2011 und 2022 wurde das Konzept um weitere Schlüsselmerkmale erweitert (Abb. 1).^[3–5]

Die therapeutische Behandlung von Krebserkrankungen erfordert aufgrund ihrer Komplexität einen multimodalen Ansatz. Erste systematische Therapieansätze gehen auf Arbeiten von PAUL EHRLICH zu Beginn des 20. Jahrhunderts zurück.^[6,7] Hierbei fanden zunächst arsenhaltige Verbindungen wie die Fowlersche Lösung Anwendung. Aufgrund ihrer ausgeprägten Eigentoxizität wurden diese Substanzen ab den späten 1940er-Jahren durch stickstoff- und schwefelhaltige Verbindungen ersetzt – eine Entwicklung, die durch toxikologische Erkenntnisse aus dem Einsatz von Senfgas im Ersten Weltkrieg katalysiert wurde.^[8]

Parallel dazu etablierte sich die Strahlentherapie als weitere Säule der Tumorbehandlung. Bis in die 1960er-Jahre konnten durch Chemotherapie und Bestrahlung jedoch lediglich Heilungsraten von ca. 33% erzielt werden.^[7–9] Die Kombination beider Ansätze führte schließlich zur Entwicklung der bis heute eingesetzten kombinierten Chemotherapie.

Ein signifikanter Fortschritt erfolgte 1965 durch die Entdeckung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin durch B. ROSENBERG.^[10] Trotz seiner klinischen Relevanz sind Cisplatin-Therapien häufig mit schwerwiegenden Nebenwirkungen assoziiert, zudem wurden zahlreiche Resistenzen beschrieben.^[11–16] Dies unterstreicht die Notwendigkeit, moderne Therapieverfahren zu entwickeln, wie etwa Antikörpertherapien, Antihormontherapien, Immuntherapien und Stammzellbasierte Verfahren.^[17–24]

Ein Meilenstein in der modernen Onkologie war die Einführung der sogenannten zielgerichteten Therapieformen. Diese zielen auf spezifische molekulare Signalwege ab, die das Tumorwachstum kontrollieren. Einen wesentlichen Fortschritt markierte Anfang der 2000er-Jahre die Etablierung von Proteinkinaseinhibitoren.^[25,26] Diese Sub-

1. Einleitung

stanzen hemmen selektiv Kinasen, welche über Phosphorylierung die Signaltransduktion innerhalb der Zellproliferationskaskade vermitteln, und unterbrechen dadurch gezielt das unkontrollierte Zellwachstum.

Bereits in den 1970er-Jahren legten FISCHER und KREBS mit der Entdeckung der Rolle der Proteinkinasen den Grundstein für diese Therapierichtung – eine Leistung, die 1992 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt wurde.^[27–30]

Entsprechend der Zielstruktur lassen sich Proteinkinaseinhibitoren in Tyrosinkinaseinhibitoren, Serin-/Threoninkinaseinhibitoren sowie unspezifische Inhibitoren unterteilen.^[31,32] Einige klassische und moderne Vertreter dieser Wirkstoffklassen sind in Abbildung 2 dargestellt.^[33–40]

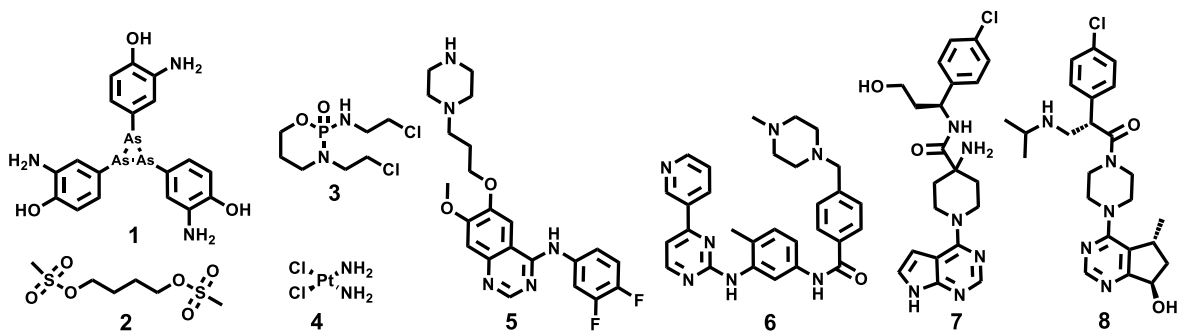
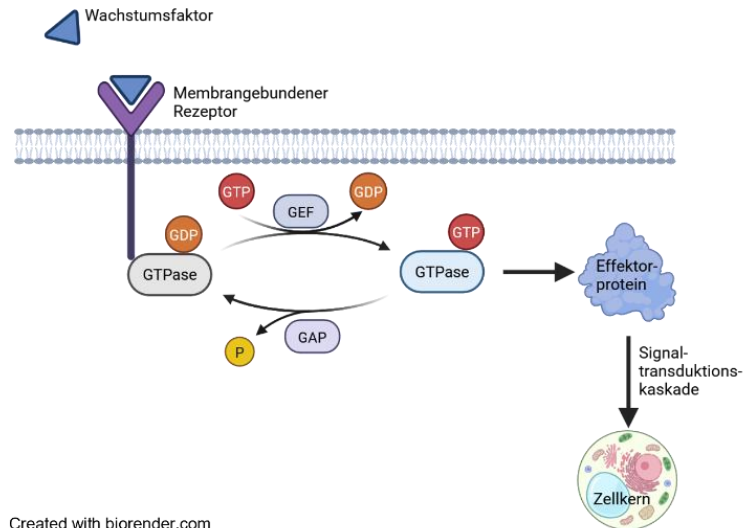


Abbildung 2: Strukturen einiger in der Geschichte der Krebstherapie eingesetzter Zytostatika: Arsphenamin (1), Busulfan (2), Ifosamid (3) und cis-Platin (4); sowie der Tyrosin-Kinaseinhibitoren Gefitinib (5), Imatinib (6) und den Serin/Threonin-Kinaseinhibitoren Capivasertib (7) und Ipatasertib (8).^[33–40]

Ein zukunftsweisender Ansatz in der zielgerichteten Therapie ist die Blockade von Proteinen am Anfang der Signaltransduktionskaskade. Ein prominentes Target stellt hierbei das GTP-bindende Protein Ras (Rat sarcoma) sowie dessen Effektorprotein SOS (Son of Sevenless) dar.^[41–44] Mutationen im Ras-Gen sind in der Mehrzahl aller humanen Tumoren nachweisbar und machen dieses Protein zu einem der vielversprechendsten, wenngleich schwer adressierbaren Targets der modernen Onkologie.^[45]

1.2 Aufbau und Funktion von Ras

Die intrazelluläre Weiterleitung externer Signale erfolgt typischerweise über transmembranäre Rezeptoren, die extrazelluläre Stimuli erkennen und diese über eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade an den Zellkern weitergeben (siehe Kap. 1.3).^[46] In vielen Fällen ist diese Signalweitergabe eng mit der Aktivität guanin-nukleotidbindender Proteine (G-Proteine) verknüpft, welche als molekulare Schalter zwischen inaktivem (GDP-gebundenem) und aktivem (GTP-gebundenem) Zustand fungieren (Schema 1).



Schema 1: Verallgemeinerte, schematische Darstellung einer Signaltransduktionskaskade vom membrangebundenen Rezeptor zum Zellkern.

G-Proteine lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen: heterotrimere G-Proteine („große G-Proteine“) sowie monomere GTPasen, auch als „kleine G-Proteine“ bezeichnet. Letztere umfassen insbesondere die Ras-Superfamilie, die mit über 100 Vertretern im Molekulargewicht von 20-40 kDa als eine der bestuntersuchten GTPase-Familien gilt.^[46–49] Diese Superfamilie untergliedert sich funktionell in fünf Unterfamilien: Ras, Rho, Rab, Ran und Arf, welche zentrale zelluläre Prozesse steuern – von der Regulation des Cytoskeletts (Rho), des Vesikeltransports (Rab, Arf) über den nukleozytoplasmatischen Transport (Ran) bis hin zur Genexpression (Ras). Die Aktivitätsregulation erfolgt über einen GDP/GTP-Austausch, der die Signalkette aktiviert bzw. deaktiviert.^[49,50]

Innerhalb der Ras-Familie existieren vier humane Isoformen: HRas, NRas, KRas4A und KRas4B. Diese zeigen eine Sequenzidentität von ca. 80% in ihrer G-Domäne (AS 1-165) und unterscheiden sich maßgeblich in der hypervariablen Region (HVR, AS 165-188/189), die für die Membranverankerung entscheidend ist (Abb. 3b).^[51–53]

Die Hypervariable Region (HVR) am C-Terminus der Ras-GTPasen spielt eine zentrale Rolle für deren Verankerung an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran – ein essenzieller Schritt für die funktionelle Signalweiterleitung. Die Verankerung erfolgt über die CAAX-Box (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: Serin oder Methionin) und wird durch zwei sequenzielle Signalsequenzen vermittelt.^[54,55]

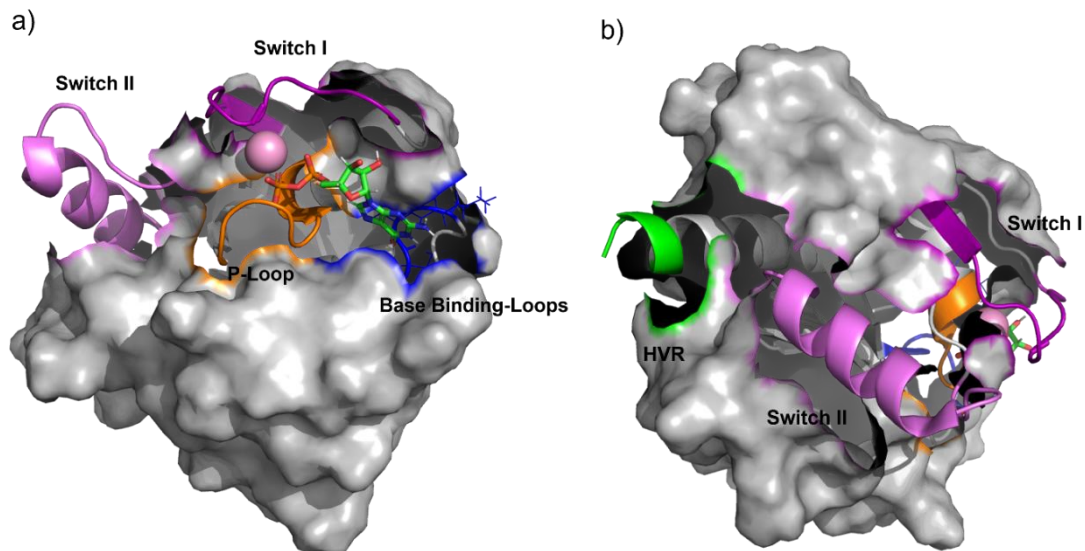


Abbildung 3: a) Die sogenannte G-Domäne von Ras (AS 1-165) mit den im GDP/GTP-Austausch aktiven Regionen der Switch I (lila, AS 30-38) und Switch II Tasche (violett, AS 60-76) sowie dem P-Loop (orange, AS 10-17) und den beiden Basebinding-Loops (blau, AS 116-120 und 145-147). In pink ist zudem das Mg-Kation sowie das daran koordinierte GDP mit grünen C-Atomen dargestellt. b) In grün ist die C-terminale Hypervariable Region (HVR, AS 165-188/189) abgebildet, welche zudem die CAAX-Box beinhaltet. (PDB: 4OBE).^[56]

Zunächst wird die CAAX-Box farnesyliert, gefolgt von einer proteolytischen Abspaltung des -AAX-Motivs und einer anschließenden Carboxylmethylierung des verbleibenden Cysteinrests. Diese Modifikationen werden an der zytoplasmatischen Membranseite des endoplasmatischen Retikulums (ER) vollzogen.^[54,57]

Eine zweite Membranadressierung erfolgt isoformspezifisch: Bei HRas durch Palmitoylierung zweier Cysteinreste (Cys^{181&184}), bei NRas und KRas4A durch einfache Palmitoylierung von Cys¹⁸¹, bei KRas4B hingegen durch eine polybasische Domäne mit sechs Lysinresten (Lys¹⁷⁵⁻¹⁸⁰).^[54,57-60] Diese posttranslationalen Modifikationen sichern die membranassoziierte Lokalisierung und sind somit essenziell für die biologische Funktion der Ras-Proteine.

Die Guanin-Nukleotid-Bindestelle der Ras-GTPasen umfasst mehrere konservierte Struktur motive: Zwei sogenannte *Base Binding-Loops* (AS 116-120 und 145-147) den Phosphate-binding loop (P-Loop, AS 10-17), der ein β -Faltblatt mit einer α -Helix verbindet und durch einen hohen Glycingehalt (Gly10-Ser17) charakterisiert ist (Abb. 3a und 4a).^[61-63]

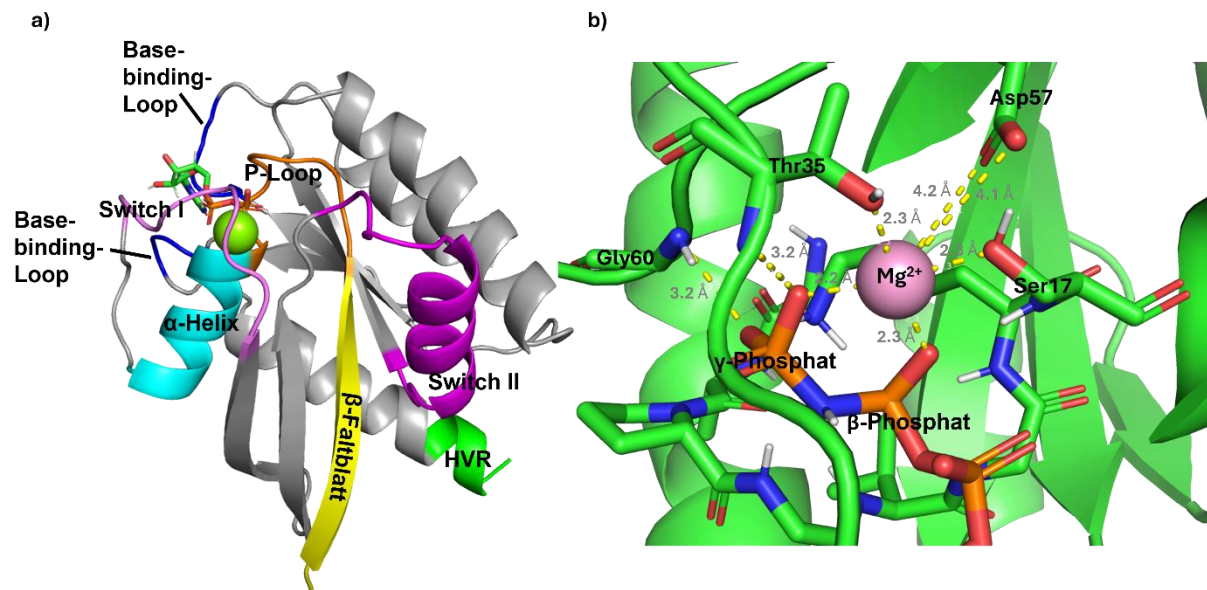


Abbildung 4: a) Ribbon-Modell von KRas mit den farblich markierten wichtigsten Proteinbereichen. b) Ausschnitt des Ras-Proteins mit den Wechselwirkungen mit den in gelb dargestellten Wechselwirkungen des Mg²⁺-Kations mit den Aminosäuren der Switch I und II Regionen sowie des P-Loops und dem β- und γ-Phosphat.

Der P-Loop ist zentral für die Bindung des Phosphatrückgrats von GDP und GTP und nimmt eine Schlüsselrolle in der Hydrolyse von GTP zu GDP ein. Dabei koordinieren der P-Loop sowie ein Mg²⁺-Ion das β- und γ-Phosphat. Das Mg²⁺-Ion vermittelt zusätzlich stabile Interaktionen mit Ser¹⁷, Thr³⁵ und Asp⁵⁷ (Abb. 4b).^[64,65]

Durch Rotation des nicht direkt koordinierten α-Phosphats können die Phosphatgruppen des Nukleotids konformationelle Spannungen aufbauen, die in einer Repulsion zwischen den Phosphatgruppen, einer Schwächung der Bindung zwischen β- und γ-Phosphat und schließlich der Hydrolyse resultieren.^[66]

Die durch die Nukleotidbindung induzierten konformationellen Umschaltungen betreffen insbesondere die beiden dynamischen Bereiche der Switch I (Asp³⁰-Asp³⁸) und der Switch II (Gly⁶⁰-Glu⁷⁶) Region. Im GTP-gebundenen Zustand werden zwei stabile Wasserstoffbrücken zwischen dem γ-Phosphat und den Hauptketten-NH-Gruppen von Thr³⁵ (Switch I) und Gly⁶⁰ (Switch II) ausgebildet. Darüber hinaus koordiniert Thr³⁵ zusätzlich das Mg²⁺-Ion über seine Seitenkette (Abb. 4b und 5b).

Diese Spannungszustände innerhalb der Switch-Regionen wirken als molekularer Federmechanismus: Mit der Hydrolyse des γ-Phosphats und dessen Freisetzung entspannen sich die Switch-Strukturen, und Ras nimmt eine GDP-spezifische Konformation ein (Abb. 5). Der GDP/GTP-Austausch erfolgt nicht spontan, sondern wird durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Ein prominentes Beispiel ist das Protein SOS1 (Son of Sevenless). Dieses interagiert mit Ras über die Switch-

1. Einleitung

Regionen und induziert eine strukturelle Reorganisation, die den GDP-Austritt begünstigt und die GTP-Bindung ermöglicht. [67–71]

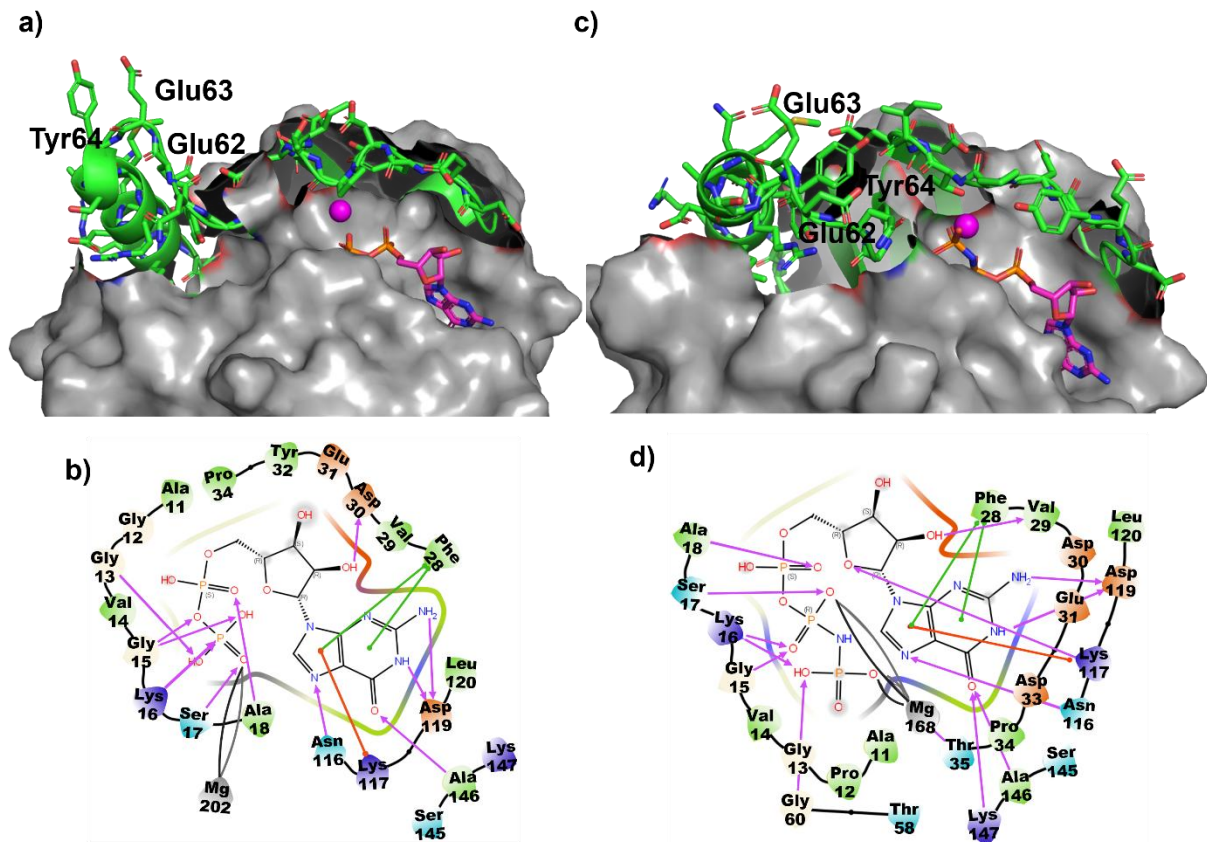


Abbildung 5: a) GDP (lila) in der Guanin-Nukleotid-Bindestelle von Ras, eingerahmt von der Switch I und II Region (grüne Kohlenstoffatome). b) Wechselwirkungen von Ras die an der Bindung von GDP beteiligt sind. Insbesondere die Wechselwirkungen der Aminosäurereste Phe²⁸, Lys¹¹⁷, Asp¹¹⁹ und Ala¹⁴⁶ zum Guanin-Rest sowie der Reste Gly¹³, Gly¹⁵, Lys¹⁶ und Ser¹⁷ mit dem β -Phosphat sind für die hohe Bindungsaffinität von GDP verantwortlich.^[72] Auffällig ist hierbei, dass die Switch II Region nicht an der Bindung von GDP beteiligt ist. (PDB: 4OBE) c) Das GTP-Analog GNP (lila) in der Guanin-Bindestelle mit der Switch I und II Region: Gut erkennbar ist die Konformationsänderung insbesondere der Switch II Region (deutlich zusehen anhand der Aminosäure Glu⁶²-Tyr⁶⁴), welche in Richtung der Guanin-Nukleotid-Bindestelle umgeklappt ist. Zudem ist das Tyrosin 32 der Switch I Region ebenfalls in die Bindestelle reingeklappt. d) Wechselwirkungen der Switch I Region mit GNP sowie der Aminosäurereste Thr³⁵ und Gly⁶⁰ mit dem γ -Phosphat. (PDB: 821P).

HALL ET AL. zeigten, dass die Switch II Region maßgeblich an der Bindung von Ras an SOS1 beteiligt ist. Die Seitenketten dieser Region koordinieren eng mit der Oberfläche von SOS1 und führen zu stabilen Protein-Protein-Interaktionen. Die Switch I Region trägt hingegen nur geringfügig zur Komplexbildung bei, jedoch interagieren Tyr³² und Tyr⁴⁰ direkt mit der SOS-Oberfläche und lösen eine konformationelle Verzerrung der Nukleotidbindetasche aus. Diese durch SOS1 induzierte Umlagerung ermöglicht letztlich den Austausch von GDP zu GTP und somit die Aktivierung von Ras.^[67–71]

1.3 GDP/GTP-Austausch im Ras-SOS-Komplex

Die Aktivierung des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors SOS (Son of Sevenless) stellt einen entscheidenden Schritt in der Kontrolle der Ras-GTPase-Signalkaskade dar. Dabei muss SOS selbst zunächst in einen aktiven Zustand überführt werden, bevor es Ras katalytisch aktivieren kann.^[73,74]

Durch die Stimulation membranständiger Rezeptoren, wie z. B. Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), erfolgt die Rekrutierung des cytosolischen, inaktiven SOS an die Plasmamembran. Die dort lokalisierte Aktivierung von SOS wird durch Bindung eines GTP-beladenen Ras-Proteins (Ras^{allo}) an der allosterische Bindestelle ausgelöst, die sich an der Grenzfläche zwischen der CDC25-Domäne und der Ras exchanger motif (Rem)-Domäne des katalytischen SOS-Kerns befindet (Abb. 6).^[75,76]

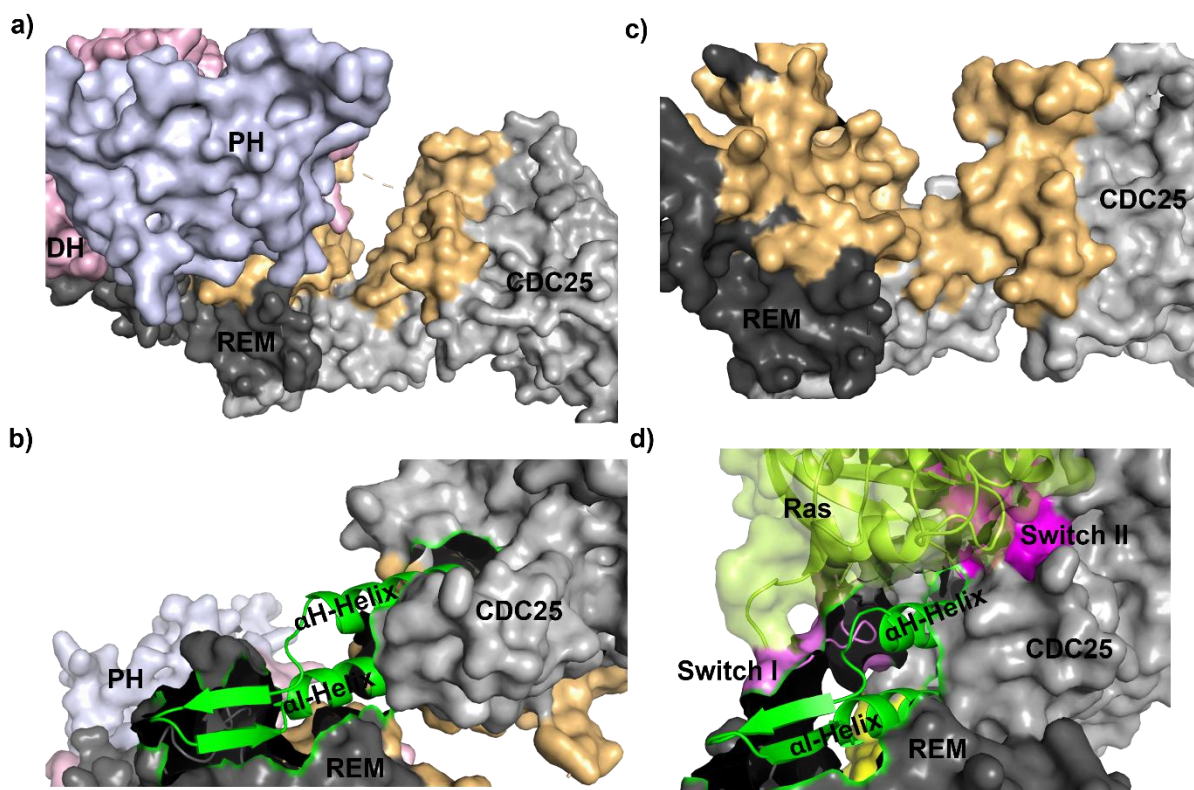


Abbildung 6: a) Autoinhibierter Zustand von SOS. Hellblau: PH-Domäne; rosa: DH-Domäne; schwarz: Rem-Domäne; grau: CDC25-Domäne; ockerfarben: Bindestelle des allosterischen Ras. (PDB: 1XD4). b) Räumlich geöffnete Bindestelle des allosterischen Ras-Proteins an SOS im aktiven Zustand (PDB: 1XD2). c) Lage des helikalen Hairpins (grün) im autoinhibierten Zustand von SOS. d) Lage des helikalen Hairpins (grün) im aktiven Ras^{kat} -gebundenem Zustand. Limetengrün (transparent): Ras^{kat} ; magenta: Switch I; violett: Switch II.

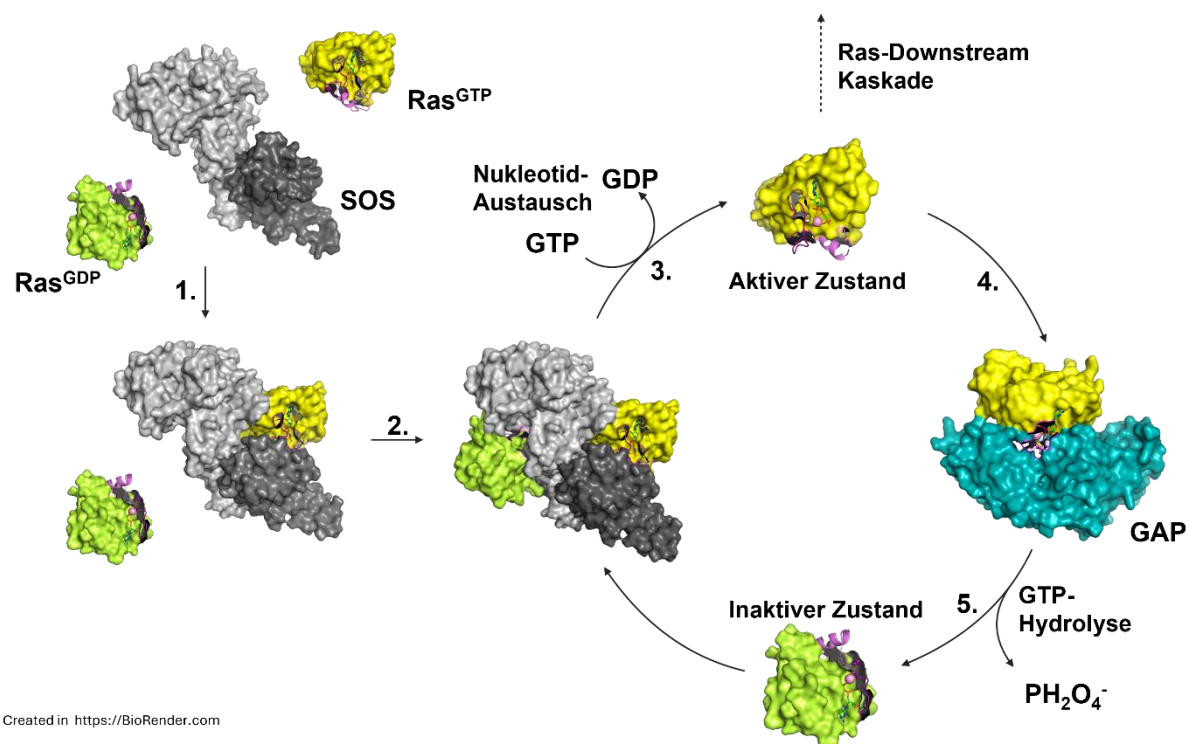
Die Bindung von Ras^{allo} fungiert dabei als molekulares Brückenelement, welches eine Konformationsverknüpfung der CDC25- und Rem-Domänen bewirkt. Bemerkenswert ist dabei die ausgeprägte Nukleotidselektivität dieser Interaktion: Während Ras^{GTP}

1. Einleitung

eine hohe Affinität zur allosterischen Bindestelle besitzt, zeigt Ras^{GDP} eine etwa zehnfach geringere Affinität.^[77–79] Dieser Unterschied führt in Gegenwart von Ras^{GTP} zu einem raschen Austausch des GDP-beladenen Ras an der allosterischen Stelle gegen die GTP-beladene Form.

Die Simultanbindung von Ras^{allo} an die CDC25- und Rem-Domäne induziert eine strukturelle Umlagerung auf der gegenüberliegenden Seite der CDC25-Domäne. Diese führt zur Öffnung der katalytischen Bindetasche, was die Voraussetzung für den GDP-Austausch an Ras darstellt (Schema 2, Schritt 1).^[73,80]

SOS unterliegt einer autoinhibitorischen Regulation, die durch die N-terminale Histone-Fold-, DH- (Dbl-Homology) und PH- (Pleckstrin-Homology)-Domänen vermittelt wird. Diese Domänen blockieren im inaktiven Zustand sterisch die allosterische Bindestelle (Abb. 6a). Erst durch die Interaktion mit anionischen, membranassoziierten Lipiden wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) wird diese Blockade aufgehoben und RasGTP kann die allosterische Bindung eingehen (Abb. 6b).^[75,79,81,82]



Schema 2: Schematische Darstellung der Ras-SOS Interaktion und des GDP-GTP-Austausches. Mit einer gelb eingefärbten Oberfläche ist das GTP-gebundene Ras gezeigt, das GDP-gebundene Ras hat eine gelb-grüne Oberfläche. In grau ist das Effektorprotein SOS gezeigt, wobei dort in hellgrau die CDC25- und in dunkelgrau die Rem-Domäne gezeigt sind. In türkis ist zudem das GTPase-activating Protein dargestellt. (PDB: 7KFZ (KRas:SOS-Komplex), 5OVD (SOS), 5UK9 (KRas^{GDP} und KRas^{GTP}), 1WQ1 (HRas-GAP-Komplex)).^[44,83–85]

Eine weitere strukturelle Umlagerung betrifft den sogenannten helikalen Hairpin, bestehend aus den Helices α H und α I der CDC25-Domäne.^[86] Im autoinhibierten Zustand liegt dieser Hairpin in einer blockierender Konformation vor (Abb. 6c), während er im aktiven Zustand in die Spalte zwischen Switch I und Switch II des an der katalytischen Bindetasche gebundenen Ras^{GDP} eindringt (Abb. 6c und d), (Schema 2, Schritt 2).^[73,87]

Diese Insertion destabilisiert die GDP-Bindung und ermöglicht das Einsetzen eines neuen Nukleotids. Aufgrund der etwa 10- bis 50-fach höheren zytosolischen Konzentration von GTP gegenüber GDP wird in den meisten Fällen GTP eingebaut, wodurch Ras in den aktiven Zustand überführt wird.^[87,88] Dennoch bleibt ein geringer Anteil von Ras inaktiv, wenn erneut GDP eingebaut wird. Nur das GTP-gebundene Ras vermag Downstream-Effektoren zu rekrutieren und die Signaltransduktion fortzusetzen (Schema 2, Schritt 3).^[89]

Der zweite Regulationsmechanismus der Ras-Aktivität ist die Rückführung des aktivierten Ras^{GTP} in den inaktiven Ras^{GDP}-Zustand durch GTP-Hydrolyse. Diese Reaktion ist stark abhängig von der Funktion sogenannter GTPase-activating Proteins (GAPs), welche mit Ras einen transienten Komplex bilden (Schema 2, Schritt 4).^[84]

Anders als klassische Katalysatoren wirken GAPs als aktive Reaktionsteilnehmer. Der „Argininfinger“ (Arg⁷⁸⁹) des GAPs neutralisiert die negativen Ladungen des Übergangszustands.^[90–92] Zusätzlich stabilisiert das GAP die Switch II Region von Ras, was die präzise Ausrichtung von Gln⁶¹ und Gly¹² ermöglicht – zwei Aminosäuren, die für die GTP-Hydrolyse wesentlich sind. Mutationen an diesen Positionen führen häufig zur Konstitutionellen Aktivierung von Ras und sind mit tumorigenen Prozessen assoziiert. Darüber hinaus vermittelt der Argininfinger die Koordination eines reaktiven Wassermoleküls, das als Nukleophil die γ - β -Phosphoanhydridbindung angreift und zur Freisetzung eines Phosphat-Anions führt (Schema 2, Schritt 5).^[84,88,90–93] Das resultierende GDP-gebundene Ras kann erneut an den aktivierten SOS-Komplex binden, wodurch der GDP/GTP-Austauschzyklus erneut initiiert wird.

1.4 Ras Signaltransduktionswege Erk und Akt

Die kleine GTPase Ras fungiert als molekularer Schalter in zentralen zellulären Signaltransduktionswegen. Im GTP-beladenen aktiven Zustand interagiert Ras mit nachgeschalteten Effektorproteinen, wie z. B. der Serin/Threonin-Kinase Raf, und initiiert

dadurch komplexe phosphorylierungsbasierte Signalkaskaden, die unter anderem Zellproliferation, Differenzierung, Überleben und Metabolismus regulieren.^[94–97]

Punktmutationen in Ras, wie sie häufig bei onkogenen Prozessen beobachtet werden, führen dazu, dass Ras dauerhaft im GTP-gebundenen Zustand verweilt. In der Folge wird der Zelle kontinuierlich ein proliferatives Signal vermittelt – unabhängig von extrazellulären Stimuli – und es kommt zu einem unkontrolliertem Zellwachstum.^[94–97]

Ras ist in mindestens fünf separaten Signaltransduktionswegen funktionell eingebunden, von denen der Ras/Raf/MAPK/Erk- und der Ras/PI3K/PDK1/Akt-Weg am besten charakterisiert sind (Abb. 7).^[94,95]

Die MAPK-Kaskade ist die erste vollständig aufgeklärte Transduktionsroute, bei der die Phosphorylierung von der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) bis zum nukleären Transkriptionsfaktor nachgewiesen wurde.^[98] Nach der Ligandenbindung, z. B. von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), wird die RTK durch Autophosphorylierung aktiviert.^[99,100]

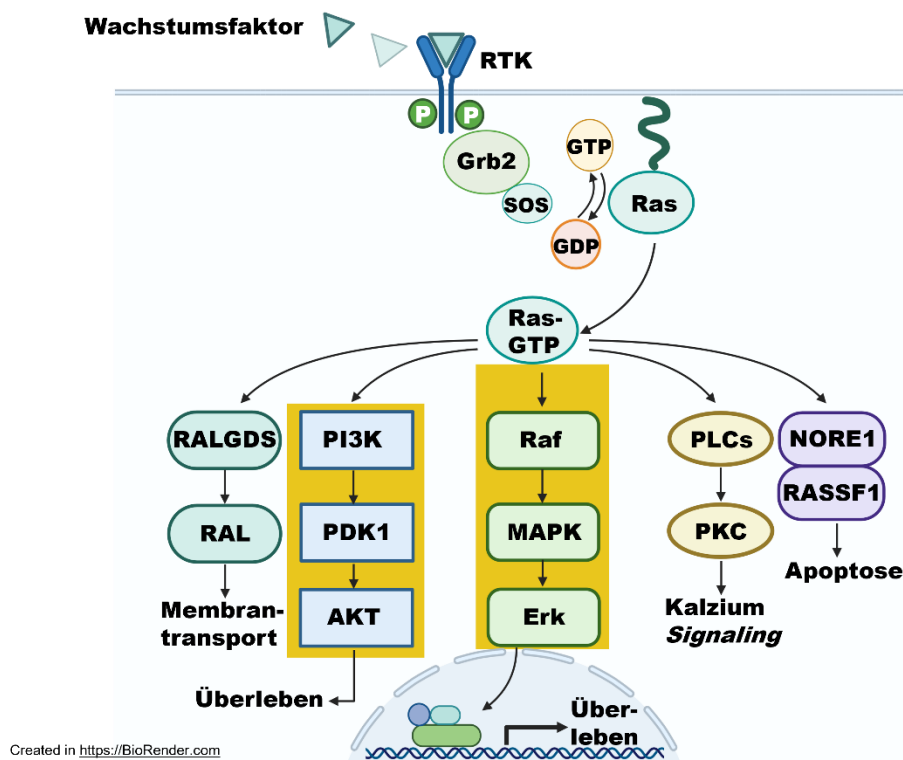


Abbildung 7: Ras-Signaltransduktionswege: In gelb hervorgehoben sind die Ras/Raf/MAPK/Erk- und die Ras/PI3K/PDK1/Akt-Phosphorylierungskaskade, die in dieser Arbeit näher betrachtet werden.^[94,95]

Die Signalweiterleitung erfolgt über Adapterproteine wie Grb2, das über SH2- und SH3-Domänen sowohl mit der RTK als auch mit dem GEF SOS1 interagiert.^[101–105] In

der Folge wird Ras aktiviert, das wiederum an die Ras-Bindedomäne von Raf bindet. Die vollständige Aktivierung von Raf erfolgt u. a. durch Phosphorylierung der Tyrosinreste Tyr³⁴⁰ und Tyr³⁴¹, wobei auch tyrosinunabhängige Mechanismen eine Rolle spielen.^[98,106,107]

Raf katalysiert im nächsten Schritt die Phosphorylierung und Aktivierung von MEK1, das seinerseits sowohl Threonin- als auch Tyrosinreste in Erk1 phosphoryliert.^[108–111] Das aktivierte Erk1 verlagert sich in den Zellkern und reguliert dort durch Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsfaktoren die Expression proliferations- und differenzierungsrelevanter Gene (Abb. 7 und 8).^[112,113]

Parallel zur MAPK-Kaskade wird durch Ras auch der PI3K/PDK1/Akt-Weg aktiviert – ein essenzieller Regulator zellulären Überlebens, des Wachstums sowie des Metabolismus.^[114,115] Nach Aktivierung der RTKs bindet die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) über Adapterproteine wie IRS an die phosphorylierten Rezeptoren (Abb. 8).^[116,117]

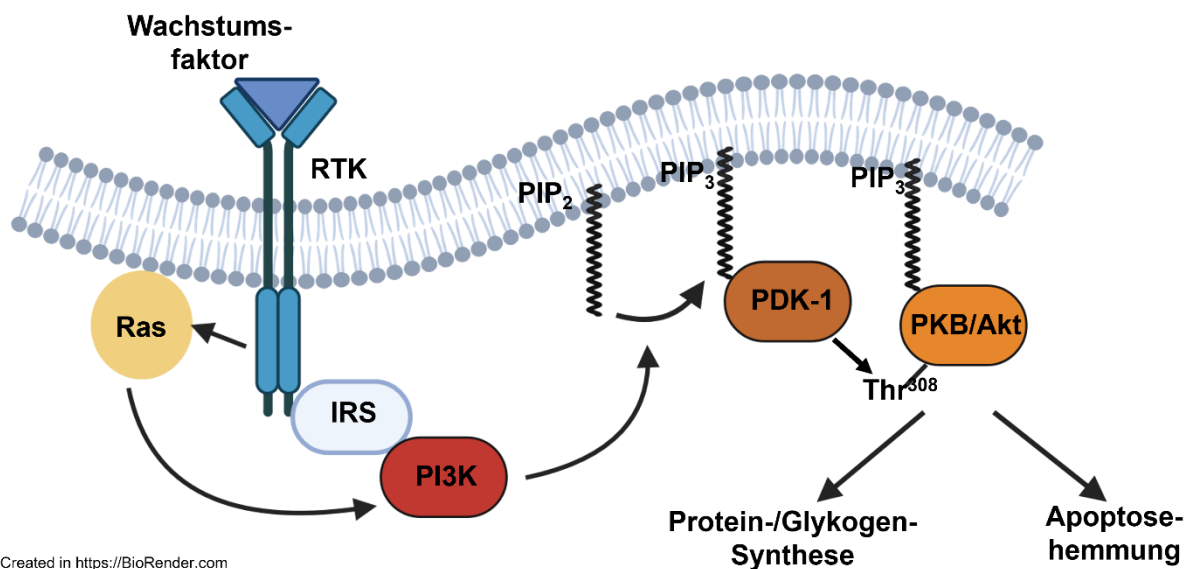


Abbildung 8: Graphische Darstellung der detaillierten Ras/PI3K/PDK1/Akt-Signaltransduktionskaskade.

Die katalytische Aktivität von PI3K führt zur Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃, wodurch membrannaehe Signalkomplexe entstehen. PIP₃ dient als Rekrutierungsplattform für PDK1 (PIP₃-dependent kinase-1) und Akt (Protein Kinase B), die über ihre PH-Domänen an die Membran binden. PDK1 phosphoryliert Akt an Thr³⁰⁸ im *Activation Loop*.^[117] Die dadurch aktivierte Kinase Akt fördert das Zellüberleben (z. B. durch Hemmung der Apoptose) und stimuliert anabole Prozesse wie Proteinsynthese oder Glykogenbildung, jeweils abhängig vom zellulären Kontext. (Abb. 8).^[116–118]

1.5 Aktuelle Inhibitoren der Ras-SOS-Interaktion

Die Ursprünge der Ras-Forschung reichen bis in die 1960er Jahre zurück, als das HRas-Onkogen (Harvey Rat Sarcoma Virus) erstmals beschrieben wurde.^[119–121] Seit-her ist das Verständnis der tumorbiologischen Relevanz von Ras-Mutationen stetig gewachsen. Heute gilt Ras als einer der am häufigsten mutierten Onkogene im huma-nen Tumorgeschehen. Etwa 20% aller malignen Erkrankungen weisen Punktmutatio-nen im Ras-Gen auf. Besonders hohe Mutationsfrequenzen finden sich in Pankreas-karzinomen (~90%), kolorektalen Tumoren (~50%) sowie im nicht-kleinzelligen Lun-genkarzinom (~30%).^[122–124]

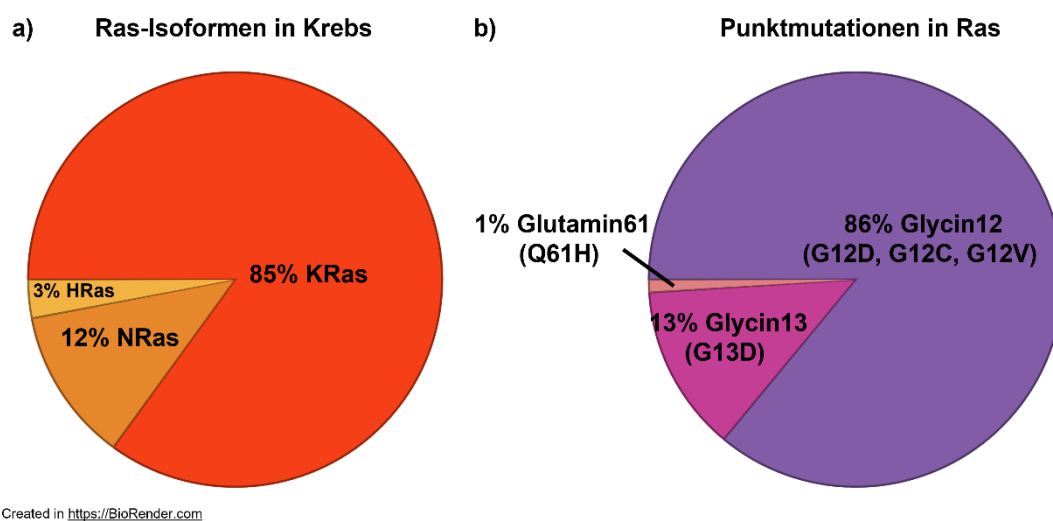


Abbildung 9: a) Verteilung der in menschlichem Krebs mutierten Ras-Isoformen. Die mit Abstand meisten Mutationen liegen dabei auf der KRas-Isoform (4A und B), gefolgt von NRas. Am seltensten sind Mutationen in HRas. b) Verteilung der bei Krebserkrankungen auftretenden Punktmutationen in Ras. Am häufigsten sind Mutationen von Glycin12, die sich auf die Varianten G12D, G12C und G12V verteilen. Mutationen von Glycin13 kommen deutlich weniger vor, während eine Mutation von Glutamin61 mit 1% sehr selten auftritt.^[125–127]

Innerhalb der drei Hauptisoformen KRas, NRas und HRas treten Mutationen mit deutlich unterschiedlicher Häufigkeit auf. Die überwiegende Mehrheit aller Ras-Mutationen entfällt auf KRas (4A und 4B), gefolgt von NRas, während Mutationen in HRas vergleichsweise selten sind (Abb. 9a).^[125–127] Die mutationalen Hotspots befinden sich bevorzugt an den Positionen Gly12, Gly13 und Gln61. Insbesondere Substitutionen von Gly12 – zu Asp (G12D), Cys (G12C) oder Val (G12V) – dominieren das Mutations-spektrum (Abb. 9b).^[125]

Die funktionelle Relevanz dieser Mutationen ergibt sich aus ihrer Lokalisation an kata-lytisch entscheidenden Aminosäuren, die maßgeblich an der Hydrolyse von GTP zu

GDP beteiligt sind. Ein Verlust der GTPase-Aktivität führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Ras – ein Mechanismus, der in zahlreichen Tumorentitäten zur unkontrollierten Zellproliferation beiträgt.

Trotz der zentralen Rolle von Ras in der Onkogenese wurde das Protein über Jahrzehnte hinweg als „undruggable“ eingestuft.^[128] Diese Einschätzung resultierte aus mehreren strukturellen und biochemischen Eigenschaften: (i) dem Fehlen gut zugänglicher Bindetaschen an der Proteinoberfläche, (ii) der extrem hohen Affinität der Nukleotidbindestelle gegenüber GTP/GDP und (iii) der Tatsache, dass Ras in erster Linie über Protein-Protein-Interaktionen wirkt – ein Interaktionstyp, der sich mit kleinen Molekülen nur schwer stören lässt.^[128]

Aktuelle pharmakologische Strategien zur Ras-Inhibition lassen sich in zwei grundlegende Klassen unterteilen: direkte und indirekte Ras-Inhibitoren. Während direkte Inhibitoren auf die funktionelle Oberfläche oder Mutationsspezifität von Ras abzielen (z. B. K_{Ras}^{G12C}-Inhibitoren), verfolgen indirekte Ansätze das Ziel, die subzelluläre Lokalisierung und damit die membranassoziierte Aktivierung von Ras zu verhindern.^[129]

Ein zentraler Mechanismus der Ras-Adressierung an die Plasmamembran ist die posttranslationale Modifikation an der C-terminalen CAAX-Box, bei der ein Farnesylrest kovalent an das Cystein angehängt wird.^[130] Dieser Prozess erfolgt enzymatisch durch die Farnesyltransferase (FTase), das Ras-converting enzyme 1 (Rce1) sowie die Isoprenylcysteinocarboxylmethyltransferase (Icmt). Die korrekte Anheftung und Lokalisierung von Ras hängt zudem von Chaperon-Proteinen wie Phosphodiesterase 6δ (PDE6δ) ab.^[131–134]

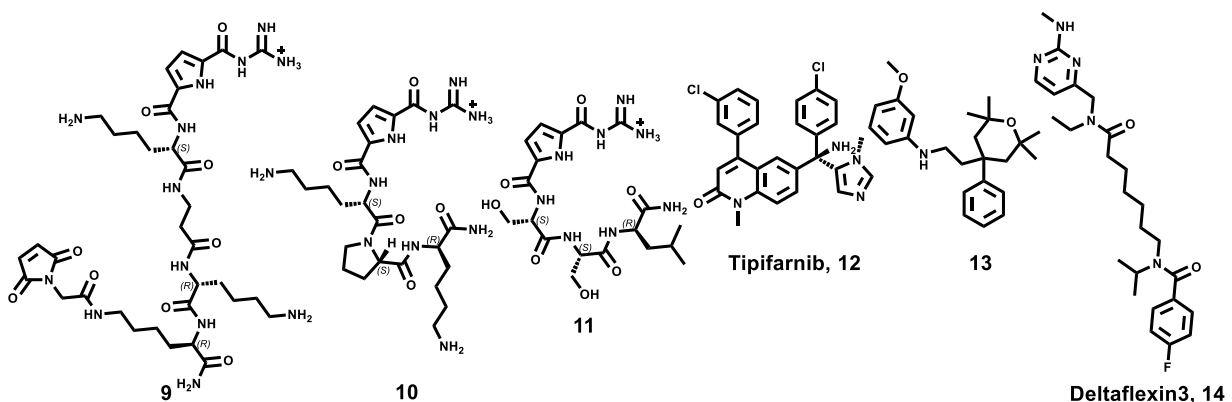


Abbildung 10: Strukturen ausgewählter CAAX-Box Rezeptoren aus der AG SCHERKENBECK (9-11) sowie dem Farnesyltransferaseinhibitor Tipifarnip (12), dem Icmt-Inhibitor 13 und dem PDE6δ-Inhibitor Deltaflexin3 (14).^[57,60,131,133,135]

Inhibitoren gegen FTase, Icmt oder PDE6 δ stellen daher einen wichtigen pharmakologischen Ansatz zur indirekten Hemmung der Ras-Aktivität dar, insbesondere in Tumoren mit Mutationen, die sich nicht durch direkt bindende Substanzen adressieren lassen (Abb. 10).

Die direkte Inhibition von Ras zielt darauf ab, entweder die Interaktion von Ras mit seinem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) SOS1 oder die Bindung an nachgeschaltete Effektorproteine zu blockieren. Ein vielversprechender Ansatz innerhalb dieses Forschungsfeldes ist die Entwicklung sogenannter pan-Ras-Inhibitoren, die alle drei Ras-Isoformen (H-, N- und KRas) unabhängig vom jeweiligen Mutationsstatus adressieren.^[136] Dieses Konzept verfolgt zwei zentrale Ziele: (i) die Erweiterung der therapeutischen Reichweite auf eine größere Patientengruppe sowie (ii) die Minimierung resistenzbedingter Therapieversager infolge selektiver Targeting-Strategien.

Die Grundlage für diesen Ansatz wurde 2017 durch STOCKWELL ET AL. gelegt, die mittels computergestützter Strukturmodellierung drei potenzielle, benachbarte Bindetaschen auf der Oberfläche von Ras identifizierten.^[137] Aufbauend auf dieser Strukturinformation wurden *in silico*-Screenings umfangreicher Substanzbibliotheken durchgeführt, aus denen mehrere Verbindungen mit vielversprechendem Bindungspotenzial hervorgingen. Diese Hits wurden im Hinblick auf orale Bioverfügbarkeit und niedriges Molekulargewicht selektiert und anschließend chemisch synthetisiert (Abb. 11).^[137]

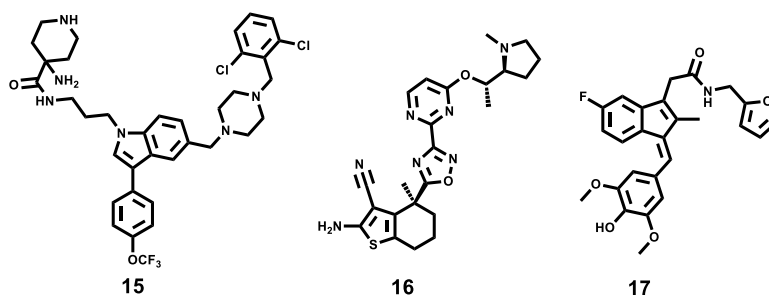


Abbildung 11: Strukturen ausgewählter hochpotenter pan-Ras-Inhibitoren wie den Substanzen BI-2865 (**16**) und ADT-007 (**17**).^[137–139]

Unter den getesteten Molekülen zeigte insbesondere Verbindung **15** eine hohe Aktivität gegenüber KRas^{G12D} (Abb. 11). Isotherme Titrationskalorimetrie ergab eine Dissoziationskonstante (K_D) von 17.8 μ M, während MST-Messungen eine Bindungsaffinität von $K_D = 9 \mu$ M bestätigten.^[137] Funktionell konnte gezeigt werden, dass Verbindung **15** in der Lage ist, das Wachstum von DLD-1-Zellen – einem Zellmodell mit Mutationen in allen drei Ras-Isoformen – signifikant zu unterdrücken. Parallel dazu wurde eine Inhibition sowohl des Erk- als auch des Akt-Signalwegs nachgewiesen. Darüber hinaus

1. Einleitung

zeigte Verbindung **15** eine gute Aktivität in primären Maus-Embryofibroblasten (MEFs) mit einem IC₅₀-Wert von 3.8 µM.^[137]

Ein weiterer Fortschritt gelang 2023 durch KIM ET AL. mit der Entwicklung von BI-2865 (**16**) – dem ersten nicht-kovalent bindenden pan-KRas-Inhibitor. Diese Substanz weist eine Bindungsaffinität von $K_D = 10\text{--}40$ nM für KRas auf, jedoch ohne signifikante Wirkung auf die Isoformen NRas oder HRas. Damit stellt BI-2865 (**16**) einen wichtigen Prototyp für die selektive, nicht-kovalente Inhibition mutierter KRas-Proteine dar (Abb. 11).^[138]

Im Oktober 2024 berichtete die Arbeitsgruppe um Gary A. Piazza über die Entwicklung des pan-Ras-Inhibitors ADT-007 (**17**) (Abb. 11), einem Molekül mit der Fähigkeit, nukleotidfreies Ras selektiv zu binden. Durch Stabilisierung dieses Zwischenzustands wird die GTP-Beladung sowie die nachgeschaltete Signalweiterleitung über den MAPK- und Akt-Weg unterbunden – ein innovativer Ansatz mit breiter therapeutischer Reichweite.^[139]

		Pre-clinical	IND-enabling	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Zulassung
KRas ^{G12C} (inaktiv)	Sotorasib/AMG510 (Amgen)						
	Adagrasib/MRTX849 (Mirati)						
	Divarasib/GDC-6036 (Roche)						
	Opnurasib/JDQ443 (Novartis)						
	GFH925 (GenFleet)						
	YL-15293 (Shanghai Yingli)						
	JAB-21822 (Jacobio)						
	D-1553 (InventisBio)						
	HS-10370 (Jiangsu Hansoh)						
	BI-1823911 (Boehr. Ingelheim)						
	LY3537982 (Lilly)						
	GEC255 (GenEros Biopharma)						
	HBI-2438 (Huyabio)						
	BPI0421286 (Belta)						
	MK-1084 (Merck)						
	Sy-5933 (Shouyao Holdings)						
	GH35 (Suzhou Genhouse Bio)						
	D3S-001 (D3 Bio)						
KRas ^{G12C} (aktiv)	RMC-6291 (Rev. Medicines)						
	FMC-376 (Frontier Medicines)						
	BBO-8520 (BridgeBio)						
KRas ^{G12D}	MRTX1133 (Mirati)						
	HRS-4642 (Jiangsu Hengrui)						
	RMC-9805 (Rev. Medicines)						
	INCB161731 (Incyte)						
	ASP3082 (Astellas) <i>degrader</i>						
	QTX3046 (Quanta Therapeutics)						
	VRTX153 (Vrise Therapeutics)						
	LY3962673 (Lilly)						
	JAB-22000 (Jacobio)						
	ERAS-4 (Erasca)						
Other KRas	RMC-5127 G12V (Rev. Medicines)						
	RMC-0708 Q61H (Rev. Medicines)						
	RMC-8839 G13C (Rev. Medicines)						
Multi (Mut/WT) KRas	BI-3706674 (Boehr. Ingelheim)						
	QTX3034 (Quanta Therapeutics) ^{a)}						
	QTX3544 (Quanta Therapeutics) ^{b)}						
	VRTX180 (Vrise Therapeutics)						
	LY406634 (Lilly)						
	FMC-376 (Frontier Medicines)						
	BBO-8520 (BridgeBio)						
Ras	RMC-6236 (Rev. Medicines)						

Abbildung 12: Mutanten-spezifische und Multi-(K)Ras Inhibitoren, die sich in klinischen Studien befinden. Die meisten Inhibitoren befinden sich maximal in Phase 1 Studien (dunkel orange-gelb). Lediglich eine größere Anzahl an G12C-Inhibitoren sowie der G12D-Inhibitor MRTX-1133 (**29**) befinden sich in Phase 2 oder höher (grün). Davon haben bisher nur die G12C-Inhibitoren von Amgen und Mirati eine klinische Zulassung erhalten. IND: Investigational New Drug application. a) Beschrieben als Multi-KRas-Inhibitor mit einer Präferenz für G12D-Aktivität und deshalb nur in Studien mit G12D-Patienten eingesetzt. b) Beschrieben als Multi-KRas-Inhibitor mit einer Präferenz für G12V-Aktivität.^[140]

Trotz dieser Fortschritte dominiert weiterhin das seit Jahrzehnten etablierte Forschungsfeld zur gezielten Inhibition einzelner Ras-Mutationen, insbesondere innerhalb der KRas-Isoform, die mit einem Anteil von ca. 85% aller Ras-assoziierten Tumoren als onkogen besonders relevant gilt.^[128] Der Schwerpunkt der Wirkstoffentwicklung liegt daher auf Inhibitoren, die spezifisch gegen punktmutierte Varianten von KRas, wie G12C, G12D oder G12V, gerichtet sind.

Den Grundstein für die gezielte Adressierung von KRas^{G12C} legte 2013 das Team um KEVAN SHOKAT, dem es erstmals gelang, einen kovalent-bindenden Inhibitor für diese Mutation zu entwickeln.^[128] Seither wurde eine Vielzahl an G12C-spezifischen Molekülen synthetisiert, von denen sich einige derzeit in unterschiedlichen Phasen klinischer Studien befinden (Abb. 12). Bislang haben lediglich zwei Vertreter, Sotorasib (**18**) von Amgen und Adagrasib (**19**) von Mirati, eine klinische Zulassung erhalten (Abb. 13).

Diese Substanzen wirken über Stabilisierung des GDP-gebundenen, inaktiven Zustands des mutierten Proteins.^[141–143] Sie adressieren die im inaktiven Konformationszustand zugängliche allosterische Switch II Pocket (S-II P) durch kovalente Bindung. Trotz dieses Erfolgs bleibt die Entwicklung effektiver Inhibitoren gegen andere Mutationen wie G12D oder G12V eine Herausforderung.^[143,144]

Mit Divarasib (**20**) befindet sich derzeit ein hochselektiver G12C-Inhibitor aus dem Hause Roche in Phase 3 der klinischen Entwicklung. Erste Daten zeigen eine signifikant gesteigerte Wirksamkeit bei gleichzeitig günstigem Toxizitätsprofil in KRas^{G12C}-positiven Tumoren.^[145]

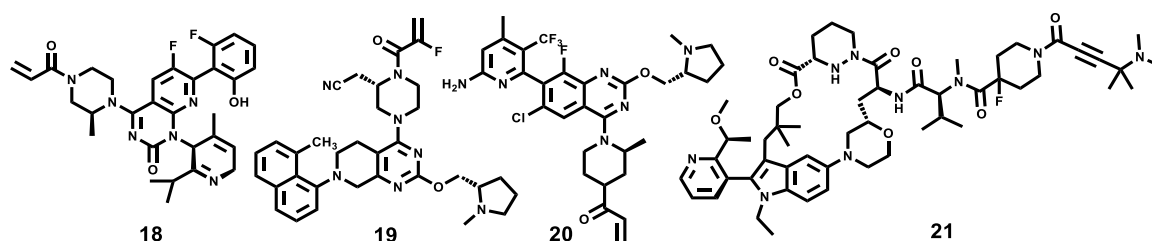


Abbildung 13: Strukturen ausgewählter Inhibitoren gegen die G12C-Mutante von KRas mit einer klinischen Zulassung (**18** & **19**) bzw. in Phase 3 befindlich (**20**). Außerdem eine Verbindung die als molecular glue aktives KRas^{G12C} inhibiert (**21**).

Einen grundlegend neuen Mechanismus verfolgt REVOLUTION MEDICINES mit dem Wirkstoff RMC-6291 (**21**) (Abb. 13). Dieses Molekül gehört zur Klasse der sogenannten *molecular glues*: Es vermittelt die kovalente Ausbildung eines Trimolekülkomplexes bestehend aus KRas^{G12C}, Cyclophilin A (CYPA) und dem Inhibitor selbst. Der Komplex

blockiert die Effektorbindestelle von KRas durch sterische Hinderung, wodurch eine Interaktion mit Effektoren wie Raf verhindert wird. Die elektrostatische Komplementarität von CYPA zur KRas-Oberfläche spielt hierbei eine entscheidende Rolle.^[146,147]

Die KRas^{G12D}-Mutation stellt mit einem Anteil von etwa 39% die häufigste Punktmutation in Ras-getriebenen Tumoren dar.^[148] Im Gegensatz zur G12C-Mutation, bei der eine kovalente Adressierung über die nukleophile Cystein-Seitenkette möglich ist, erweist sich die direkte Bindung an die weniger reaktive Aspartat-Seitenkette der G12D-Variante als deutlich herausfordernder

Einen ersten selektiven Inhibitor für KRas^{G12D} entwickelte 2017 die Arbeitsgruppe um KOTARO SAKAMOTO mit dem zyklischen Peptid KRpep-2d.^[149] Dieses Cyclopeptid enthält zwei Cysteinreste, die sowohl zur Ringbildung als auch zur Steuerung der Bindungsaffinität beitragen. Aufgrund der instabilen Disulfidbrücke unter reduzierenden, intrazellulären Bedingungen ist der therapeutische Einsatz jedoch limitiert.

Daraus hervorgehend wurde das bicyclische Peptid KS-58 (**22**) entwickelt, das eine nicht-proteinogene Aminosäure enthält und eine verbesserte Stabilität aufweist.^[150] In Zelllinien, die KRas^{G12D} exprimieren (A427, PANC-1), zeigte KS-58 (**22**) eine selektive Hemmung, die über zwei Mechanismen vermittelt wird: Die Blockade der Ras^{GDP}-SOS1-Interaktion sowie der Ras^{GTP}-BRAF-Bindung (Abb. 14).^[149–151]

Ein weiterer innovativer Ansatz wurde von Y. ZHOU ET AL. verfolgt: Der Inhibitor NKTP-3 bindet zunächst an den Zelloberflächenrezeptor NRP1, über den er in die Zelle internalisiert wird. Im Zytosol bildet NKTP-3 mit KRas^{G12D} einen inaktiven trimeren Komplex – ein Beispiel für einen *molecular glue*-Mechanismus.^[152]

Die Entdeckung der sogenannten Switch I/II Pocket im Jahr 2012 markierte einen entscheidenden Fortschritt in der Entwicklung von *small-molecule*-Inhibitoren für Ras.^[153] Diese flache, zwischen den beiden Switch-Regionen gelegene Tasche diente als Ansatzpunkt für eine Reihe rational designter Verbindungen.

Der Arbeitsgruppe um STEPHEN W. FESIK entwickelte Moleküle, die sich durch unterschiedliche Aminosäurebausteine an einer Position unterschieden und K_D -Werte im Bereich von 190-420 μ M sowie eine Hemmung des GDP/GTP-Austauschs von bis zu 78% erzielten.^[153] Mit Verbindung **23** gelang erstmals die Kristallstruktur eines Inhibitors in der Switch I/II-Tasche (PDB: 4EPY).^[153,154]

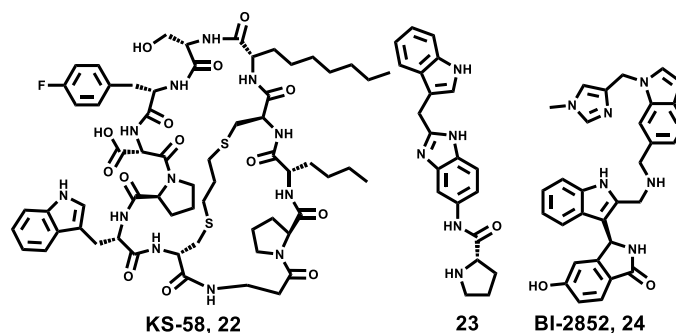


Abbildung 14: Strukturen des bicyclopeptidischen Inhibitors KS-58 (**22**) sowie der beiden von FESIK ET AL. entwickelten Inhibitoren **23** und BI-2852 (**24**).

2019 wurde von derselben Gruppe der hochpotente Switch I/II-Inhibitor BI-2852 (**24**) vorgestellt (Abb. 14).^[154] Dieser zeigt eine IC_{50} von 180 nM, hemmt Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) verschiedener Ras-Effektorproteine und unterbricht die pErk-Signalkaskade im niedrigen μ M-Bereich. Trotz hoher Affinität besitzt BI-2852 (**24**) keine ausgeprägte Selektivität für bestimmte Isoformen oder Mutationen, sodass er als pan-Ras-Inhibitor zu klassifizieren ist.^[155] Aufgrund seiner guten Kristallisierbarkeit und Bindungsstärke findet er breite Verwendung in *in silico*-Studien (PDB: 6GJ8).^[156]

Einen alternativen Ansatz verfolgte die Arbeitsgruppe von SCHERKENBECK ET AL. mit der Entwicklung von Bisphenol-A-Derivaten (**25**).^[157] Bereits 2013 konnte durch Protein-NMR-Spektroskopie die Bindung an die Switch I/II-Tasche nachgewiesen werden. Ausgehend hiervon wurden verschiedene Dihydrobenzophenon-Derivate synthetisiert. Das Hydrazon-Derivat **26** zeigte im GDP/GTP-Austauschassay eine IC_{50} von 236 μ M sowie zelluläre Aktivität im unteren zweistelligen μ M-Bereich. Das Sulfonylhydrazon-Derivat **27** wies leicht geringere Aktivität auf (IC_{50} = 255 μ M) (Abb. 15).^[158]

Ein weiterer Ansatz zur Inhibierung von Ras stammt aus der Arbeitsgruppe um TERENCE H. RABBITS, die *small molecules* auf Basis intrazellulärer Antikörper entwickelte.^[159] Ziel war es, durch Nachahmung der Antikörperbindung Ras-PPIs gezielt zu blockieren. Die Verbindung CH-3 (**28**) zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M eine nahezu vollständige Inhibition der Akt-Phosphorylierung in der PI3K-Downstreamkaskade, ohne den Gesamt-Akt-Proteingehalt zu beeinflussen. Zudem zeigte CH-3 (**28**) nur geringe Zytotoxizität (IC_{50} = 4.5 μ M) in der KRas^{G13D}-exprimierenden DLD-1-Zelllinie (Abb. 15).^[159,160]

1. Einleitung

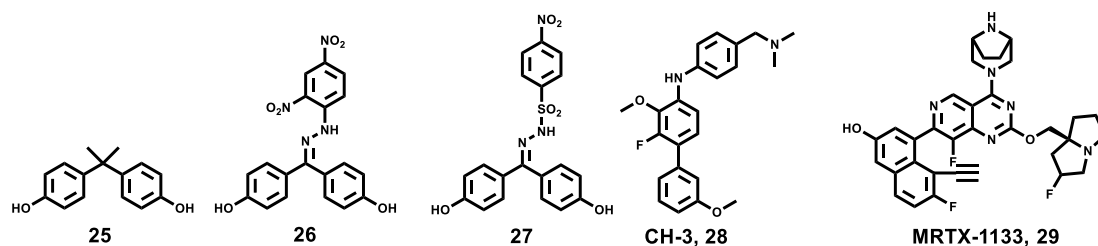


Abbildung 15: Strukturen ausgewählter Inhibitoren gegen $KRas^{G12D}$ und der aktuellen Benchmark-Verbindung MRTX-1133 (**29**).

Ein entscheidender Durchbruch in der gezielten Inhibition von $KRas^{G12D}$ gelang im Jahr 2021 mit der Entwicklung von MRTX-1133 (**29**) durch die Firma MIRATI THERAPEUTICS (Abb. 15). Diese Substanz stellt eine gezielte Weiterentwicklung des kovalent bindenden G12C-Inhibitors Adagrasib (**19**) dar.^[161] Basierend auf dem gemeinsamen Pyrido[4,3-d]pyrimidin-Grundgerüst wurden systematische Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) zur Optimierung der Substitution an den Positionen 2, 4 und 7 durchgeführt. Eine erste Modifikation an der C4-Position führte zur Einführung eines Piperazinyl-Substituenten, der, im protonisierten Zustand, eine ionische Wechselwirkung mit der Carboxyl-Seitenkette von Asp¹² der G12D-Mutante eingeht (Abb. 16).^[161]

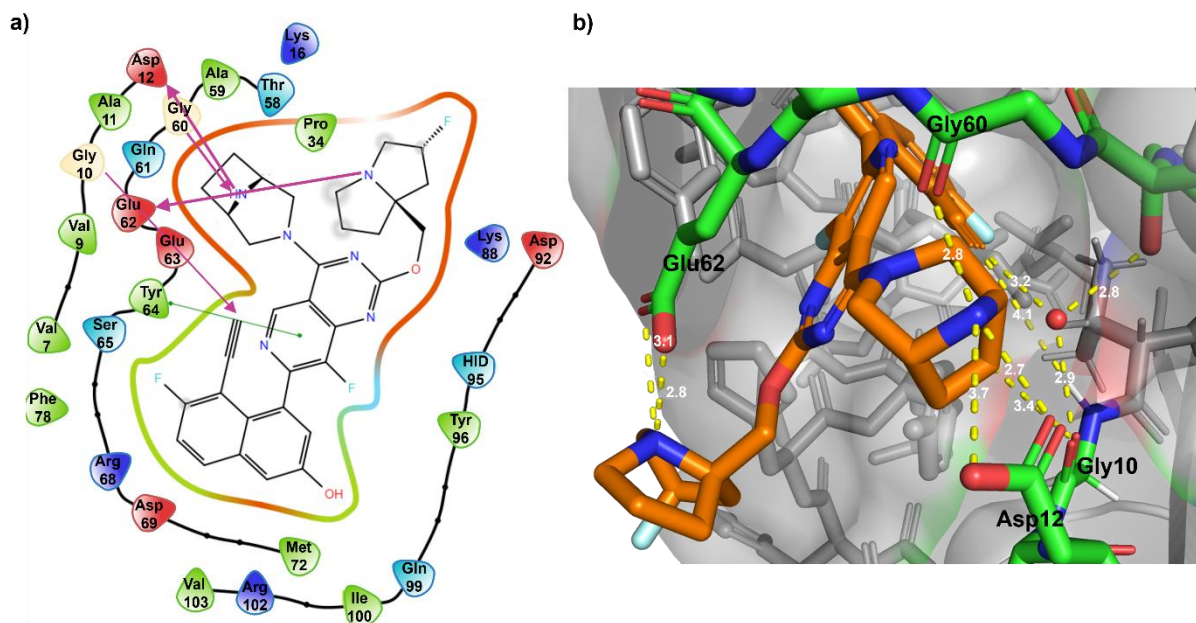


Abbildung 16: a) Protein-Ligand-Interaktionsdiagramm des Inhibitors MRTX-1133 (**29**) mit $KRas^{G12D}$ (PDB: 7RPZ). Die Pfeile zeigen die direkten Wechselwirkungen (WW) zwischen den Aminosäureresten und dem Ligand (**29**) an. b) Abstände der direkten Wechselwirkungen zwischen MRTX-1133 (orange) und den Aminosäureresten Gly10 (sehr schwache WW), Asp12, Gly60 und Glu62 (starke WW) sowie den indirekten über eine Wassermolekül (rote Sphäre) vermittelten Wechselwirkungen.^[161,162]

Die Einführung eines finalen [3.2.1]bicyclischen Diamins in dieser Position führte zu einer über 200-fachen Affinitätssteigerung gegenüber $KRas^{G12D}$ im Vergleich zum Wildtyp. Auch an der C2-Position wurden diverse tertiäre Amine evaluiert. Die höchste

Potenz wurde mit einem 2-Fluoropyrrolizidin-Rest erzielt ($IC_{50} = 21 \text{ nM}$ im pErk-Zellassay). Die tiefe hydrophobe Bindetasche wurde durch einen 3-Hydroxy-7-fluoro-8-ethynyl-naphthyl-Substituenten in der C7 Position adressiert, was zur finalen Verbindung MRTX-1133 (**29**) führte. Diese zeigt eine bemerkenswerte Bindungsaffinität von $K_D = 0.2 \text{ pM}$ sowie eine ca. 700-fache Selektivität gegenüber Wildtyp-Ras.^[161] Darüber hinaus blockiert MRTX-1133 (**29**) effektiv die Ras-Raf-Interaktion im aktiven, GTP-beladenen Zustand. Studien in verschiedenen Tumorzelllinien belegen die breite inhibitorische Aktivität von Verbindung **29**. Interessanterweise wurde jedoch auch eine Hochregulierung von EGFR und HER2 in KRas^{G12D}-Zellen beobachtet, was möglicherweise therapeutisch berücksichtigt werden muss.^[163,164]

Eine alternative Strategie zur Hemmung der Ras-Aktivierung ist die gezielte Inhibition von SOS1, dem wichtigsten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für Ras. Einige SOS1-Inhibitoren wurden bisher entwickelt, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Störung der katalytischen Bindetasche gelegt wurde. Wichtige molekulare Interaktionen beinhalten hierbei die Aminosäuren wie Arg⁷³, Asn⁸⁷⁹ und Tyr⁸⁸⁴.^[44]

Einen wesentlichen Meilenstein auf diesem Gebiet stellt die 2019 publizierte Entwicklung des Quinazolin-basierten Inhibitors Bay-293 (**30**) durch HILLIG ET AL. dar (Abb. 17).^[44] Der Inhibitor **30** bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu den AS-Resten Asp⁸⁸⁷ und Tyr⁸⁸⁴ und besitzt noch weitere Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Tyr⁸⁸⁴. Aufgrund dieser Wechselwirkungen unterdrückt Bay-293 (**30**) die Ras:SOS-Interaktion mit einem IC_{50} -Wert von 21 nM .^[44]

2020 entdeckte die Arbeitsgruppe um MARCO H. HOFMANN und NORBERT KRAUT in einem *High Throughput Screening* die auf einer Quinazolin-Struktur basierende Verbindung BI-68BS (**31**). In der dazugehörigen Kristallstruktur (PDB: 6SFR) wurden starke Wechselwirkungen von **31** mit der lipophilen Region von SOS1, insbesondere mit den Aminosäuren Met⁸⁷⁸, Phe⁸⁹⁰, Leu⁹⁰¹ und His⁹⁰⁵, identifiziert.^[165]

Durch SAR-Optimierungen der Verbindung **31**, wurde 2021 die Verbindung BI-3406 (**32**) entwickelt (Abb. 17). Diese weist eine zusätzliche Wechselwirkung mit dem Tyr⁸⁸⁴ auf. Der Inhibitor **32** erzielte im SPR^{SOS1}-Assay einen $K_D = 9.7 \text{ nM}$ sowie einen IC_{50} -Wert von 5 nM .^[165]

Trotz dieser vielversprechenden Daten konnten Bay-293 (**30**) und BI-3406 (**32**) die präklinische Entwicklung nicht erfolgreich abschließen.^[165] Erst mit der Weiterentwicklung zu BI-1701963 (Struktur nicht veröffentlicht) gelang der Übergang in die klinische

1. Einleitung

Phase I. Diese Substanz bindet ebenfalls an die katalytische Oberfläche von SOS1 und hemmt dadurch die Signaltransduktion entlang des MAPK-Wegs.^[166]

Der bislang einzige weitere SOS1-Inhibitor mit publizierter Struktur in klinischer Entwicklung ist MRTX-0902 (**33**), entwickelt von MIRATI THERAPEUTICS. Mit einem K_i von 1.9 nM und einem zellulären IC_{50} von 29 nM demonstriert Verbindung **33** eine exzellente inhibitorische Wirksamkeit.^[167] Der Inhibitor **33** basiert auf einem o-Phenoxazin-Grundgerüst und zeigt eine gute orale Bioverfügbarkeit. Sie bildet zudem stabile Salzbrücken mit Glu⁹⁰² von SOS1 sowie die charakteristischen Wechselwirkungen mit Tyr884 – ähnlich den Vorgängerverbindungen Bay-293 (**30**) und BI-3406 (**32**) (Abb. 17).^[167]

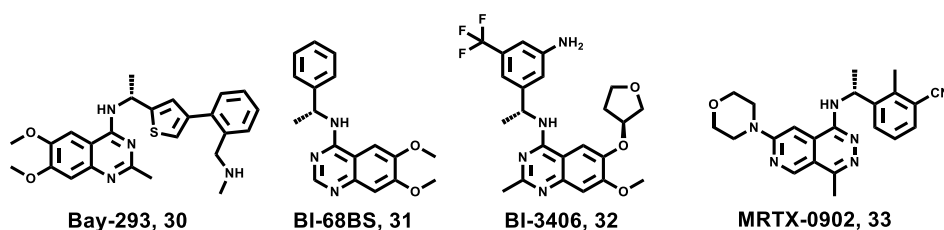


Abbildung 17: Strukturen ausgewählter SOS1-Inhibitoren in präklinischen Phasen (**30-32**) sowie dem einzigen SOS1-Inhibitor in der klinischen Phase 1 mit einer veröffentlichten Struktur (**33**).

Wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist, befinden sich bislang nur wenige KRas-Inhibitoren in fortgeschrittenen klinischen Entwicklungsphasen. Lediglich Sotorasib (**18**) und Adagrasib (**19**) haben bisher eine Zulassung zur Behandlung von KRas^{G12C} mutierten Tumoren erhalten.^[140] Trotz dieses therapeutischen Fortschritts stellt die rasche Entwicklung von Resistenzmechanismen ein zentrales Problem dar. So wurde bei Patienten mit KRas^{G12C}-assoziiertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) unter Sotorasib(**18**)-Therapie durchschnittlich bereits nach sechs Monaten eine klinisch relevante Resistenz beobachtet.^[124]

Die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen sind vielschichtig. Neben sekundären Punktmutationen im KRas-Gen selbst kann auch eine Überexpression der bereits mutierten KRas-Variante zur Umgehung der Inhibition führen. Darüber hinaus wurden kompensatorische Signalwege identifiziert, insbesondere durch eine Hochregulation rezeptor-tyrosinkinasevermittelter Signalwege (RTKs), welche die Effizienz der KRas-Blockade erheblich reduzieren.^[168] Auch Mutationen oder funktionelle Veränderungen in Signaltransduktionskomponenten stromabwärts von KRas, wie z. B. in Neurofibromin (NF1), Phosphatasen oder dem Tumorsuppressor PTEN, können die Wirksamkeit der KRas-Inhibition erheblich beeinträchtigen. Hinzu kommt, dass auch Genfusionen

mit Ras-Effektorproteinen oder adaptive Netzwerkanpassungen zur therapeutischen Flucht beitragen können.^[168]

Zur Überwindung dieser Resistenzmechanismen rücken derzeit vor allem Kombinationstherapien in den Fokus. Eine vielversprechende Strategie besteht in der Kombination von KRas-Inhibitoren wie Sotorasib (**18**) mit Substanzen, die stromabwärts in die Signaltransduktion eingreifen – beispielsweise Inhibitoren gegen MEK, Erk oder PI3K. Weiterhin werden Kombinationen von KRas- und SOS1-Inhibitoren, von unterschiedlichen KRas-Inhibitoren selbst oder die Entwicklung sogenannter PROTACs (*proteolysis-targeting chimeras*) verfolgt, welche auf den gezielten Abbau mutierter KRas-Proteine abzielen.^[122]

1.6 Pentacyclische Triterpene in der medizinischen Chemie

Pentacyclische Triterpene bilden eine weit verbreitete Naturstoffklasse, die in zahlreichen Pflanzen vorkommt, welche seit Jahrhunderten in der traditionellen Medizin Anwendung finden. Ein prominentes Beispiel ist die Heilpflanze *Centella asiatica* (auch bekannt als Gotu Kola), die in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung neurologischer, endokriner, kardiovaskulärer, gastrointestinaler, gynäkologischer sowie immunologischer und dermatologischer Erkrankungen eingesetzt wird.^[169] Weitere triterpenreiche Pflanzen sind unter anderem Äpfel, verschiedene aromatische Kräuter wie Salbei und Rosmarin sowie insbesondere Birkenrinde.^[170–173]

Die Struktur der Triterpene basiert auf sechs Isopreneinheiten, die über lineare oder cyclische Verknüpfungen miteinander verbunden sind. Die linearen Vertreter dieser Naturstoffklasse umfassen beispielsweise die Squalene (**34**), die als wichtige Zwischenstufe in der Biosynthese sterolischer Naturstoffe fungieren.^[174] Die cyclischen Triterpene lassen sich nach der Anzahl ihrer Ringsysteme unterteilen – die bedeutendsten Gruppen stellen hierbei die tetracyclischen und pentacyclischen Triterpene dar, mit vier bzw. fünf kondensierten Ringen im Kohlenstoffgerüst.

Zu den tetracyclischen Triterpenen zählen unter anderem die Lanostane, mit dem strukturell und biosynthetisch zentralen Lanosterol (**35**) als Vertreter.^[174] Die pentacyclischen Triterpene lassen sich wiederum in drei große Subklassen gliedern: die Lupane, mit Lupeol (**36**), Betulin (**37**) sowie dessen oxidiertem Derivat Betulinsäure (**38**), die Oleanane, repräsentiert durch die Oleanolsäure (**39**) und die Ursane, deren Grundstruktur in der Ursolsäure (**40**) vorliegt (Abb. 18).

Während Lupane typischerweise aus vier Sechsring- und einem Fünfringsystem bestehen, sind die Oleanane und Ursane durch ein Gerüst aus fünf kondensierten Sechsringeinheiten gekennzeichnet.^[170,173,174] Die chemische Diversität innerhalb dieser Grundgerüste trägt wesentlich zur Vielzahl beobachteter biologischer Wirkungen bei, was pentacyclische Triterpene zu einem vielversprechenden Ziel in der Entwicklung neuer Wirkstoffe macht.

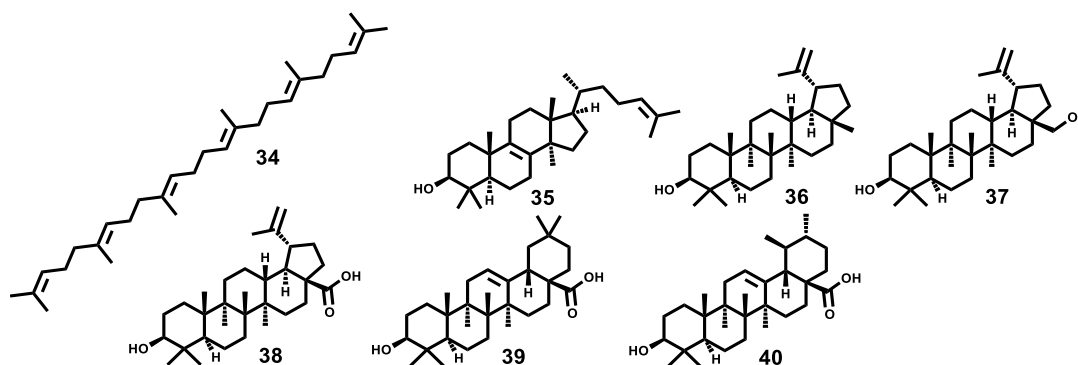


Abbildung 18: Grundstrukturen der verschiedenen Triterpen-Untergruppen.

Pentacyclische Triterpene sind für eine Vielzahl pharmakologisch relevanter Wirkungen bekannt. In zahlreichen präklinischen und klinischen Studien konnte insbesondere ihr entzündungshemmendes und antibakterielles Potenzial bestätigt werden. Ein besonders intensiv untersuchter Vertreter ist das Saikosaponin A (**41**), ein Glycosid mit einem Olean-basierten Triterpengerüst (Abb. 19).^[175] Die entzündungshemmende Aktivität dieser Verbindung beruht wesentlich auf der Hemmung des nuclear factor- κ B (NF- κ B) Signaltransduktionsweges, der eine zentrale Rolle bei der Regulation inflammatorischer Prozesse spielt.^[176] Darüber hinaus besitzt Saikosaponin A (**41**) antioxidative Eigenschaften, die auf einer Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und von Malondialdehyd sowie auf der Aktivierung antioxidativer Enzymsysteme wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPx) beruhen.^[175,177]

Ein weiteres gut charakterisiertes Naturprodukt mit breit gefächertem pharmakologischem Profil ist die Ursolsäure (**40**). Neben ihren antiinflammatorischen Eigenschaften ist sie auch als Modulator der Apoptose und des Immunsystems bekannt. Sie fördert die Regeneration von Neuronen und hemmt gleichzeitig die Ausbildung von Narbengewebe, was sie für neurologisch-entzündliche Indikationen interessant macht.^[178] Sowohl Olean- als auch Ursan-basierte Triterpene sind in der medizinischen Chemie weit

verbreitet und bilden die Grundlage für verschiedene Wirkstoffe zur Behandlung ischämischer und hämorrhagischer Läsionen des Gehirns, des Herz-Kreislauf-Systems sowie anderer Organe.

Insbesondere die Verbindungen Oleanolsäure (**39**) und Glycyrrhizinsäure (**42**), ein Hauptbestandteil der Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra*), zeigen leberschützende Wirkungen und werden in der Therapie viraler Erkrankungen wie Hepatitis eingesetzt (Abb. 19).^[179,180]

Darüber hinaus wurde eine breite antivirale Aktivität zahlreicher pentacyclischer Triterpene und ihrer halbsynthetischen Derivate beschrieben. Diese schließen Wirkstoffe gegen Influenza-Viren, Hepatitis B und C, HIV, Herpes-simplex-Viren, die Schweinegrippe sowie SARS-CoV-2 ein.^[177,181–188] Die große strukturelle Diversität dieser Naturstoffklasse bietet dabei zahlreiche Angriffspunkte für zielgerichtete Modifikationen mit dem Ziel, hochselektive antivirale Leitstrukturen zu entwickeln.

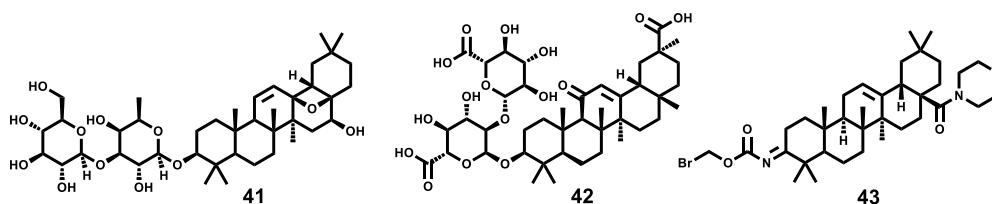


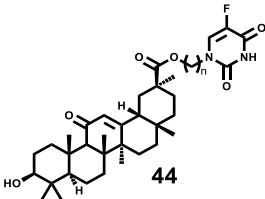
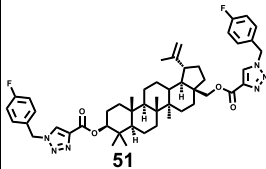
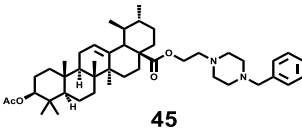
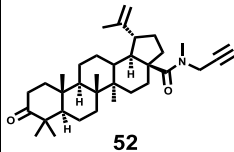
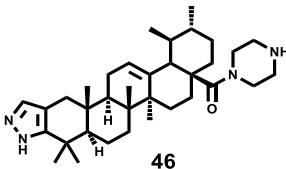
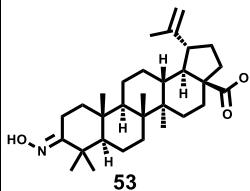
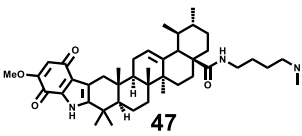
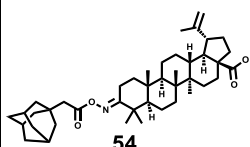
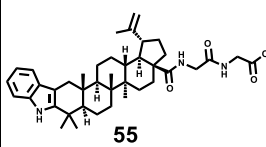
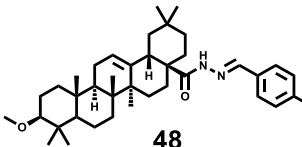
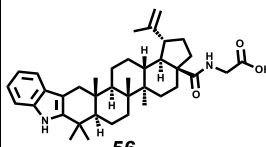
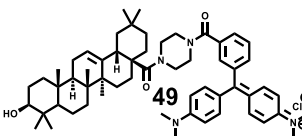
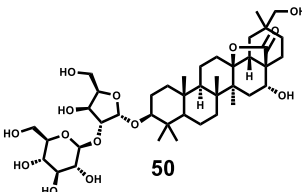
Abbildung 19: Strukturen von Saikosaponin A (**41**), Glycyrrhizinsäure (**42**) und dem Oleanolsäure-Derivat **43**.^[189]

Ein zunehmend gut verstandener Bereich innerhalb der medizinisch-chemischen Forschung zu pentacyclischen Triterpenen ist ihre antitumorale Aktivität. Bemerkenswert ist, dass viele Vertreter dieser Naturstoffklasse trotz ihrer ausgeprägten biologischen Wirkung eine geringe systemische Toxizität aufweisen. Dies macht sie zu attraktiven Leitstrukturen für die Entwicklung neuer, nebenwirkungsarmer Krebsmedikamente.

Insbesondere Ursolsäure (**40**) wurde in den vergangenen Jahren intensiv als potenziell präventiv und therapeutisch wirksamer Wirkstoff gegen verschiedene Tumorarten untersucht.^[190–192] Eine Auswahl repräsentativer Derivate des Ursan-, Lupan- und Olean-Typs sowie deren zytotoxisches Potenzial gegenüber unterschiedlichen Krebszelllinien ist in Tabelle 1 dargestellt.

1. Einleitung

Tabelle 1: Strukturen und IC₅₀-Werte für ausgewählte Derivate pentacyclischer Triterpene mit einer zytotoxischen Wirkung im niedrigen mikromolaren Bereich gegen verschiedene Krebszelllinien.

Struktur	Zelllinie	IC ₅₀ [μM]	Lit.	Struktur	Zelllinie	IC ₅₀ [μM]	Lit.
Ursan-Typ				Lupan-Typ			
	A549	15.68	[193]		T47D MCF-7 SNB-19	0.05 0.09 0.08	[194]
	HeLa MKN45	2.6 2.1	[195]		MCF-7 A375	26.0 17.0	[196]
	SUM149PT HCC1937	4-6	[197]		CCRF-CEM MCF-7 G-361 HeLa	18.9 23.3 21.3 27.8	[198]
	MCF-7 HeLa	1.66 3.16	[199]		CCRF-CEM MCF-7 G-361 HeLa	16.2 16.3 7.4 8.3	[198]
Olean-Typ					B164A5	8.11	[201]
	A549 BEAS-2B (Wildtyp)	0.08 2.96	[200]		B164A5	9.15	[201]
	MCF-7	0.7 (EC ₅₀)	[202]				
	HeLa HepG2 U87 MG	3.2 8.8 5.7	[203]				

Bereits 2014 publizierte die Arbeitsgruppe um HUAQING WANG ein Ursolsäure-haltiges Liposomenpräparat, dass in einer Phase-I-Studie getestet und für weiterführende Phase-II-Studien vorbereitet wurde.^[204] In einer weiteren Untersuchung synthetisierten

CHENG ET AL. eine Serie von Glycyrrhizin-, Oleanol- und Ursolsäure-Derivaten, die in A549-Zellen eine Zellzyklusblockade in der G₁-Phase von bis zu 92% bewirkten. Das Fluorouracil-Konjugat **44** zeigte mit einem IC₅₀-Wert von 15.68 µM eine signifikante zytotoxische Aktivität.^[193] Gegen die gleiche Zelllinie entwickelte die Arbeitsgruppe um HACIOSMANĞLU EBRU das Hydrazid-Hydrazon-Oleanolsäure-Derivat **48**, das die Krebszellen um einen Faktor 37.5 stärker inhibierte als gesunde Zellen (Tab. 1).^[200]

Einen der potentesten Vertreter präsentierte STANISLAV BORYCZKA mit dem Triazol-Betulinsäure-Derivat **51**, das gegen MCF-7-Zellen einen IC₅₀-Wert von lediglich 0.09 µM zeigte.^[194] Das zwei Jahre später von S. FRIEDRICH ET AL. entwickelte Malachitgrün-Oleanolsäure-Derivat **49** zeigte eine etwas schwächere Wirkung als Verbindung **51**, hatte mit einem EC₅₀= 0.7 µM aber immer noch einen guten zytotoxischen Effekt gegen diese Zelllinie.^[202] WRZEŚNIOK ET AL. entwickelten 2024 eine Reihe von Acetylen-Amid-Betulonsäure-Derivaten, von denen die Verbindung **52** mit einem IC₅₀= 26 µM eine gute, wenn auch deutlich schwächere zytotoxische Wirkung gegen die MCF-7-Zelllinien als die Verbindungen **49** und **51** aufweist. Bemerkenswert bei der Verbindung **38** ist allerdings die gute Selektivität. Gegen die ebenfalls getesteten *normal human fibroblast* Zellen zeigte Verbindung **52** keinerlei zytotoxischen Effekt (Tab. 1).^[196]

Ein Großteil der experimentellen Onkologie nutzt HeLa-Zellen als Modell, da es sich um die erste dauerhaft kultivierbare humane Tumorzelllinie handelt.^[205] 2019 gelang es MENG ET AL. mit der Verbindung **31** ein Piperazin-Ursolsäure-Derivat zu entwickeln, das mit einem IC₅₀= 2.6 µM eine gute Zytotoxizität gegen HeLa-Zellen besitzt.^[195] Zwei Jahre später erzielte die Arbeitsgruppe um WEN GU mit dem Indolquinon-Amid-Ursolsäure-Derivat **33** eine vergleichbare Wirkung gegen diese Zelllinie mit einem IC₅₀= 3.2 µM.^[199] Mit der Verbindung **36** entwickelte YIN ET AL. ein laktonisiertes Oleanolsäure-Derivat, das ebenfalls eine gute Zytotoxizität gegen HeLa-Zellen aufweist.^[203]

2024 wurde von ČERNA ET AL. ein Oxim-Derivat der Betulinsäure (**53**) entwickelt, das zunächst einen IC₅₀-Wert von 27.8 µM gegen HeLa-Zellen erreichte. Erst mit der weiterführenden Derivatisierung des Oximes zu Verbindung **54** konnte eine Zytotoxizität im einstellig mikromolaren Bereich erzielt werden (Tab. 1).^[198]

2. Zielsetzung

Pentacyclische Triterpene sind in der Literatur umfassend im Kontext ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien beschrieben; ihr Potenzial als direkte Modulatoren der Ras-Signaltransduktion ist hingegen bislang nur unzureichend untersucht. Vor diesem Hintergrund verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, das pharmakologische Potenzial dieser Naturstoffklasse als Inhibitoren des KRas4B-Proteins systematisch zu erschließen, mit besonderem Fokus auf die onkogene G12D-Mutation. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, pentacyclische Triterpene als neuartige und bislang kaum erschlossene Zielstrukturen für die Entwicklung potenter KRas-Inhibitoren zu etablieren.

Zu diesem Zweck soll zunächst eine strukturell diverse Bibliothek von Derivaten des Lupan-, Ursan- und Olean-Typs synthetisiert werden. Die resultierenden Verbindungen sollen anschließend hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in einem Nukleotid-Austausch-Assay untersucht werden, um ihre hemmende Wirkung auf den Ras-SOS-vermittelten GDP/GTP-Austausch zu evaluieren. Auf Basis dieser Daten sollen belastbare Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden, die den Einfluss spezifischer struktureller Modifikationen auf die Inhibition des Nukleotid-Austauschs widerspiegeln.

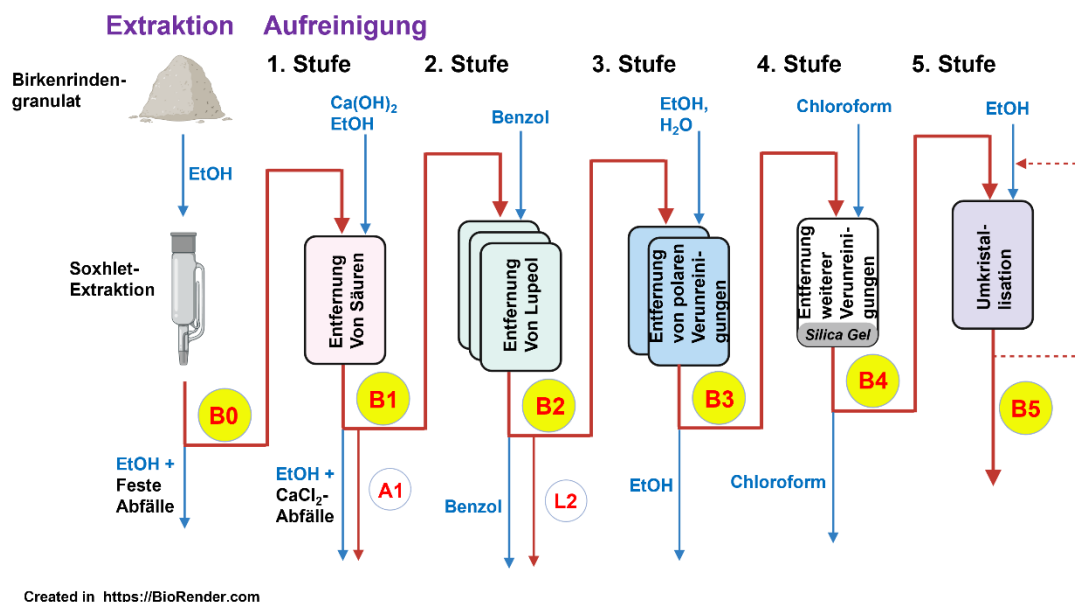
Die vielversprechendsten Vertreter dieser Substanzklasse sollen darauf aufbauend in zellulären Assaysystemen weiter charakterisiert werden. Dabei sollen sowohl ihre zytotoxischen Eigenschaften als auch ihr Einfluss auf KRas4B-abhängige Downstream-Signalkaskaden untersucht werden. Zur Bestimmung des molekularen Wirkortes der untersuchten Verbindungen sollen ergänzende NanoBRET-, Protein-Protein-Interaktion- sowie Surface-Plasmon-Resonance-Assays eingesetzt werden.

Zur mechanistischen Einordnung dieser experimentellen Befunde sollen darüber hinaus umfangreiche Molecular-Modeling-Studien durchgeführt werden. Diese sollen dazu beitragen, die Wechselwirkungen pentacyclischer Triterpene mit KRas4B auf molekularer Ebene zu analysieren und ein konsistentes Wirkmodell abzuleiten, das als Grundlage für die weitere Optimierung dieser Substanzklasse dienen kann.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Naturstoffextraktion von Betulin

Betulin wurde erstmals im Jahr 1788 von *Johann Tobias Lowitz* beschrieben, der bei der Verbrennung von Birkenholz und -rinde die Bildung feiner weißer Flocken beobachtete.^[206] In den vergangenen knapp 250 Jahren wurden – insbesondere im Zuge der fortschreitenden naturwissenschaftlichen und medizinischen Forschung – zahlreiche Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung dieses Naturstoffs entwickelt und optimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von ŠIMAN ET AL. (2016) beschriebene Verfahren für die Extraktion von Betulin (**37**) angewendet (Schema 3).^[207] Dieses Protokoll erlaubt eine effiziente Isolierung von Betulin (**37**) aus Birkenrindengranulat unter vergleichsweise milden Bedingungen.



Created in <https://BioRender.com>

Schema 3: Schematische Darstellung des Naturstoffextraktions- und Aufreinigungsprozesses von Betulin aus Birkenrindengranulat.^[207]

Als Ausgangsmaterial diente kommerziell erhältliches, bereits zerkleinertes Birkenrindengranulat. Die Extraktion erfolgte zunächst für 24 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur mit Ethanol. Aus 50.0 g eingesetztem Granulat wurden 16.9 g Rohextrakt (**B0**) erhalten, entsprechend einem Massenanteil von etwa 34%.

Die Aufreinigung des Rohextrakts erfolgte stufenweise. In der ersten Reinigungsstufe wurde eine alkalische Waschung durchgeführt, bei der 5.00 g der Fraktion **B0** mit siedender Calciumhydroxid-Lösung in Ethanol behandelt wurden. Hierdurch wurden

schwerlösliche saure Komponenten – insbesondere Betulinsäure – entfernt. Nach einer Heißfiltration wurden 4.71 g der Fraktion **B1** sowie 0.295 g der Abfallfraktion **A1** erhalten.

In einem zweiten Schritt wurde Lupeol aus dem Extrakt abgetrennt, indem Fraktion **B1** aus Benzol umkristallisiert wurde. Dieser Prozess führte zu 1.51 g der Fraktion **B2** sowie 3.19 g der Fraktion **L2**, die einen hohen Lupeol-Anteil enthalten dürfte. Fraktion **B2** wurde anschließend in siedendem Ethanol gelöst, und durch Fällung mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch wurden polare Verunreinigungen abgetrennt. Nach der Filtration des Rückstands wurden 0.977 g der Fraktion **B3** sowie 0.533 g der Fraktion **B3F** isoliert.

Fraktion **B3** wurde in Chloroform gelöst und über eine Kieselgel-Säule filtriert, wobei farbige Begleitstoffe zurückgehalten wurden. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurden 153 mg der hellgelben Fraktion **B4** erhalten, die durch Umkristallisation aus Ethanol 83.7 mg reines Betulin (**37**) ergab.

Da die Ausbeute an Betulin (**37**) vergleichsweise gering ausfiel, wurden die im Aufreinigungsprozess anfallenden Zwischenfraktionen HPLC-MS-analytisch untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass insbesondere die Fraktionen **L2** und **B3F** signifikante Mengen an Betulin (**37**) enthielten. Insgesamt wurden 2.62 g Betulin (**37**) isoliert, entsprechend einer Ausbeute von 52 Gew.-% bezogen auf den Rohextrakt bzw. 17 Gew.-% bezogen auf die eingesetzte Rohmasse des Birkenrindengranulats. In der Literatur werden typischerweise etwas höhere Ausbeuten von 20-30% angegeben, die sich ebenfalls auf die eingesetzte Rohmasse beziehen.^[208]

Die massenspektrometrische Analyse des isolierten Betulins (**37**) und der betulinhaltigen Zwischenfraktionen ergab eine Dehydratisierung an Position C-3, die unter den eingesetzten HPLC-MS-Bedingungen auftrat. Dieser Prozess führt zu einer Massendifferenz von 18 g/mol (Abb. 20). Der Effekt wurde durch HPLC-MS Kontrollmessungen unter Verwendung von kommerziell erworbenem Betulin (**37**) eindeutig bestätigt.

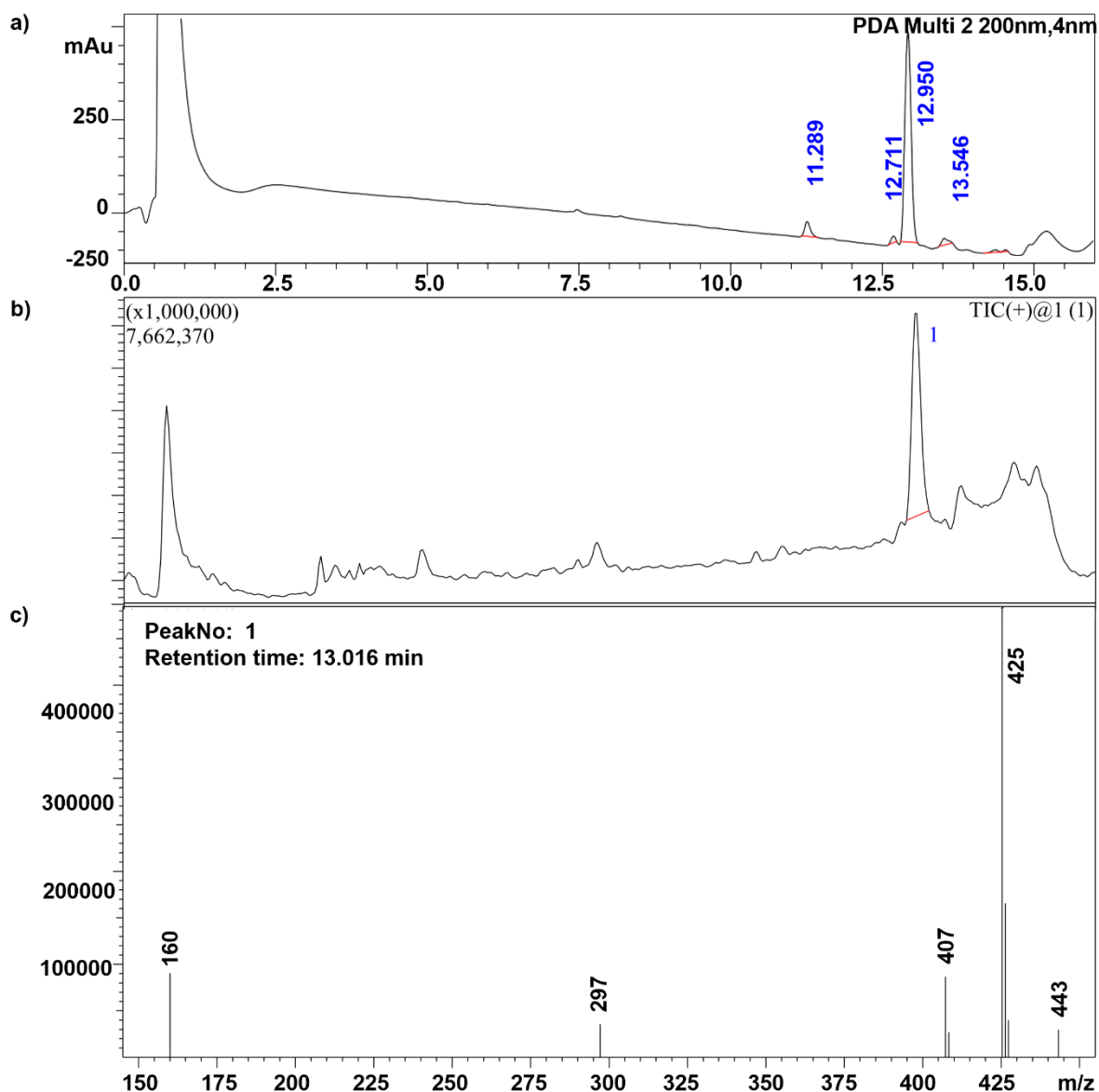


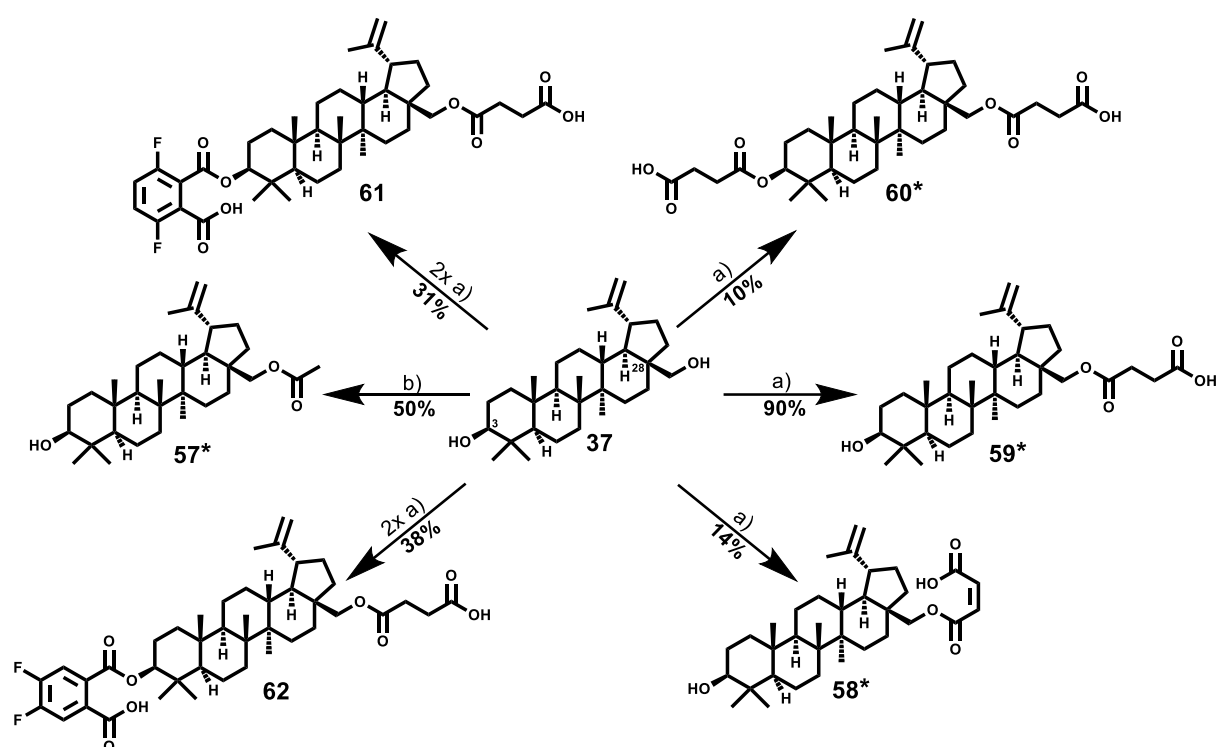
Abbildung 20: LCMS-Chromatogramme von der Fraktion L2. a) HPLC-Chromatogramm bei der Wellenlänge 200 nm mit der Retentionszeit von 12.950 min, entsprechend der Retentionszeit von Betulin (37). b) Positive Ionisationsspur des Betulinpeaks. c) Massenspektrum mit $[M+H]^+$ bei $m/z=443$ g/mol (Betulin) sowie dem intensiven Signal bei $m/z=425$ g/mol (Dehydratisierungsprodukt).

Die in dieser Arbeit erzielte, geringfügig niedrigere Ausbeute als von ŠIMAN ET AL. veröffentlicht lässt sich plausibel mit der in der Literatur vielfach beschriebenen Variabilität des Betulingehalts erklären, die stark von der botanischen Herkunft der verwendeten Birkenarten abhängt.^[209,210] Zudem wurde festgestellt, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Fraktionen in mehreren Aspekten von den in der Literatur berichteten Resultaten abweichen. So wurden die Fraktionen insgesamt kleiner als von ŠIMAN ET AL. beschrieben, während bereits in frühen Zwischenstufen signifikante Mengen an Betulin (37) nachweisbar waren. ŠIMAN ET AL. berichteten hingegen die Isolierung des Zielmoleküls erst im finalen Reinigungsschritt.^[207]

3.2 Synthese von Derivaten der pentacyclischen Triterpene

3.2.1 Synthese der Derivate des Lupantyps

Im Rahmen eines High-Throughput-Screenings (HTS) der Firma *Lead Discovery Center* wurde ein Diphthalat-Derivat von Betulin (**37**) als aktiver Treffer identifiziert. Aufbauend auf diesem Befund wurden systematisch Derivate dieses pentacyclischen Triterpens synthetisiert. Die Grundstruktur von Betulin (**37**) bietet hierfür zwei besonders reaktive Positionen: den äquatorial stehenden sekundären Alkohol in C-3 sowie die axiale Hydroxymethylgruppe in C-28 (Schema 4).



Schema 4: Reaktionsschema für die Synthese der Betulin-Derivate **57**–**62**. a) cyclisches Anhydrid, DMAP, Pyridin, 100°C; b) Ac₂O, DMAP, NEt₃, DCM, Rt. *: Literaturbekannt

Zur Untersuchung des Einflusses der Hydroxyfunktionen auf die biologische Aktivität wurden diese zunächst gezielt geschützt (Schema 4). Trotz der sterisch anspruchsvollen neopentyl Umgebung der Hydroxymethylgruppe gelang deren selektive Monoacetylierung unter Bildung von Derivat **57** in 50% Ausbeute.^[211]

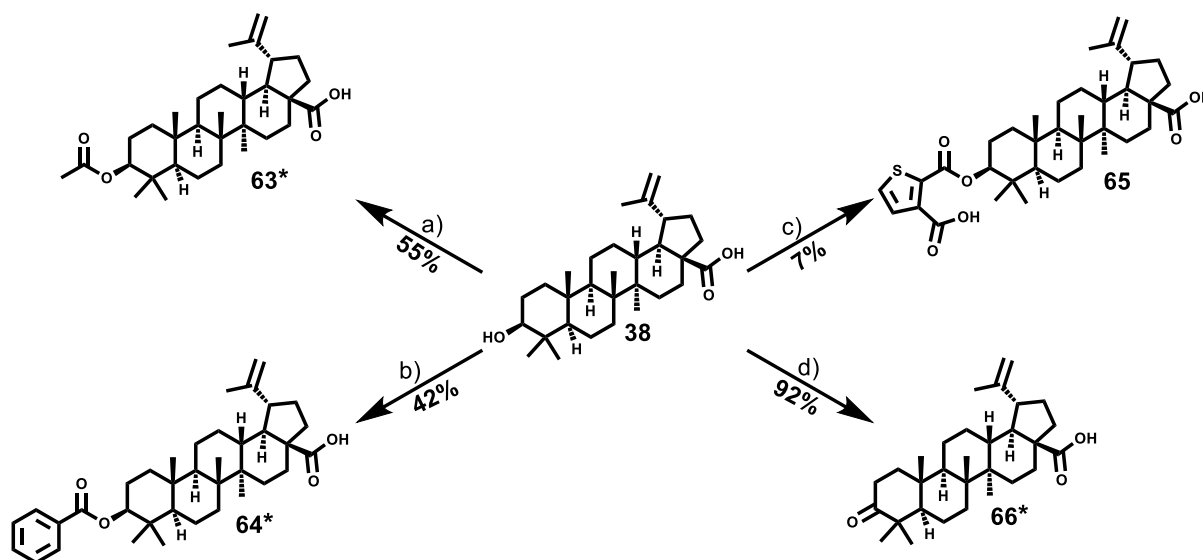
Auch bei den Kupplungsreaktionen mit Malein- bzw. Bernsteinsäure trat die deutlich höhere Reaktivität des primären gegenüber dem sekundären Alkohol hervor. Die Einführung längererkettiger Dicarbonsäuren diente der Untersuchung des Einflusses einer weiter vom triterpenoiden Grundgerüst entfernten Carboxygruppe auf die biologische Aktivität. Während das Maleinsäureanhydrid gegenüber dem primären Alkohol nur

eine geringe Reaktivität zeigte und das Produkt **58** lediglich in 14% Ausbeute lieferte, reagierte das Bernsteinsäureanhydrid signifikant effizienter. Hierbei wurde das Zielmolekül **59** in 90% Ausbeute erhalten.^[212,213] Darüber hinaus wurde das zweifach substituierte Betulin-Derivat **60** in 10% Ausbeute isoliert.

In Anlehnung an den ursprünglichen HTS-Treffer wurde das Monosuccinat **59** anschließend sowohl mit 3,6- als auch mit 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid umgesetzt. Die resultierenden Difluorphthalat-Derivate **61** und **62** wurden in 31% bzw. 38% Ausbeute erhalten (Schema 4).^[214]

Neben Betulin (**37**) stellt Betulinsäure (**38**) die zweite zentrale Grundstruktur innerhalb der Lupan-Gruppe dar, die sich strukturell lediglich durch die Carboxyfunktion in Position 28 von Betulin unterscheidet. Im Rahmen der SAR-Studien wurden zunächst gezielte Modifikationen der Hydroxygruppe in Position 3 durchgeführt (Schema 5).

Verwendet wurden klassische Schutzgruppen sekundärer Alkohole, darunter Acetyl- und Benzoylreste. Diese Eingriffe senkten die chemische Reaktivität der Hydroxyfunktion und beeinflussten parallel deren polare Eigenschaften. Darüber hinaus wurde die Oxidation zum entsprechenden Keton realisiert. Ergänzend wurde ein Thiophen-Derivat eingeführt, das strukturell den zuvor untersuchten Phthalatgruppen ähnelt, jedoch einen deutlich elektronenreicheren Substituenten darstellt.



Schema 5: Syntheschema für die Modifikationen der Betulinsäure an der Alkoholfunktion. a) Ac_2O , DIPEA, DMAP, THF, Rt; b) BzCl , DMAP, Pyridin, 100°C ; c) 2,3-Thiophenedicarbonsäureanhydrid, DMAP, Pyridin, 100°C ; d) DMP, $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$, Rt. *: Literaturbekannt

Zu Beginn der Derivatisierungsstudien wurde der sekundäre Alkohol in einer klassischen Acetylierungsreaktion mit Essigsäureanhydrid und DIPEA in Gegenwart von

DMAP als nukleophilem Katalysator umgesetzt, wobei das Acetat **63** in 55% Ausbeute isoliert wurde.^[215]

Die Umsetzung von Betulinsäure (**38**) mit Benzoylchlorid in Pyridin führte zum Benzoyl-Derivat **64**, das in 42% Ausbeute erhalten wurde.^[216] Obwohl diese Ausbeute auf den ersten Blick moderat erscheint, liegt sie im Bereich der in der Literatur beschriebenen Vergleichswerte.^[217,218] Die Resultate weisen darauf hin, dass die Hydroxygruppe in Position 3 nur eine vergleichsweise geringe Reaktivität aufweist, was auf die benachbarte Dimethylsubstitution und die damit verbundene sterische Abschirmung zurückzuführen sein dürfte (Schema 5).

Die Umsetzung von Betulinsäure (**38**) mit 2,3-Thiophendicarbonsäureanhydrid in Pyridin ergab das Thiophen-Derivat **65** lediglich in 7% Ausbeute. Die niedrige Ausbeute resultierte vornehmlich aus der Bildung zweier Regioisomere, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit chromatographisch nur unzureichend voneinander getrennt werden konnten. Trotz des Einsatzes unterschiedlicher chromatographischer Methoden – darunter Kieselgel-Säulenchromatographie, *Reversed-Phase*-Chromatographie sowie verschiedene Eluentensysteme – ließ sich letztlich nur eines der beiden Isomere (**65**) mittels präparativer HPLC in reiner Form isolieren.

Als letzte Modifikation der Hydroxygruppe in Position 3 erfolgte deren Oxidation zur Ketofunktion. Hierzu wurde ein Reaktionsscreening unterschiedlicher Oxidationsmethoden durchgeführt, das zur Synthese von Betulonsäure (**66**) führte (Tab. 2).

Die in der Literatur am häufigsten verwendete Methode zur Synthese von Betulonsäure (**66**) basiert auf der Oxidation mit dem Jones-Reagenz.^[219] Die Umsetzung von Betulinsäure (**38**) in Aceton lieferte jedoch lediglich 1% des isolierten Produkts, während Ausbeuten von bis zu 45% berichtet sind.^[219]

Aufgrund dieses unbefriedigenden Ergebnisses wurde eine modifizierte Variante nach MELNIKOVA ET AL. evaluiert, bei der das Jones-Reagenz auf Aluminiumoxid immobilisiert wird. Trotz der in der Literatur dokumentierten Ausbeute von 97% konnte das Zielmolekül **66** in der vorliegenden Arbeit nicht isoliert werden.^[220]

Anschließend wurden verschiedene alternative Oxidationsverfahren parallel getestet, darunter die klassische und erweiterte Swern-Oxidationen mit 3,3-Dichloro-1,2-diphenylcyclopropan als Aktivator, Oxidationen mit KMnO₄ auf Kieselgur, mit N-Bromosuccinimid bzw. N-Bromacetamid sowie mit Natriumhypochlorit.^[221–225] Alle Methoden

3. Ergebnisse und Diskussion

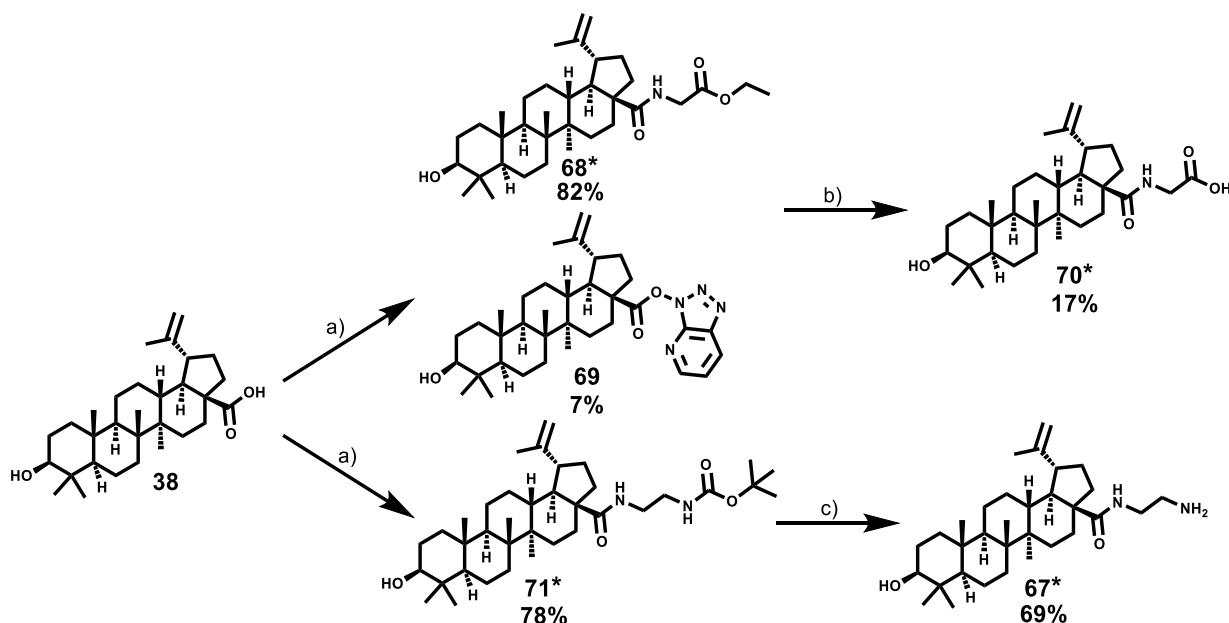
führten entweder zu keinem bzw. unvollständigem Umsatz oder erzeugten eine Vielzahl von Nebenprodukten, sodass eine Isolierung der Zielverbindung nicht möglich war (Tab. 2).

Tabelle 2: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der gescreenten Oxidationsreaktionen für die Synthese von Betulonsäure (**66**) aus Betulinsäure (**24**).

Reaktionsbedingungen	Ausbeute	Literaturausbeute
Jones-Reagenz ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2O , H_2SO_4), Aceton, MeOH , 0°C	1%	45% ^[219]
Jones-Reagenz ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2O , H_2SO_4), Al_2O_3 , Rt	Das Produkt konnte nicht isoliert werden.	97% ^[220]
DMP, $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$, Rt	92% (keine Reinigung notwendig)	71% ^[226]
DMP, NaHCO_3 , DCM , $-20^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$	>99% (Säulenchromatographische Reinigung notwendig)	-
1.) NBS, NaHCO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, 100°C ; 2.) HCl	Das Produkt konnte nicht isoliert werden.	-
1.) CO_2Cl_2 , DMSO , DCM , -60°C ; 2.) TEA, $-60^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$	Kein Umsatz	-
NBA, AcOH , $\text{Aceton}/\text{H}_2\text{O}$, 25°C	Das Produkt konnte nicht isoliert werden.	-
NaOCl , AcOH , 25°C , NaHSO_3	Das Produkt konnte nicht isoliert werden.	-
3,3-Dichloro-1,2-diphenylcyclopropen, CO_2Cl_2 , TEA, CycHex, MeCN, DMSO , $10^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$	Kein Umsatz	-
KMnO_4 auf Kieselgur, THF, 80°C	Kein Umsatz	-

Erst der Einsatz von Dess-Martin-Periodinan (DMP) ermöglichte eine exzellente Ausbeute von 92%, die die Literaturangabe von 71% deutlich übertrifft.^[226] Bemerkenswert ist, dass das Produkt **66** nach der wässrigen Aufarbeitung analytisch rein vorlag. Eine modifizierte Reaktionsführung mit NaHCO_3 -Zusatz bei -20°C ergab nach säulenchromatographischer Reinigung sogar eine quantitative Ausbeute.^[227]

Zur Synthese des Glycin-Derivats **70** wurde zunächst Betulinsäure (**38**) in einer HATU-aktivierten Amidierung mit Glycinethylester umgesetzt, wobei das Produkt **68** in 82% Ausbeute isoliert wurde. Als Nebenprodukt entstand der während der Kupplung gebildete Aktivester **69** in 7% Ausbeute.^[228] Die anschließende Verseifung des Ethylesters mit 0.25 M NaOH bei 0°C lieferte das freie Glycin-Derivat **70** in 17% Ausbeute (Schema 6).^[229] Da die isolierte Substanzmenge für die geplanten biologischen Untersuchungen ausreichte, wurde auf eine weiterführende Optimierung verzichtet.

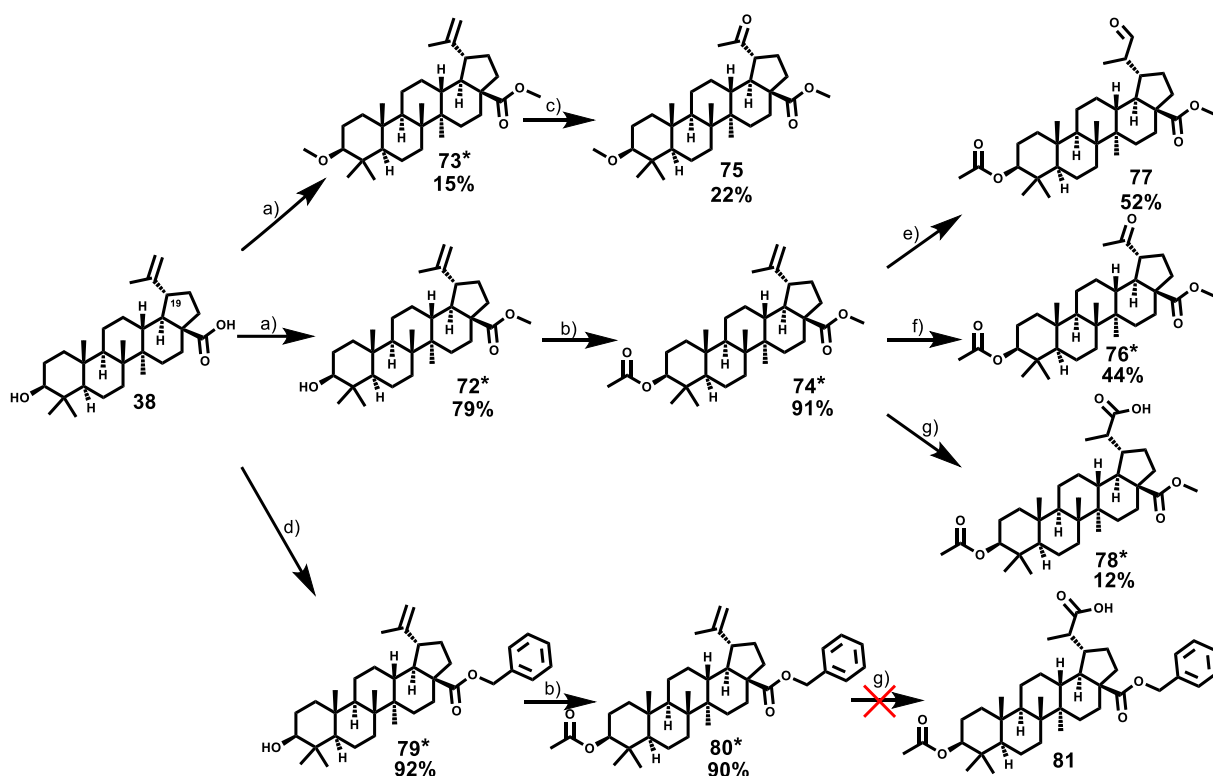


Schema 6: Reaktionsschema zur Synthese von Betulinsäure-Derivaten mit polaren funktionellen Gruppen in distaler Position relativ zum triterpenoiden Grundgerüst. a) einfach geschütztes Amin, HATU, DIPEA, DCM, 0 °C; b) 0.25 N NaOH-Lsg., THF, H₂O. 0 °C→Rt; c) 4 M HCl/Dioxan, Rt. *: Literaturbekannt

Zur Synthese des Amin-Derivats **67** wurde Betulinsäure (**38**) in einer HATU-vermittelten Kupplungsreaktion mit tert-Butoxycarbonyl-geschütztem Ethylendiamin umgesetzt, wobei das Boc-geschützte Intermediat **71** in 78% Ausbeute isoliert wurde. Die anschließende Boc-Abspaltung mit 4 M HCl in Dioxan lieferte das Zielmolekül **67** in 69% Ausbeute (Schema 6).

Ein weiterer Fokus der strukturellen Modifikation von Betulinsäure (**38**) lag auf der äquatorial stehenden Isopropenylgruppe in Position 19, die im Rahmen der SAR-Studien oxidativ funktionalisiert werden sollte (Schema 7). Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wurden die Carboxy- und Hydroxygruppen zunächst geschützt. Die Umsetzung der Carboxygruppe mit Methyljodid und Natriumhydrid als starke Base lieferte den Methylester **72** in 79% Ausbeute. Im Gegensatz zu Literaturangaben wurde zudem das doppelt methylierte Nebenprodukt **73** in 15% Ausbeute isoliert.^[230] Die 3-OH-Funktion wurde nach Standardprotokollen als Acetat geschützt, was zur Bildung des Derivats **74** in 91% Ausbeute führte.^[231]

Die erste gezielte Modifikation der Isopropenylgruppe erfolgte durch oxidative Spaltung der Doppelbindung mittels Ozonolyse. Hierbei wurde eine Lösung des zweifach methylierten Derivats **73** in einem MeOH/DCM-Gemisch bei -78°C mit Ozon behandelt.^[232,233] Nach dem Quenchen der Reaktion durch Zugabe von Dimethylsulfid wurde das gewünschte Keton **75** in 22% Ausbeute isoliert (Schema 7).^[234]



Schema 7: Syntheschema für Betulinsäure-Derivate mit einer Funktionalisierung an der Isopropenylgruppe. a) MeI, NaH, THF, Rt; b) Ac₂O, DIPEA, DMAP, THF, 70 °C; c) O₃, MeOH/DCM 4:1, -78 °C, DMS; d) BnBr, K₂CO₃, DMF, 70 °C; e) 4% OsO₄ in H₂O, NMO, DCM, Rt; f) NaIO₄, RuO₄, Aceton/H₂O, Rt; g) KMnO₄, CuSO₄ * 5 H₂O, tBuOH, DCM, H₂O, Rt. *: Literaturbekannt

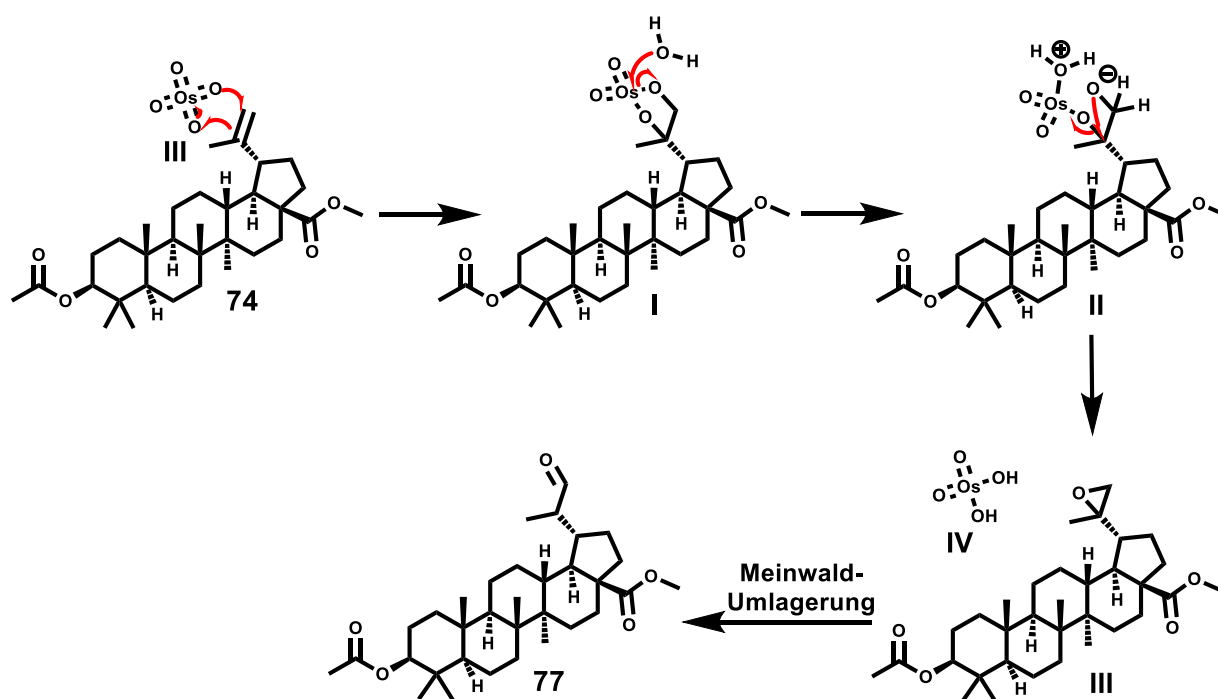
HPLC-MS-Analysen des Rohprodukts zeigten, dass ein signifikanter Anteil des Edukts nicht umgesetzt wurde. Die deutlich unter den Literaturangaben liegende Ausbeute ist auf den unvollständigen Umsatz zurückzuführen und könnte durch Verlängerung der Reaktionszeit potenziell verbessert werden.^[235–237]

Eine moderate Verbesserung wurde durch die Lemieux–Johnson-Oxidation des acetyl-geschützten Methylesters **74** erzielt. In einem Aceton/Wasser-Gemisch wurde die Substanz mit einer stöchiometrischen Mischung aus Natriumperiodat und Ruthenium-tetraoxid oxidiert, wobei das Keton **76** in 44% Ausbeute isoliert wurde.^[234] Trotz eines Überschusses an Oxidationsreagenzien und verlängerter Reaktionsdauer wurde jedoch kein vollständiger Umsatz erreicht.

In einer dritten oxidativen Variation wurde die terminale Doppelbindung der Isopropenylgruppe mittels Upjohn-Dihydroxylierung oxidiert. Nach dem Protokoll von IWASAWA ET AL. wurde eine Lösung von Verbindung **74** und NMO in DCM mit einer 4%igen Osmiumtetroxid-Lösung in Wasser versetzt.^[238] Das Hauptprodukt dieser Reaktion wurde

in 52% Ausbeute isoliert. Charakterisierungsergebnisse zeigten, dass es sich nicht um das erwartete Diol, sondern um den Aldehyd **77** handelt (Schema 7).

Die direkte Oxidation terminaler, geminal disubstituierter Doppelbindungen zu Aldehyden unter Upjohn-Bedingungen ist bisher nicht beschrieben. Eine plausible Reaktionsmechanismushypothese ist, dass Osmiumtetroxid zunächst an die Doppelbindung des Isopropenylrests von Verbindung **74** addiert und ein Osmiumglykol-Intermediat (**I**) bildet.^[239] Anschließend könnte ein Molekül Wasser an das Osmium-Zentrum koordinieren, wodurch die terminale Osmium-Sauerstoffbindung heterolytisch gespalten wird. Das resultierende Enolat **II** könnte intramolekular den α -Kohlenstoff angreifen, wobei das Epoxid **III** und $\text{OsO}_2(\text{OH})_2$ **IV** freigesetzt werden. Das Epoxid **III** könnte anschließend aufgrund der Lewis-Acidität der $\text{OsO}_2(\text{OH})_2$ -Spezies (**IV**) in einer MEINWALD-Umlagerung in den Aldehyd **77** überführt werden.^[240–243] Die Osmium(VI)-Spezies **IV** wird anschließend von NMO wieder zur Osmium(VIII)-Spezies **III** reoxidiert (Schema 8).



Schema 8: Hypothetischer Mechanismus für die Oxidation mit OsO_4 von Verbindung **74** zum Aldehyd **77**.^[240,241,244,245]

Als abschließende strukturelle Modifikation der Betulinsäure wurde die selektive Einführung einer Carboxygruppe an der terminalen Doppelbindung der Isopropylen-Gruppe verfolgt. Hierzu wurde das vollständig geschützte Betulinsäure-Derivat **74** gemäß dem von ALAMDARI ET AL. beschriebenen Verfahren mit Kaliumpermanganat in Gegenwart von Kupfersulfat in einem Lösungsmittelgemisch aus DCM, H_2O und

tBuOH oxidiert.^[246] Nach der Reinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie wurde die resultierende Carbonsäure **78** in einer isolierten Ausbeute von 12% sauber erhalten (Schema 7).^[247]

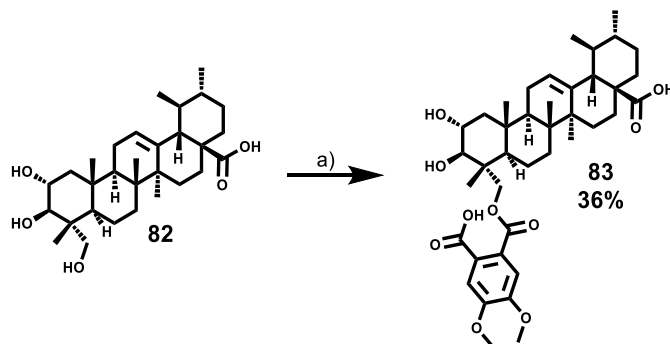
Die anschließende Entschützung der funktionellen Gruppen offenbarte jedoch eine außerordentliche Stabilität des Methylesters gegenüber klassischen Spaltbedingungen. Weder klassische Verfahren mit KOH oder KOtBu noch komplexere Methoden unter Verwendung von 18-Krone-6 führten zu einer messbaren Umsetzung.^[248–250] Lithiumhalogenide wie LiI oder LiBr induzierten zwar einen geringen Umsatz, jedoch unter Bildung zahlreicher Nebenprodukte, wodurch eine Isolierung des Zielmoleküls nicht möglich war.^[251,252] Die saure Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure führte hingegen zur vollständigen Zersetzung des triterpenoiden Grundgerüsts.^[253]

Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde der Ansatz verfolgt, den Methylester durch einen Benzylester zu ersetzen. Dadurch sollte eine spätere Entschützung unter milden, reduktiven Bedingungen – beispielsweise durch Hydrogenolyse – möglich werden. Die Umsetzung von Betulinsäure mit Benzylbromid in Gegenwart von Kaliumcarbonat in DMF lieferte das benzylgeschützte Derivat **79** in exzellenter Ausbeute von 92%.^[254] Die nachfolgende Einführung der Acetylschutzgruppe am sekundären Alkohol in Position 3 zur Verbindung **80** erfolgte ebenfalls effizient mit 90% Ausbeute (Schema 7).^[255]

Trotz der erfolgreichen Schutzgruppeneinführung zeigte der anschließende Oxidationsversuch zur Generierung des Carbonsäure-Derivats **81** unerwartete Schwierigkeiten: Es traten umfangreiche Nebenreaktionen auf, die zu komplexen Produktgemischen führten, sodass eine isolierte, analytisch reine Form der oxidierten Zielverbindung nicht erhalten werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Kombination aus Benzylester- und Acetylschutzgruppen unter den gewählten oxidativen Bedingungen nicht die erforderliche Stabilität für die gezielte Carboxylierung der terminalen Isopropylendoppelbindung aufweist.

3.2.2 Synthese der Derivate des Ursantyps

Ein natürlich vorkommender Vertreter der Ursane ist neben der Ursolsäure (**26**) die Asiatsäure (**82**). Strukturell unterscheidet sich die Asiatsäure von der Ursolsäure durch drei zusätzliche Hydroxygruppen im A-Ring, die die Hydrophilie des Moleküls signifikant erhöhen und damit die Bioverfügbarkeit im Vergleich zur weitgehend unpolaren Ursolsäure verbessern.^[256]



Schema 9: Syntheschema des Dimethoxyphthalat-Asiatsäure-Derivats (**83**). a) 5,6-Dimethoxy-2-benzofuran-1,3-dione, DMAP, Pyridin, 100°C.

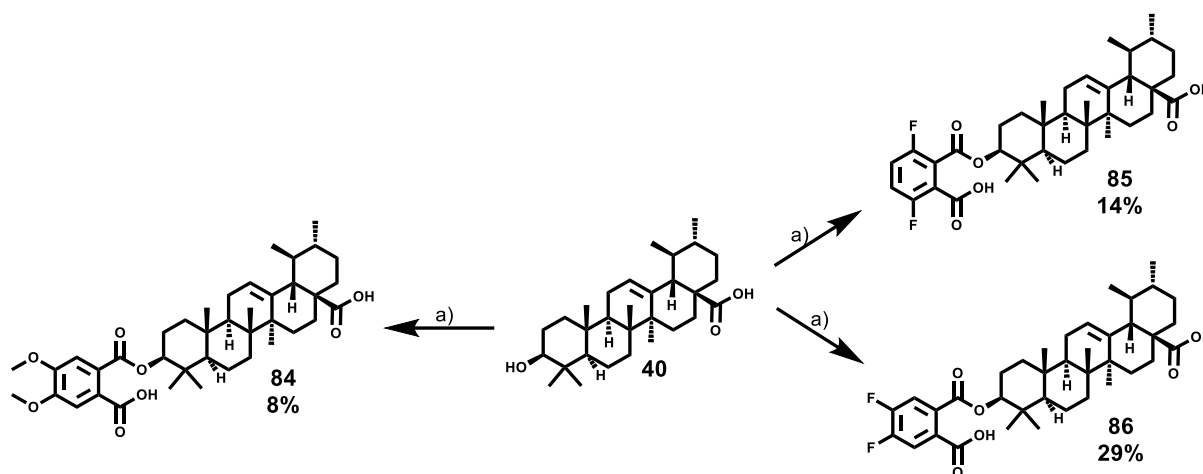
Aufgrund der hohen Kosten kommerziell erhältlicher Asiatsäure (**82**) wurde lediglich deren Dimethoxyester **83** synthetisiert (Schema 9). Die Umsetzung des Triterpens **82** mit 5,6-Dimethoxy-2-benzofuran-1,3-dion in Gegenwart von DMAP führte zur Veresterung des primären Alkohols und lieferte das Produkt **83** in 36% Ausbeute.^[257]

Die vergleichsweise geringe Ausbeute ist auf einen unvollständigen Reaktionsumsatz zurückzuführen, obwohl die Reaktion über mehrere Tage gerührt wurde. HPLC-MS-Analysen des Rohprodukts zeigten zudem das Vorliegen mehrerer Nebenprodukte. Zwei zusätzliche Signale mit identischer Molekularmasse lassen sich mutmaßlich den Veresterungen der beiden sekundären Hydroxygruppen zuordnen, während weitere Signale auf mehrfach substituierte Produkte hinwiesen. Eine Isolierung dieser Nebenprodukte war jedoch nicht möglich.

In Analogie zur Betulinsäure (**38**) wurden gemäß dem Verfahren von KVASNICA ET AL. drei Phthalsäuremonoester der Ursolsäure (**40**) synthetisiert (Schema 10).

Die Umsetzung der Ursolsäure (**40**) mit den jeweiligen substituierten cyclischen Anhydriden in Gegenwart katalytischer Mengen DMAP lieferte das Dimethoxyphthalat-Derivat **84** in 8% Ausbeute. Das 3,6-Difluor-Substitutionsprodukt **85** wurde in 14% und

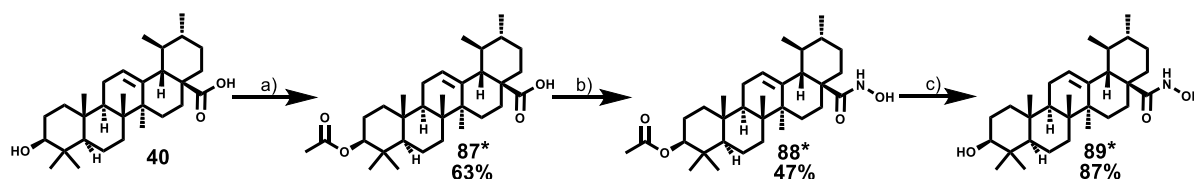
das 4,5-Difluor-Derivat **86** in 29% Ausbeute isoliert. Trotz der unterschiedlichen Ausbeuten sind diese insgesamt als niedrig anzusehen, was auf sterische Hinderung durch die benachbarte Dimethylgruppe zurückgeführt werden kann (Schema 10).



Schema 10: Reaktionsschema zur Synthese verschieden substituierter Phthalat-Derivate der Ursolsäure (**40**). a) substituiertes Phthalsäureanhydrid, DMAP, Pyridin, 100°C.

Die deutlich geringere Ausbeute des Dimethoxyphthalat-Derivats **84** im Vergleich zu **86** lässt sich durch die elektronische Wirkung der Substituenten erklären: Die Methoxygruppen üben einen mesomeren Elektronendoneffekt (+M) aus, der die Elektrophilie des Anhydrids reduziert und den nukleophilen Angriff von DMAP erschwert. Die Fluoratome im 4,5-Difluor-Derivat hingegen induzieren einen stark elektronenziehenden Effekt (-I), erhöhen die Elektrophilie und erleichtern den DMAP-Angriff.

Zur gezielten Modifikation der Polarität der Carbonsäurefunktion in Position 28 und zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde die Carboxygruppe nach dem Verfahren von WIEMANN ET AL. in eine Hydroxamsäure überführt (Schema 11).^[258]



Schema 11: Syntheseroute zur Synthese des Hydroxam-Ursolsäure-Derivats **89**. a) Ac_2O , DIPEA, DMAP, THF, 70 °C; b) CO_2Cl_2 , NEt_3 , HONH_2Cl , DCM, 0 °C → Rt; c) KOH, MeOH, Rt. *: Literaturbekannt

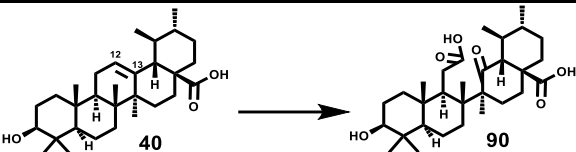
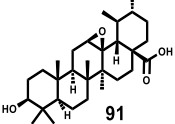
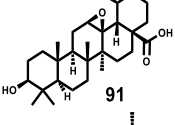
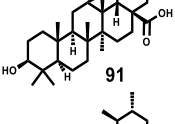
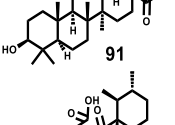
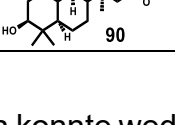
Die Ursolsäure (**40**) wurde zunächst selektiv in Position 3 als Acetat geschützt und in 63% Ausbeute isoliert. Zur Einführung des Hydroxamats wurde die Acetoxyursolsäure (**87**) mit Oxalylchlorid in das entsprechende Säurechlorid überführt. Aufgrund der hohen Hydrolyseempfindlichkeit der Säurechloride erfolgte die Weiterverarbeitung

3. Ergebnisse und Diskussion

ohne Zwischenaufarbeitung: Das Reaktionsgemisch wurde bei 0 °C mit Hydroxylammoniumchlorid versetzt und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Die Acetylgeschützte Hydroxamsäure **88** wurde in 47% Ausbeute erhalten (Schema 11).^[259] Die Abspaltung der Acetylenschutzgruppe mit KOH lieferte das Zielprodukt **89** in 87% Ausbeute.

Mit dem Ziel, weniger starre Ursolsäure-Derivate zu synthetisieren, wurde versucht die interne Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C(12) und C(13) oxidativ zu spalten (Tab. 3).

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für die oxidative Bindungsspaltung der internen Doppelbindung von Ursolsäure (**40**).

		
Reaktionsbedingungen	Zielmolekül	Ergebnis
H ₂ O ₂ , AcOH/THF, 90 °C	 91	Masse wurde in der HPLC-MS gefunden; viele Nebenprodukte; konnte nicht isoliert werden
mCPBA, DCM, 0 °C → Rt	 91	Kein Umsatz
NBS, 1,4-Dioxan, Rt	 91	Kein Umsatz
O ₃ , CycHex, -78 °C	 91	kein Umsatz
KMnO ₄ , CuSO ₄ ·5H ₂ O, DCM/tBuOH/H ₂ O, Rt	 90	Kein Umsatz

Unter den untersuchten Bedingungen konnte weder bei der direkten Oxidation zur Carbonsäure-Keton-Verbindung **90** mittels KMnO₄/CuSO₄ noch bei einer epoxidbasierten, mehrstufigen Synthese unter Einsatz von Ozon, NBS oder mCPBA ein Umsatz des Substrats detektiert werden. Lediglich bei der Epoxidierung mit Wasserstoffperoxid ließ sich die Produktmasse in der HPLC-MS nachweisen; eine Isolierung des Zielprodukts war jedoch aufgrund der Bildung zahlreicher Nebenprodukte nicht möglich

Die geringe Reaktivität der δ -Doppelbindung ist auf die ausgeprägte sterische Abschirmung innerhalb der Ursolsäure (**40**) zurückzuführen. Das Sticks-Modell der Ursolsäure (**40**) veranschaulicht, dass der vordere Halbraum der C(12)-C(13)-Doppelbindung durch die Methylgruppe C(29) blockiert ist, während der hintere Zugang durch C(26)-Methylgruppe und insbesondere durch den Carbonylsauerstoff O(3) eingeschränkt wird (Abb. 21). Diese sterischen Faktoren erschweren den Angriff voluminöser Oxidationsmittel, was die fehlende Umsetzung bei der Oxidation mit NBS bzw. mCPBA plausibel erklärt.

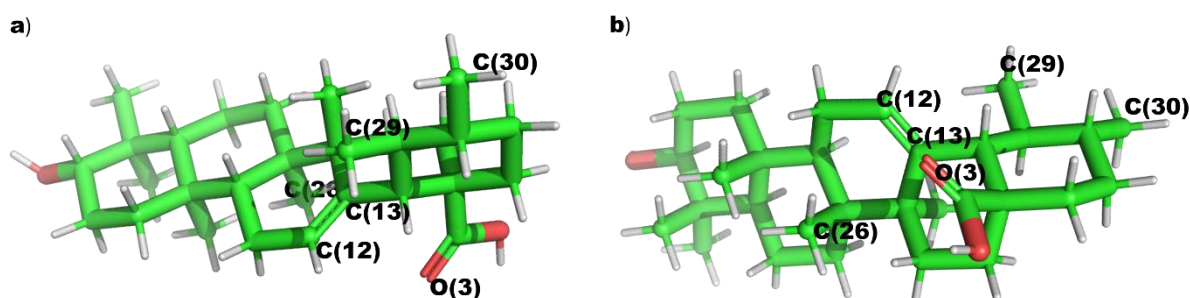


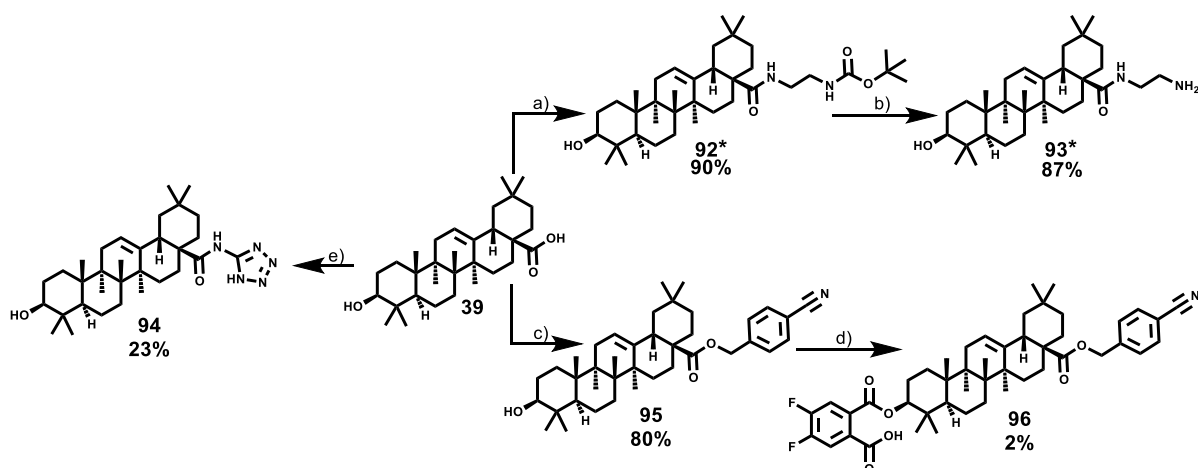
Abbildung 21: Sticks-Modell der Ursolsäure (**40**) mit Sicht auf den vorderen (a) und hinteren Halbraum (b) der internen δ -Doppelbindung.

3.2.3 Synthese der Derivate des Oleantyps

Der am weitesten verbreitete Vertreter der Olean-Triterpene ist die Oleanolsäure (**39**). Zunächst wurde eine gezielte Modifikation der Carboxygruppe in Position 28 durchgeführt (Schema 12).

Zur strukturellen Vergleichbarkeit mit dem bereits synthetisierten Betulinsäure-Derivat **67** wurde Oleanolsäure (**39**) einer HATU-Kupplung mit Boc-Ethylendiamin umgesetzt. Das geschützte Amin **92** wurde in 90% Ausbeute erhalten; nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 4 M HCl in Dioxan wurde das freie Amin **93** in 87% Ausbeute isoliert.

Darüber hinaus wurde ein Tetrazolring als bioisosterer Ersatz der Carboxygruppe eingeführt. Die HATU-Kupplung lieferte das entsprechende Tetrazol-Derivat **94** jedoch lediglich in 23% Ausbeute (Schema 12). Die im Vergleich zur Ethylendiamin-Kupplung deutlich reduzierte Effizienz lässt sich durch die elektronischen Eigenschaften des Tetrazolrings erklären: Der stark elektronenziehende -I-Effekt des Tetrazols verringert die Elektronendichte der Aminogruppe erheblich. Aufgrund dieser Delokalisierung des freien Elektronenpaares in den Ring sinkt die Nukleophilie der Aminogruppe deutlich, was die niedrige Ausbeute plausibel erklärt.^[260–266]



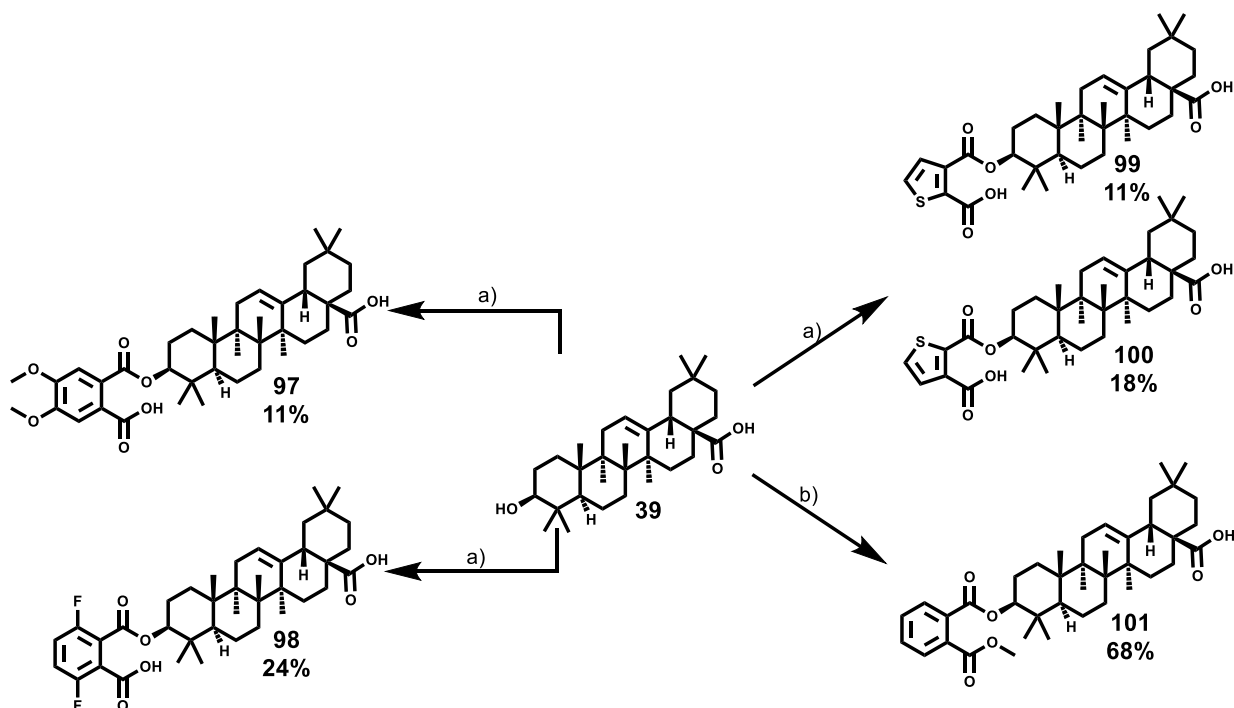
Schema 12: Reaktionsschema für die Synthese der Oleanolsäure-Derivate mit einer Modifikation der Carbonsäurefunktion durch ein terminales Amin (**93**), ein terminales Nitril (**96**) bzw. einem Aminotetrazol (**94**). a) Boc-Ethylen-diamin, HATU, DMAP, DMF, Rt; b) 4 M HCl/Dioxan, Rt; c) 4-Cyanobenzylbromid, K_2CO_3 , DMF, 70 °C; d) 4,5-Difluorophthalsäureanhydrid, DMAP, Pyridin, 130 °C; e) 5-Amino-1H-tetrazol Monohydrat, HATU, DIPEA, DMF, Rt. *: Literaturbekannt

Im Rahmen einer erweiterten Modifikationsstrategie der Carboxygruppe wurde die Einführung eines Tetrazols in größerer Distanz zum triterpenoiden Grundgerüst untersucht. Zusätzlich war eine Funktionalisierung mit einem Difluorphthalatrest vorgesehen. Hierzu wurde zunächst Oleanolsäure (**39**) mit 4-Cyanobenzylbromid in Gegenwart von K_2CO_3 umgesetzt und lieferte den entsprechenden Cyanobenzylester **95** in 80% Ausbeute (Schema 12).

In einem zweiten Schritt wurde das Cyanobenzyl-Derivat **95** nach dem etablierten Protokoll von KVASNICA ET AL. mit 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid umgesetzt. Dadurch sollte der Nitrilrest zunächst als Synthon beibehalten werden.^[257] Unter diesen Bedingungen wurde das gewünschte Produkt **96** jedoch nur in sehr geringer Ausbeute von 2% isoliert. Aufgrund dieses unzureichenden Ergebnisses wurde der geplante Aufbau des Tetrazolrings auf diesem Syntheseweg nicht weiterverfolgt.

Analog zu den Derivaten der Lupan- und Ursanreihe wurde auch im Fall der Oleanolsäure (**39**) die Hydroxygruppe in Position 3 mit verschiedenen substituierten cyclischen Anhydriden nach dem Standardverfahren von KVASNICA ET AL. derivatisiert (Schema 13).^[257]

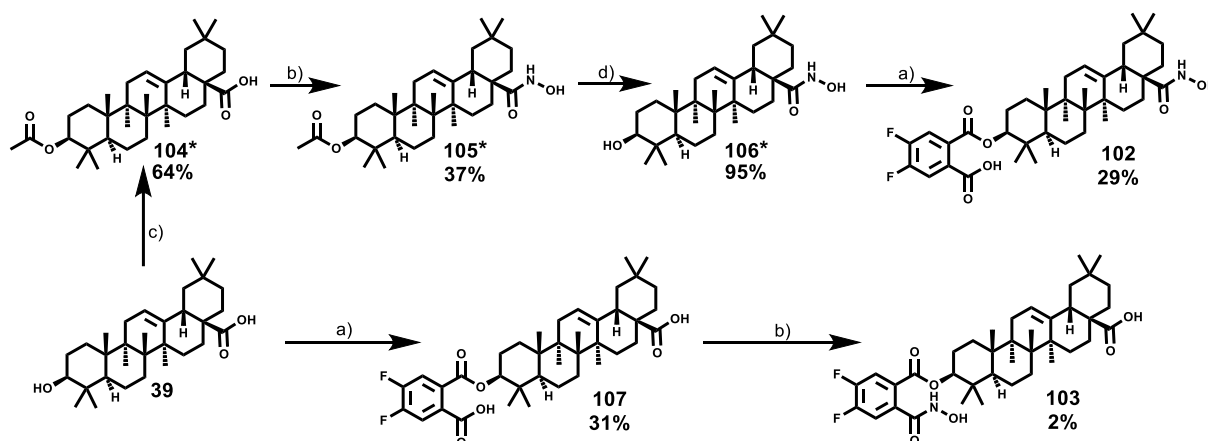
Die Umsetzung von Oleanolsäure (**39**) mit substituierten Phthalsäureanhydriden lieferte die Derivate **97** und **98** in 11% bzw. 24% Ausbeute, während die Regioisomere **99** und **100** in 11% bzw. 18% isoliert wurden.



Schema 13: Syntheschema für die Reaktion verschieden substituierter cyclischer Anhydride mit Oleanolsäure. a) substituiertes cyclisches Anhydrid, DMAP, Pyridin, 100°C; b) 1. 2-(Methoxycarbonyl)benzoesäure, CO_2Cl_2 , DCM, DMF, 0 °C, 2. DMAP, Pyridin, Rt.

Zur Untersuchung des Einflusses der freien Säurefunktion des Phthalsäurerests auf die biologische Aktivität wurde darüber hinaus das methylgeschützte Derivat **101** synthetisiert. Nach einer Vorschrift von TANG ET AL. wurde hierzu zunächst 2-(Methoxycarbonyl)benzoesäure mit Oxalylchlorid in das entsprechende Säurechlorid überführt.^[267] Die direkte Umsetzung mit Oleanolsäure (**39**) in Pyridin lieferte den gewünschten Ester **101** in einer Ausbeute von 68%.

Als weiteres bioisosteres Carbonsäure-Derivat wurden zudem die Hydroxamsäuren **102** und **103** nach dem Verfahren von MINASSI ET AL. dargestellt (Schema 14).^[259] Für die Synthese des Hydroxamsäure-Derivats **102** wurde Oleanolsäure (**39**) im ersten Schritt in 64% Ausbeute Acetyl-geschützt. Nach der Aktivierung der Carboxygruppe mit Oxalylchlorid und der Umsetzung mit Hydroxylammoniumchlorid wurde die Acetyl-geschützte Hydroxamsäure **105** in 37% Ausbeute erhalten. Die anschließende Entschützung ergab den freien Alkohol **106** in 95% Ausbeute, der schließlich unter den etablierten Bedingungen mit 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid zum Hydroxamat **102** in einer Ausbeute von 29% umgesetzt wurde. Die Gesamtausbeute über die vier Stufen betrug 7% (Schema 14).



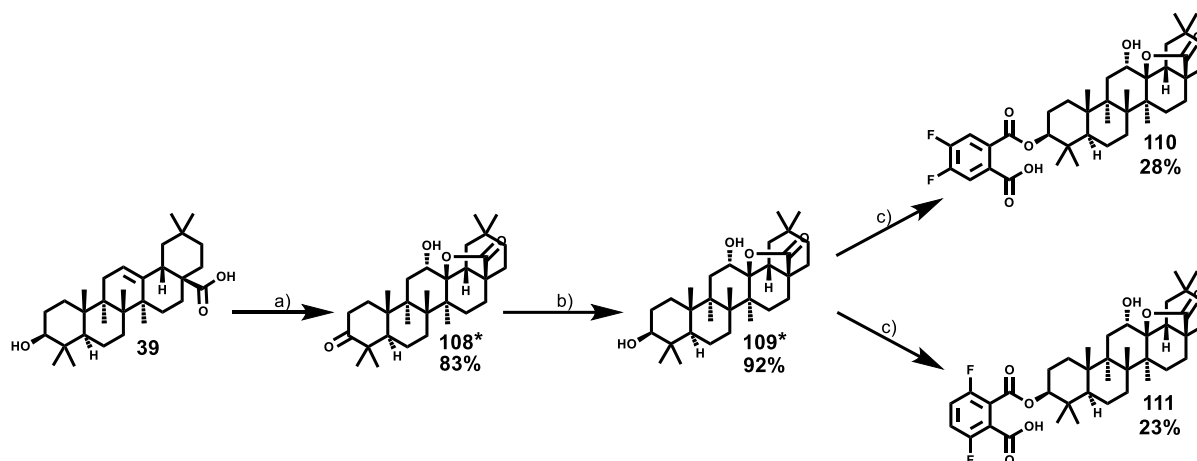
Schema 14: Syntheseroute für die beiden Hydroxam-Oleanolsäure-Derivate **102** und **103**. a) 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid, DMAP, Pyridin, 110 °C; b) 1. CO₂Cl₂, DCM, 0 °C→Rt, 2. NEt₃, HONH₃Cl, DCM, Rt; c) Ac₂O, NEt₃, DMAP, Pyridin, Rt; d) KOH, MeOH, Rt. *: Literaturbekannt

Im Gegensatz dazu wurde das Hydroxamsäure-Derivat **103** über eine verkürzte zweistufige Sequenz synthetisiert: Die Umsetzung von Oleanolsäure (**39**) mit 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid ergab das Zwischenprodukt **107** in 31% Ausbeute. Dessen Umwandlung in das Hydroxamsäure-Derivat **103** mittels der Aktivierung durch Oxalylchlorid und der anschließenden Umsetzung mit Hydroxylammoniumchlorid lieferte das Zielprodukt **103** jedoch in einer niedrigen Ausbeute von 2%.

Als eines von mehreren Nebenprodukten wurde mittels HPLC-MS ein zweifach substituiertes Hydroxamsäure-Derivat identifiziert. Dieses konnte jedoch nicht isoliert werden.

Als abschließende strukturelle Modifikation innerhalb der Klasse der pentacyclischen Triterpene des Oleantyps wurde die Carbonsäurefunktion in einen Lakton überführt, wobei gleichzeitig eine zusätzliche Hydroxygruppe in Position C-12 eingeführt wurde. Diese Transformation erweitert das strukturelle Spektrum der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substitutionsmuster (Schema 15).

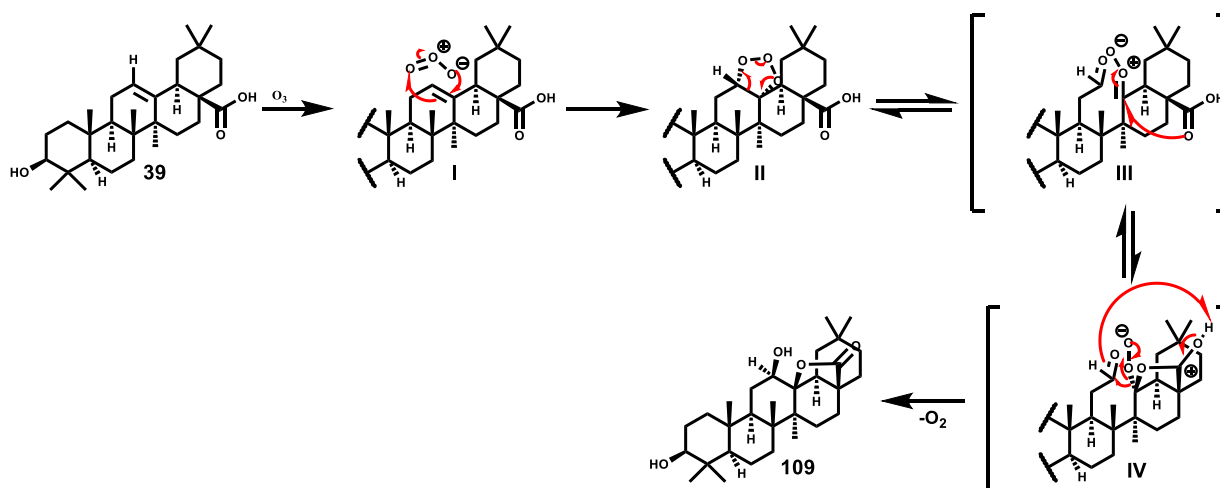
Nach der Literaturvorschrift von KONOIKE ET AL. wurde Oleanolsäure (**39**) in einem MeOH/DCM-Gemisch bei -50 °C mit Ozon umgesetzt und das Keto-Lakton **108** in 83% Ausbeute erhalten.^[268] Da die Hydroxygruppe in Position 3 während der Ozonolyse zum Keton oxidiert wurde, erfolgte eine Reduktion des Zwischenprodukts **108** mit NaBH₄ zum Hydroxy-Lakton **109**, das in 92% Ausbeute isoliert wurde.



Schema 15: Reaktionsschema für die Synthese der beiden Difluorphthalat-Derivate **110** und **111** des Oleanol-Hydroxylaktone **109**. a) O_3 , MeOH, DCM, $-50\text{ }^\circ\text{C}$; b) $NaBH_4$, DCM:MeOH (1:1), $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{Rt}$; c) Difluorphthalsäure Anhydrid, DMAP, Pyridin, $110\text{ }^\circ\text{C}$. *: Literaturbekannt

Die Umsetzung von **109** mit 4,5- bzw. 3,6-Difluorphthalsäureanhydrid unter den etablierten Bedingungen nach KVASNICA ET AL. führte zu den Zielverbindungen **110** in 28% und **111** in 23% Ausbeute, entsprechend einer Gesamtausbeute von 21% bzw. 18% (Schema 15).

Bemerkenswert ist, dass die Ozonolyse im Fall der Oleanolsäure nicht zur vollständigen Spaltung der C=C-Doppelbindung führte, sondern ein strukturell unerwartetes Laktone lieferte. Ein solcher Reaktionsverlauf wurde erstmals 1995 von WATANABE ET AL. für β,γ -ungesättigte Carbonsäuren beschrieben und lässt sich auch auf das sterisch anspruchsvolle Triterpengerüst übertragen (Schema 16).^[269]



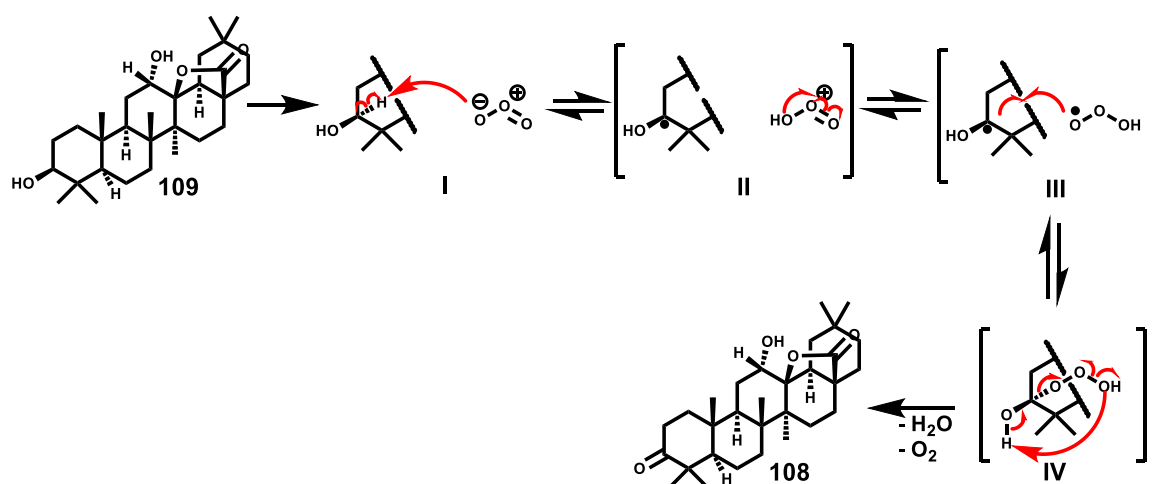
Schema 16: Reaktionsmechanismus für die Laktonebildung mittels Ozonolyse.^[269]

Der Mechanismus der Laktonebildung im Rahmen der Ozonolyse entspricht in den Anfangsschritten der klassischen Spaltung einer C=C-Doppelbindung. Das Ozon addiert

sich in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition an die olefinische Bindung der β,γ -ungesättigten Carbonsäure (**I**), wobei das instabile Primärozonid **II** entsteht. Dieses zerfällt unter C–C-Bindungsspaltung in ein Aldehydfragment und ein reaktives Carbonyloxid (**III**).^[269]

Anstelle der üblichen Bildung eines Sekundärozonids durch erneute 1,3-dipolare Cycloaddition kommt es in diesem Fall zu einem intramolekularen Ringschluss: Der Carbonylsauerstoff des Aldehydfragments greift das elektrophile Kohlenstoffatom des benachbarten Carbonyloxids nukleophil an. Auf diese Weise wird ein fünfgliedriger Laktonring (**IV**) gebildet.^[269]

Eine intramolekulare Protonenverschiebung überträgt anschließend ein Proton der Carbonsäurefunktion auf die Oxycarbenstruktur, was zur Stabilisierung der Laktonform führt. Schließlich resultiert unter Abgabe von molekularem Sauerstoff die Reformation einer C–C-Bindung, sodass das stabile Endprodukt, das Lakton **109**, entsteht (Schema 16).^[269]



Schema 17: Reaktionsmechanismus zur Ausbildung des Ketons **108** während der ozonolytischen Laktonbildung.^[270–273]

Parallel zur Laktonbildung initiiert ein zweites Ozonmolekül die Oxidation der Hydroxygruppe in Position 3 des Triterpens (**I**) (Schema 17). Durch Protonenabstraktion entsteht zunächst ein α -Hydroxy-Radikal (**II**), das über eine intramolekulare Elektronenumlagerung des Hydroperoxonium-Ions in ein hochreaktives Hydrotrioxid-Radikal überführt wird. Dieses reagiert unmittelbar mit dem α -Hydroxy-Radikal unter Bildung der instabilen Zwischenstufe **IV**. Der spontane Zerfall von **IV** unter Abgabe von Wasser und molekularem Sauerstoff führt schließlich zum Keton **108** (Schema 17).^[270–273]

3.3 Biologische Daten

Zur Evaluierung des biologischen Potenzials der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Derivate als potenzielle Inhibitoren des onkogenen KRas4B-Proteins wurden umfassende bioanalytische Untersuchungen durchgeführt. Die experimentellen Studien erfolgten in Kooperation mit der LEAD DISCOVERY CENTER GMBH (Dortmund).

Neben den in Kapitel 3.2 beschriebenen Verbindungen wurde eine Auswahl kommerziell verfügbarer Naturstoffe sowie einige von F. KILGENSTEIN im Vorfeld hergestellter pentacyclischer Triterpen-Derivate in die Analysen einbezogen (Abb. 22).

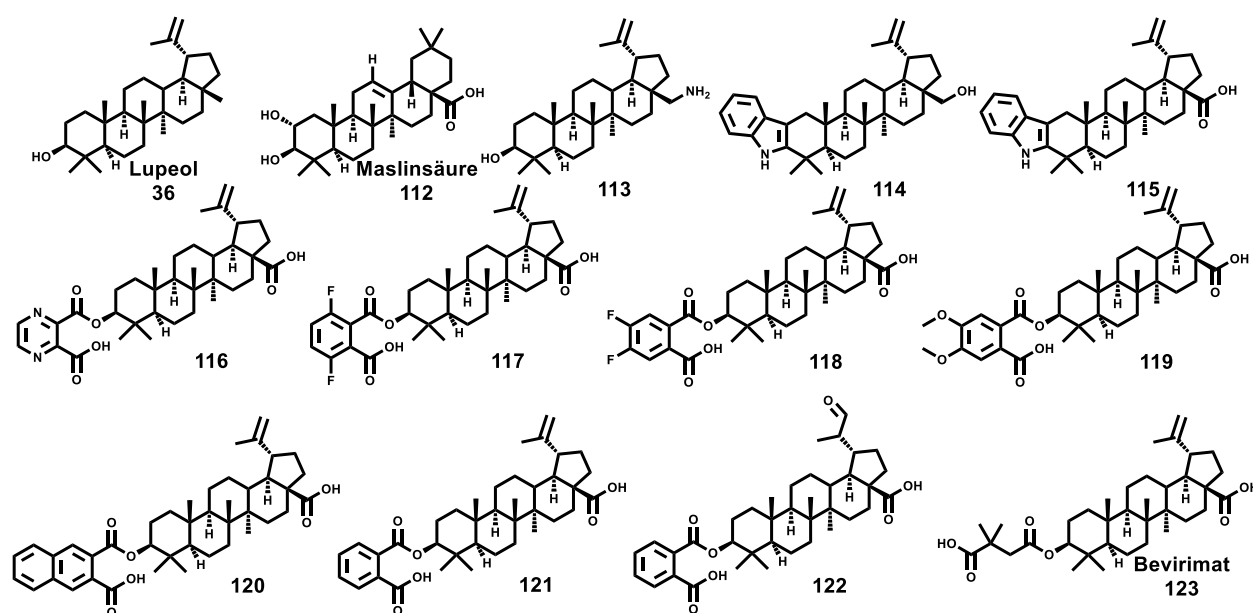


Abbildung 22: Strukturen der kommerziell erworbenen Naturstoffe und Derivate pentacyclischer Triterpene **22**, **112-115**, der im Vorfeld dieser Arbeit von FRANK KILGENSTEIN hergestellten Betulinsäure-Derivate **118-122** sowie des als Referenzverbindung genutzten experimentellen HIV-Wirkstoffs Bevirimat (**123**).

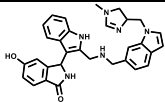
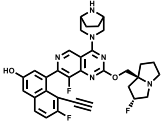
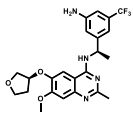
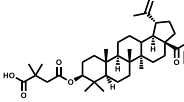
Als primärer Assay diente ein Nukleotid-Austausch-Assay, der die von SOS vermittelte Freisetzung von GDP aus KRas4B quantifiziert. Die Detektion erfolgt hierbei über die ATP-abhängige Luciferase/Luciferin-Reaktion.^[158]

Zur Referenzierung wurden die in Kapitel 1.5 diskutierten KRas4B-Inhibitoren MRTX-1133 (**29**), BI-2852 (**24**) sowie der SOS-Inhibitor BI-3406 (**32**) herangezogen. MRTX-1133 (**29**) bindet selektiv an die SII-Bindestelle und inhibiert die KRas4B-SOS-Interaktion im niedrigen nanomolaren Bereich. BI-2852 (**24**), ein Ligand der SI/II-Bindestelle, zeigt hingegen lediglich eine moderate Inhibition im mikromolaren Bereich, was charakteristisch für diese Region ist. BI-3406 (**32**) blockiert durch Bindung an SOS die Bildung des KRas4B:SOS-Komplexes und verhindert so den GDP/GTP-Austausch. In allen Fällen verbleibt KRas4B im inaktiven GDP-gebundenen Zustand.^[154,161]

3. Ergebnisse und Diskussion

Darüber hinaus wurde Bevirimat (**123**), ein auf der Betulinsäure-Struktur basierender, ursprünglich als HIV-Therapeutikum entwickelter Wirkstoff (MYRIAD PHARMACEUTICALS), als weitere Referenzverbindung untersucht (Tab. 4).^[274] Die Untersuchung bereits bekannter Wirkstoffe in neuen Indikationen („*Drug Repurposing*“) stellt einen etablierten Ansatz in der Arzneistoffentwicklung dar, da für diese Substanzen in der Regel bereits umfassende pharmakologische und toxikologische Daten vorliegen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der mRNA-Impfstoff BNT162b2 gegen SARS-CoV-2 (BioNTech SE), der ursprünglich im onkologischen Kontext als Tumorstoff entwickelt wurde.^[275,276]

Tabelle 4: Biologische Daten für die Referenzverbindungen des Nukleotidaustauschs durch die bereits bekannten KRas4B-Inhibitoren MRTX-1133 (**29**) und BI-2852 (**24**), den SOS-Binder BI-3406 (**32**) sowie dem HIV-Wirkstoff Bevirimat (**123**).

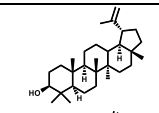
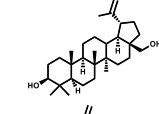
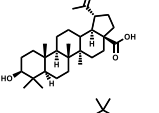
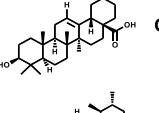
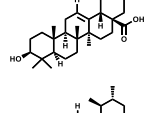
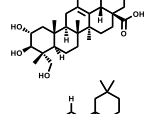
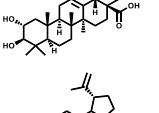
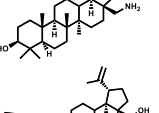
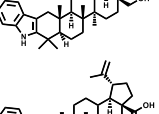
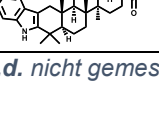
Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [μM]	G12D IC ₅₀ [μM]	G12V IC ₅₀ [μM]
 BI-2852 24	13.4 ± 2.1	13.7 ± 5.1	10.9 ± 0.6
 MRTX-1133 29	<0.3	<0.03	<0.03
 BI-3406 32	0.13 ± 0.08	<0.03	<0.03
 Bevirimat 123	2.15 ± 0.17	0.59 ± 0.19	0.61 ± 0.14

Die Resultate bestätigen, dass MRTX-1133 (**29**) auch unter den hier etablierten Assaybedingungen eine ausgeprägte Inhibitionswirkung entfaltet, wenngleich die Aussagekraft durch die untere Nachweisgrenze der eingesetzten Konzentrationen eingeschränkt ist. Die Referenzverbindung BI-2852 (**24**, BOEHRINGER INGELHEIM) zeigte eine geringere, jedoch reproduzierbare Wirksamkeit im unteren zweistelligen mikromolaren Bereich, ohne selektive Affinität zu spezifischen KRas4B-Mutationen. Demgegenüber inhibiert der SOS-Binder BI-3406 (**32**) den GDP/GTP-Austausch signifikant stärker und weist, wie von HOFMANN ET AL. publiziert, eine Selektivität für mutierte KRas4B-Varianten auf.^[165]

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung der sieben Naturstoffe des Lupan-, Ursan- und Oleanotyps (**36-40**, **82** und **112**) ergab hingegen, dass keine dieser Verbindungen eine relevante Hemmung des GDP/GTP-Austausches bewirkt – weder beim Wildtyp noch bei der häufig auftretenden G12D-Variante. Vergleichbare Resultate wurden für die schwerer zu adressierende G12V-Mutante erhalten. Letztere stellt eine besondere Herausforderung dar, da Valin im Gegensatz zu Aspartat oder Cystein eine hydrophobe, chemisch wenig reaktive Seitenkette trägt, sodass kein Angriffspunkt für Inhibitoren verfügbar ist. Zudem stabilisiert Val12 die GTP-gebundene Form des Proteins, wodurch KRas länger im aktiven Zustand verweilt und die Hemmung des GDP/GTP-Austausches zusätzlich erschwert wird.^[143,277]

Tabelle 5: Ergebnisse des GDP/GTP-Austauschs für die pentacyclischen Triterpen-Naturstoffe 36-40, 82 und 112 sowie der drei kommerziell erworbenen Derivate 113-115.

Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [μM]	G12D IC ₅₀ [μM]	G12V IC ₅₀ [μM]
 Lupeol 36	>30	>30	n.d.
 Betulin 37	189 ± 23.3	>300	128*
 Betulininsäure 38	>1500	628 ± 320	>1500
 Oleanolsäure 39	>30	>30	75.7*
 Ursolsäure 40	>3000	>3000	n.d.
 Asiatsäure 82	542 ± 32.7	537 ± 51.8	n.d.
 Maslinsäure 112	494 ± 116	480 ± 97.1	n.d.
 113	>30	>30	24.7*
 114	>300	>300	n.d.
 115	>3000	>3000	881 ± 150

*n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung*

Auch wenn Betulin (**37**; $IC_{50} = 128 \mu M$) und Oleanolsäure (**39**; $IC_{50} = 75.7 \mu M$) messbare Aktivitäten gegenüber KRas4B^{G12V} zeigten, liegen diese Werte dennoch im als unwirksam einzustufenden Konzentrationsbereich. Diese Befunde deuten auf ein grundsätzliches, wenn auch bislang gering ausgeprägtes inhibitorisches Potenzial pentacyclischer Triterpene hin, das durch gezielte Modifikationen möglicherweise gesteigert werden kann (Tab. 5).

Bei den drei kommerziell erworbenen Derivaten des Lupantyps (**113-115**) ließ sich kein inhibitorischer Effekt gegen den Wildtyp oder die G12D-Variante feststellen; die Indol-Derivate erwiesen sich auch gegen G12V als inaktiv. Dagegen zeigte das Aminobetulin-Derivat **113** mit einem IC_{50} von $24.7 \mu M$ eine schwache Wirksamkeit gegen KRas4B^{G12V} (Tab. 5). Bemerkenswerterweise führte bereits der Austausch der Hydroxyfunktion in Position 28 durch eine primäre Aminogruppe zu einer etwa fünffachen Steigerung der Aktivität. Dies legt nahe, dass eine Erhöhung der Polarität in dieser Position die Interaktion mit der G12V-Mutante begünstigen könnte – eine Beobachtung, die allerdings vorerst auf diese Mutationsvariante beschränkt bleibt.

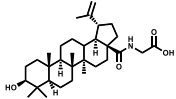
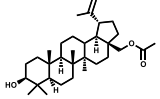
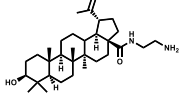
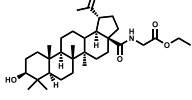
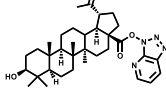
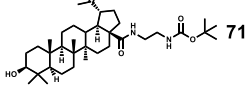
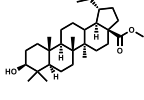
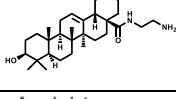
Die Modifikation der Hydroxyfunktion in Position 28 durch Einführung einer Acetyl-schutzgruppe (**57**) sowie die Methylierung der Carboxygruppe (**72**) führte zu einer deutlichen Abnahme der inhibitorischen Aktivität gegenüber der G12D-Mutante. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass sowohl die primäre Hydroxygruppe als auch die Carboxyfunktion an Position 28 maßgeblich zur beobachteten biologischen Wirkung beitragen.

Vor diesem Hintergrund wurden das Glycin-Derivat **70** sowie die Ethylendiamin-Derivate **67** und **93** synthetisiert. Die biologische Evaluierung offenbarte jedoch, dass insbesondere das Glycin-Derivat – sowohl in der geschützten Form **68** als auch nach Entschützung zu Verbindung **70** – im GDP/GTP-Austauschassay keinerlei inhibitorische Aktivität entfaltet (Tab. 6).

Die beiden Ethylendiamin-Derivate **67** und **93** sind trotz messbarer Aktivität im Vergleich zu Verbindung **70** ebenfalls als weitgehend unwirksam einzustufen. Zwar konnte durch die Einführung der Ethylendiaminfunktion eine Verbesserung um den Faktor 7 bzw. 11 erreicht werden, mit IC_{50} -Werten von $142 \pm 68.3 \mu M$ (**67**) beziehungsweise $89.3 \pm 49.4 \mu M$ verbleiben die Verbindungen jedoch im inaktiven Konzentrationsbereich (Tab. 6).

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Ergebnisse des Nukleotid-Austauschassays für Derivate des Lupan-Typs mit einer Modifikation der Carbonsäure bzw. des primären Alkohols in Position 28.

Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [μM]	G12D IC ₅₀ [μM]
 70	n.d.	1009*
 57	n.d.	775*
 67	284 ± 121	142 ± 68.3
 68	>3000	>3000
 69	654 ± 91.6	649 ± 2.23
 71	>3000	1684 ± 179
 72	n.d.	338*
 93	179*	89.3 ± 49.4

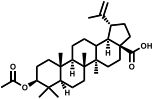
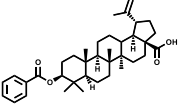
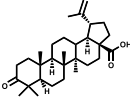
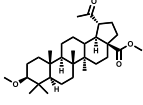
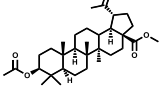
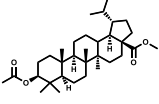
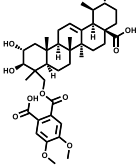
n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung

Dagegen führte die Kupplung eines Dimethoxyphthalat-Substituenten an die primäre Hydroxygruppe der Asiatsäure (**83**) zu einer signifikanten Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der G12D-Variante. Im Vergleich zur unsubstituierten Asiatsäure (**82**) wurde eine etwa sechsfach erhöhte Wirkung erzielt (Tab. 7).

Die Oxidation der sekundären Hydroxygruppe der Betulinsäure zur entsprechenden Ketoverbindung (**66**) führte zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität im GDP/GTP-Austausch-Assay. Gleiches gilt für die Einführung von Acetyl- (**63**) bzw. Benzoyl-Schutzgruppen (**64**) an derselben Position, sodass eine unpolare Modifikation des sekundären Alkohols konsequent mit biologischer Wirkungslosigkeit verknüpft ist.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7 Biologische Daten für die Inhibition des GDP/GTP-Austauschs durch Derivate mit einer Modifikation der Hydroxygruppe in Position 3 und den Verbindungen 75-77 mit einer Modifikation der Isopropenylgruppe.

Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [μM]	G12D IC ₅₀ [μM]
 63	>1500	>1500
 64	n.d.	464*
 66	n.d.	>750
 75	>30	>30
 76	>30	30
 77	>300	>300
 83	76.2 ± 27.9	92.9 ± 22.4

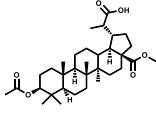
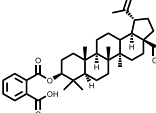
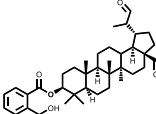
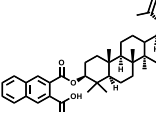
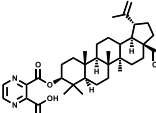
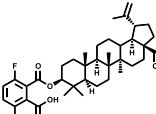
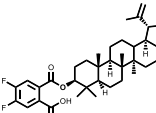
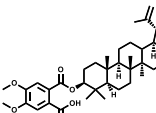
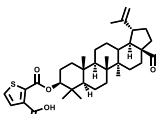
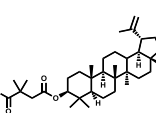
n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung

Auch die durch Oxidation der 19-Isopropylengruppe erhaltenen Platansäure-Derivate **75** und **76** sowie die Aldehydverbindung **77** zeigten keinerlei Aktivität (Tab. 7). Der Monophthalsäureester **122** erwies sich mit einem IC₅₀-Wert von 48.6 ± 17.8 μM als etwa fünfmal weniger wirksam als die Ausgangsverbindung **121** (Tab. 8), was darauf hinweist, dass eine Aldehydfunktion keinen adäquaten Ersatz für die Isopropenylgruppe darstellt.

Dagegen führte die Oxidation derselben Gruppe zur Carbonsäure **78** zu einem Aktivitätsniveau vergleichbar mit Verbindung **121** (IC₅₀ = 13.8 ± 4.20 μM), obwohl die 3-Hydroxy- und 17-Carboxygruppe vollständig geschützt waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen die enge strukturelle Limitierung der SAR von Betulinsäure. Bemerkenswert ist zudem, dass Verbindung **78** neben der guten Wirkung gegen KRas^{G12D} auch gegenüber der G12V-Variante eine vergleichbar gute Aktivität zeigt (IC₅₀ = 13.8 μM).

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: GDP/GTP-Austausch-Daten für eine Reihe an Derivaten des Lupan-Typs mit Modifikationen des sekundären Alkohols sowie der Isopropenyl-Einheit.

Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [μM]	G12D IC ₅₀ [μM]	G12V IC ₅₀ [μM]
 78	72.96*	13.8 ± 4.20	9.95*
 121	34.6*	10.4 ± 4.70	16.7*
 122	42.7 ± 26.2	48.6 ± 17.8	51.2 ± 10.7
 120	>3000	>3000	n.d.
 116	23.3 ± 14.9	11.9 ± 1.33	9.61 ± 6.61
 117	15.3 ± 1.39	8.63 ± 4.6	15.4*
 118	22.4 ± 23.6	11.0 ± 10.4	9.79 ± 4.82
 119	390 ± 181	36.1 ± 14.7	26.04*
 65	1.27 ± 0.69	1.83 ± 1.45	n.d.
 Bevirimat 123	2.15 ± 0.17	0.59 ± 0.19	0.61 ± 0.14

n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung

In einem weiteren Schritt wurden diverse Phthalsäure-Monoester evaluiert. Der Austausch der Phthalsäure in **121** durch 2,3-Naphthalsäure (**120**) führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Auch der 4,5-Dimethoxyphthalatester **119** zeigte lediglich eine schwache Hemmung sowohl der G12D- als auch der G12V-Mutante. Demgegenüber

führte der Austausch des Phenylrings gegen die elektronenarme Pyrazin-2,3-dicarbon-säure (**116**) sowie die Einführung von Fluorsubstituenten (**117**, **118**) zu Derivaten mit vergleichbarer Aktivität zu Verbindung **121**. Besonders der 3,6-Difluorphthals ureester **117** wies eine leicht verbesserte Inhibition gegenüber KRas4B^{G12D} ($IC_{50} = 8.63 \pm 4.6 \mu M$), jedoch eine um den Faktor 2 reduzierte Wirksamkeit bei der G12V-Mutante auf (Tab. 8).

Hervorzuheben ist das Thiophen-Derivat **65**, das mit einem IC_{50} -Wert von $1.83 \pm 1.45 \mu M$ (KRas^{G12D}) eine etwa fünf-fach gesteigerte Wirksamkeit gegenüber dem Derivat **121** erreichte, allerdings vollständig auf Kosten der Selektivität. Den stärksten Effekt zeigte Bevirimat (**123**), das sowohl KRas4B^{G12D} ($IC_{50} = 0.59 \pm 0.19 \mu M$) als auch KRas4B^{G12V} ($IC_{50} = 0.61 \pm 0.14 \mu M$) potent im sub-mikromolaren Bereich inhibierte, bei gleichzeitig 3-4-fach erh ohter Selektivität gegenüber KRas4B^{WT} ($IC_{50} = 2.15 \pm 0.17 \mu M$) (Tab. 8). Diese Befunde verdeutlichen, dass Modifikationen in Position 3 der Betulinsäure das Potenzial für nanomolare Inhibitoren des GDP/GTP-Austauschs bergen – ein besonders relevanter Aspekt im Hinblick auf die schwer adressierbare G12V-Mutante mit ihrer unreaktiven Valin-Seitenkette.

Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurden die Untersuchungen auf strukturell verwandte pentacyclische Triterpene wie Betulin, Oleanolsäure und Ursolsäure ausgeweitet. Auch hier ergaben sich vergleichbare SAR-Trends wie für die Betulinsäure (Tab. 9 & 10). Zur direkten Vergleichbarkeit der Grundgerüste wurden zunächst Monophthalatester der Ursolsäure und Oleanolsäure synthetisiert (Tab. 9).

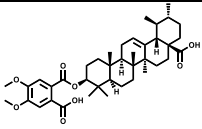
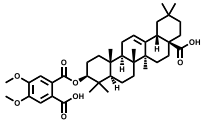
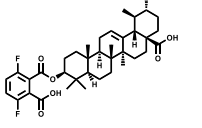
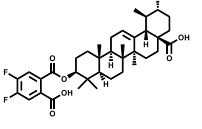
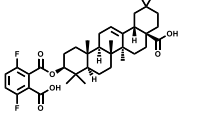
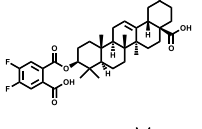
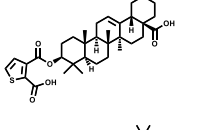
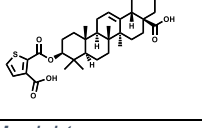
Bemerkenswerterweise zeigte das Dimethoxyphthalat-Derivat der Ursolsäure (**84**) mit einem IC_{50} -Wert von $55.6 \pm 6.60 \mu M$ eine 34.5-fach geringere Wirksamkeit gegenüber KRas4B^{G12D} als das entsprechende Oleanolsäure-Derivat **97** ($IC_{50} = 1.61 \pm 0.85 \mu M$). Diese deutliche Wirkungssteigerung ist insofern bemerkenswert, als sich Ursolsäure (**40**) und Oleanolsäure (**39**) strukturell lediglich durch die Position zweier Methylgruppen am E-Ring unterscheiden (Tab. 9).

Die Difluorphthalat-Derivate der Ursol- und Oleanolsäure (**85**, **86**, **98** und **107**) zeigten keinen Unterschied in der Wirksamkeit. Alle vier Verbindungen inhibieren den GDP/GTP-Austausch im unteren einstelligen mikromolaren Bereich, jedoch ohne erkennbare Selektivität gegenüber den verschiedenen KRas4B-Varianten. Besonders

3. Ergebnisse und Diskussion

hervorzuheben ist, dass diese Derivate trotz fehlender Selektivität, die pharmakologisch besonders schwer zu adressierende KRas^{G12V}-Mutante mit konstanten IC₅₀-Werten unter 3 µM hemmen.

Tabelle 9: Biologische Daten für die Inhibierung des GDP/GTP-Austauschs durch eine Reihe an Phthalat- und Thiophen-Derivaten der Ursol- und Oleanolsäure.

Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [µM]	G12D IC ₅₀ [µM]	G12V IC ₅₀ [µM]
 84	53.6 ± 7.30	55.6 ± 6.60	n.d.
 97	2.71 ± 1.30	1.61 ± 0.85	2.90 ± 0.51
 85	3.46 ± 1.94	2.64 ± 1.75	2.52 ± 0.99
 86	3.94 ± 1.02	2.53 ± 0.63	2.15 ± 0.31
 98	1.33*	2.88 ± 0.89	2.51 ± 0.24
 107	1.50*	2.22 ± 0.29	2.71 ± 0.39
 99	4.15*	3.67 ± 0.35	8.12 ± 1.24
 100	1.52*	3.06 ± 0.79	5.62 ± 0.93

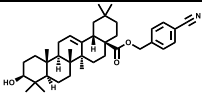
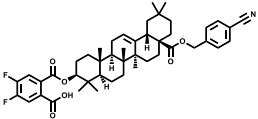
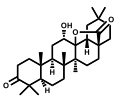
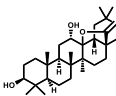
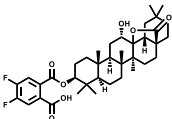
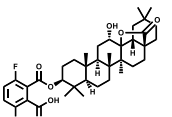
*n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung*

Die beiden Thiophen-Derivate **99** und **100** der Oleanolsäure erwiesen sich mit IC₅₀-Werten von 3.67 ± 0.35 µM (**99**) bzw. 3.06 ± 0.79 µM (**100**) gegenüber KRas^{G12D} sowie 8.12 ± 1.24 µM (**99**) bzw. 5.62 ± 0.93 µM (**100**) gegen die G12V-Variante ebenfalls als wirksam, jedoch ebenso ohne Selektivität zwischen den Mutationsvarianten. Diese Befunde legen nahe, dass der Wirkmechanismus der untersuchten Monophthalatester weitgehend unabhängig von der Substitution in Position 12 des KRas-Proteins verläuft.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Inhibition des GDP/GTP-Austauschs scheint somit nicht direkt durch eine Wechselwirkung mit dem mutierten Rest, sondern vielmehr durch einen konservierten, mutationsunabhängigen Interaktionsmodus vermittelt zu werden.

Tabelle 10: Ergebnisse des Nukleotid-Austausch-Assays für eine Reihe an Difluorphthalat-Derivaten der Oleanolsäure mit Modifikationen der Carboxy-Funktion.

Verbindung	Wildtyp IC ₅₀ [μM]	G12D IC ₅₀ [μM]	G12V IC ₅₀ [μM]
 95	>300	>300	n.d.
 96	18.0 ± 1.94	25.8 ± 10.1	12.8 ± 4.76
 108	173*	238*	n.d.
 109	>300	285	n.d.
 110	7.18*	26.5 ± 5.90	8.57 ± 1.09
 111	10.6*	27.1 ± 4.20	8.70 ± 0.59

*n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung*

Die Modifikation der Carboxygruppe in Position 28 der Oleanolsäure durch Einführung eines Benzonitrils (**95**) resultierte im vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirkung. Erst die zusätzliche Einführung eines Difluorphthalat-Rests am sekundären Alkohol (**96**) ergab eine schwache Hemmung des GDP/GTP-Austauschs mit einem IC₅₀-Wert von 25.8 ± 10.1 μM (G12D) sowie einer um etwa einen Faktor 2 stärkeren Hemmung von G12V. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **107** war die Aktivität damit deutlich reduziert (Tab. 10).

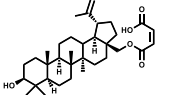
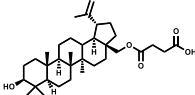
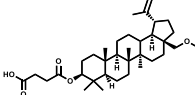
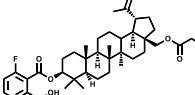
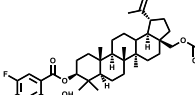
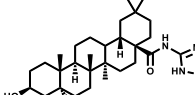
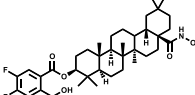
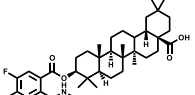
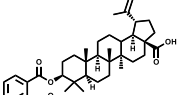
Die Dihydroxylierung der Δ¹²-Doppelbindung und die anschließende Reduktion der 3-Ketogruppe führten zu dem hochstabilen Hydroxylakton (**109**), dass keine inhibitorische Wirkung zeigte. Dieses Ergebnis bestätigt erneut die essenzielle Bedeutung einer freien Carboxygruppe in Position 17 für die biologische Wirksamkeit. In Übereinstimmung damit zeigte auch der daraus abgeleitete 4,5-Difluorphthalsäureester **110**

3. Ergebnisse und Diskussion

($IC_{50}^{G12D} = 26.5 \pm 5.90 \mu M$) nur eine reduzierte Aktivität gegen $KRas^{G12D}$. Jedoch weisen sowohl die Verbindung **110** als auch **111** mit IC_{50} -Werten von $8.57 \pm 1.09 \mu M$ (**110**) bzw. $8.70 \pm 0.59 \mu M$ (**111**) eine potente Hemmung der G12V-Mutante auf (Tab. 10).

Die wirksamsten Inhibitoren innerhalb der Oleanol- und Ursolsäure-Reihe waren erneut die 3-Phthalsäure-Monoester, die konsistent Hemmwerte im niedrig mikromolaren Bereich aufweisen (Tab. 10). Diese Befunde unterstreichen sowohl die zentrale Bedeutung der Carboxyfunktion in Position 28 als auch die Notwendigkeit einer Monophthalat-Substitution in Position 3 für die biologische Aktivität.

Tabelle 11: GDP/GTP-Austausch-Daten für eine Reihe an Betulin-Derivaten mit Modifikationen des primären und sekundären Alkohols sowie einiger Hydroxamsäure- und Tetrazol-Derivate der Oleanolsäure.

Verbindung	Wildtyp $IC_{50} [\mu M]$	G12D $IC_{50} [\mu M]$	G12V $IC_{50} [\mu M]$
 58	69.2 ± 6.80	6.80 ± 2.32	3.19 ± 0.19
 59	14.4 ± 9.91	10.4 ± 0.80	12.7 ± 5.50
 60	1.01 ± 0.31	0.71 ± 0.18	1.37 ± 0.28
 61	2.09 ± 0.59	1.45 ± 0.93	1.26^*
 62	1.18 ± 0.02	0.66 ± 0.13	2.71^*
 94	12.9^*	27.8 ± 2.60	9.18 ± 0.99
 102	4.68^*	7.61 ± 0.70	5.47^*
 103	n.d.	609^*	n.d.
 101	55.7 ± 2.48	67.7 ± 5.61	n.d.

*n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung*

Innerhalb der Betulinreihe gelang es, die Hemmung des GDP/GTP-Austauschs auf ein Niveau zu steigern, das den besten Derivaten der Betulinsäure- sowie der Oleanol- und Ursolsäure-Reihen entspricht. Besonders hervorzuheben ist hierbei das Betulin-Derivat **58**, das gegen die G12V-Mutante eine ausgeprägte Wirksamkeit ($IC_{50} = 3.19 \pm 0.19 \mu M$) in Kombination mit einer außergewöhnlichen Selektivität (Faktor 15-20) gegenüber KRas4B^{WT} aufwies (Tab. 11).

Im Gegensatz dazu führte die Modifikation des primären Alkohols mit Bernsteinsäure (**59**) zu einer deutlich reduzierten, wenngleich weiterhin moderaten Aktivität ($IC_{50}^{G12D} = 10.4 \pm 0.80 \mu M$) sowie dem vollständigen Verlust der Selektivität. Die zusätzliche Einführung einer zweiten Bernsteinsäureeinheit oder eines 4,5-Difluorphthalsäure-Monoesters in Position 3 führte zu den Betulin-Derivaten **60** und **62**, die mit IC_{50} -Werten von $0.71 \pm 0.18 \mu M$ bzw. $0.66 \pm 0.13 \mu M$ potente Inhibitoren der G12D-Mutante darstellen. Neben der nanomolaren Inhibierung von KRas^{G12D}, weisen auch diese Derivate eine gute Hemmung der G12V-Variante ($1.37 \pm 0.28 \mu M$, **60**; $1.26 \mu M$, **61**) auf. Diese ausgeprägte Aktivität ging jedoch ebenfalls mit einem vollständigen Verlust der Selektivität einher (Tab. 11).

Die Substitution der Carboxygruppe in Position 28 durch eine Tetrazolfunktion (**94**) resultierte in einer lediglich schwachen Inhibitionswirkung ($IC_{50}^{G12D} = 27.8 \pm 2.60 \mu M$). Auffällig war dabei eine etwa dreifach stärkere Hemmung sowohl der G12V-Variante als auch des Wildtyps im Vergleich zur G12D-Mutante. Die zentrale Bedeutung einer freien Phthalsäuregruppe wurde zudem durch die vollständige Inaktivität der Hydroxamsäure (**103**) sowie des Diesters (**101**) belegt (Tab. 11).

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass eine Reihe von Betulin-Derivaten potente Hemmungen gegenüber KRas^{G12D} erreichen. Auch wenn diese Verbindungen nicht an die Wirksamkeit des Benchmark-Inhibitors MRTX-1133 (**29**) heranreichen, ist die Beobachtung niedrig mikromolarer Hemmwerte gegen KRas^{G12V} von besonderer Bedeutung. Für diese Mutation existieren bislang nur sehr wenige niedermolekularen Inhibitoren wie MRTX-1133 (**29**) mit vergleichbarer Aktivität. Dies ist auf die hydrophobe und chemisch unreaktive Valin-Seitenkette zurückzuführen ist, die keinen Angriffspunkt bietet und die Ausbildung stabiler Ligand-Protein-Interaktionen erheblich erschwert. Trotz der überwiegend fehlenden Selektivität der Derivate und ihrem damit einhergehenden Wirkprofil als pan-Ras-Inhibitoren ist insbesondere die wirksame Hemmung von KRas^{G12V} als bedeutender Erfolg zu werten.

3. Ergebnisse und Diskussion

Als weiterführendes Testverfahren wurde der CellTiter-Glo® *Luminescent Cell Viability* Assay eingesetzt. Dieser Assay erlaubt über die Quantifizierung intrazellulärer ATP-Konzentrationen eine verlässliche Bestimmung der metabolischen Aktivität und damit der Vitalität der Zellen. Auf diese Weise konnte die Anzahl lebensfähiger Zellen innerhalb einer Zellkultur präzise bestimmt werden.

Tabelle 12: Biologische Daten für die Referenzverbindungen 10, 12 & 15 im CellTiter-Glo Assay (CTG) für die KRas Wildtyp Zelllinie K562, die G12D-mutierte Zelllinie SNU-1, die G12V-Zelllinie NCI-H441 sowie für die Zelllinie mit einer BRAF-Mutation A375 bzw. RKo als IC₅₀-Werte angegeben sowie deren Löslichkeit.

Substanz	CTG K562 (WT) [μM]	CTG SNU-1 (G12D) [μM]	CTG NCI-H441 (G12V) [μM]	CTG A375/RKo (BRAF) [μM]	Löslichkeit [μM]
BI-2852 (24)	>30	>30	>30	>30	114
MRTX-1133 (29)	n.d.	0.01*	n.d.	14.15 ± 0.93	322
BI-3406 (32)	1.44 ± 1.06	32.1 ± 12.7	65.1 ± 13.5	72.6 ± 27.4	n.d.

*n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung*

Bei der Untersuchung der Referenzverbindungen fällt auf, dass deren zelluläre Wirksamkeit im CellTiter-Glo®-Assay teils erheblich von den Ergebnissen des in-vitro-GDP/GTP-Austauschassays abweicht. So zeigte die Benchmark-Verbindung MRTX-1133 (**29**) eine ausgeprägte Wirksamkeit gegenüber der KRas^{G12D}-Zelllinie SNU-1, während ihre Aktivität gegenüber der BRAF-mutierten Zelllinie RKo lediglich moderat ausfiel. Sowohl RKo als auch A375 tragen keine Mutation im KRas-Gen, sondern ausschließlich eine aktivierende BRAF-Mutation. Deshalb ist eine geringe Wirksamkeit von KRas-gerichteten Inhibitoren in diesen Zelllinien erwartungsgemäß – und aus therapeutischer Perspektive wünschenswert, da eine Selektion für KRas-abhängige Signaltransduktion gewährleistet bleibt (Tab. 12).

Demgegenüber zeigte der zweite Referenzinhibitor BI-2852 (**24**) trotz seiner ausgeprägten Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay keinerlei zelluläre Wirksamkeit. Dies ist in zweifacher Hinsicht bemerkenswert: Zum einen wurde für BI-2852 (**24**) eine Hemmung der Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zwischen Ras und seinen Effektorproteinen nachgewiesen.^[155] Zum anderen ist ebenfalls eine Störung der nachgeschalteten pErk-Signalkaskade experimentell belegt – was grundsätzlich auf eine zelluläre Aktivität schließen lässt.^[155]

Der SOS-Inhibitor BI-3406 (**32**) zeigte im CellTiter-Glo®-Assay eine deutliche Selektivität gegenüber der KRas-Wildtyp-Zelllinie, die um den Faktor 22 (G12D) bzw. 45 (G12V) stärker inhibiert wurde als die Zelllinien mit KRas-Mutation (Tab. 12). Dieses

Ergebnis steht in einem klaren Widerspruch zu den Resultaten des Austauschassays, in dem die G12D- und G12V-Varianten die stärkste Hemmung erfuhren (Tab. 4).

Diese Unterschiede unterstreichen die bekannte Limitation des CellTiter-Glo®-Assays. Der CTG-Assay erfasst ausschließlich die metabolische Zellvitalität über die intrazelluläre ATP-Konzentration, jedoch nicht die direkte Modulation des Zielproteins. Zudem sind Fehlbewertungen durch kompensatorische Signalwege oder metabolische Anpassungseffekte dokumentiert.^[278,279] Daher ist der CTG-Assay primär als ergänzender Parameter und nicht als alleinige Referenz zur Bewertung von Ras-Inhibitoren zu interpretieren. Aussagekräftiger sind orthogonale Pathway-Assays (z. B. pErk, pAkt), die die unmittelbaren Effekte auf Ras-abhängige Signaltransduktion quantifizieren.^[280,281]

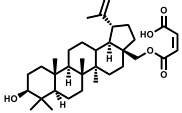
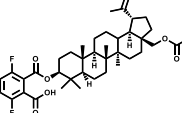
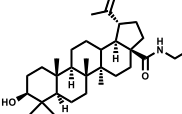
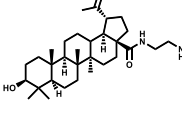
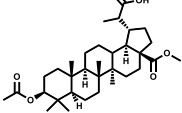
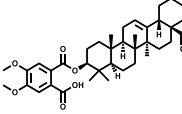
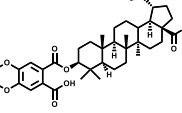
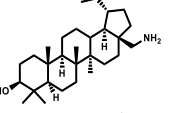
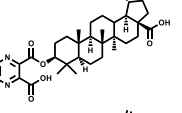
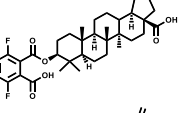
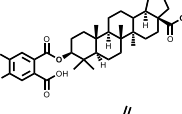
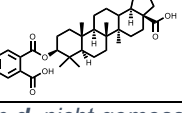
Die Ergebnisse des CellTiter-Glo®-Assays (CTG-Assay) für die Derivate pentacyclischer Triterpene zeigen zunächst, dass die Verbindungen **74** und **113** trotz fehlender Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay eine deutliche zelluläre Wirksamkeit zeigen. Das Ethylendiamin-Derivat **67** weist hierbei eine etwa 23-fach höhere Hemmung der KRas^{WT}-Zelllinie im Vergleich zur KRas^{G12D}-mutierten Zelllinie auf. Das Aminobetulin-Derivat **113** erzielt in beiden Zelllinien Inhibitionswerte im niedrigen mikromolaren Bereich ($IC_{50}^{WT} = 1.65 \pm 0.76 \mu M$; $IC_{50}^{G12D} = 2.06 \pm 0.53 \mu M$). Demgegenüber entfaltet das zweifach geschützte Carbonsäure-Derivat **78** lediglich eine moderate Wirkung gegenüber der SNU-1-Zelllinie (KRas^{G12D}) mit einem IC_{50} -Wert von $15.58 \pm 7.17 \mu M$ (Tab. 13).

Da die Verbindungen **74** und **113** im Austauschassay keinerlei inhibitorische Aktivität zeigen, ist anzunehmen, dass die beobachteten Effekte im CTG-Assay auf Off-Target-Mechanismen zurückzuführen sind. Für den Inhibitor **78** hingegen liegen die Aktivitäten sowohl im Austausch- als auch im CTG-Assay im moderaten Bereich.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei allen übrigen getesteten Verbindungen, dass diese – ungeachtet ihrer teils ausgeprägten Hemmung im Austauschassay – keinerlei Aktivität im CTG-Assay entfalten.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 13: Ergebnisse des CellTiter-Glo Assay (CTG) ausgewählter pentacyclischer Triterpene für die KRas Wild-typ Zelllinie K562, die G12D-mutierte Zelllinie SNU-1, die G12V-Zelllinie NCI-H441 sowie für die Zelllinie mit einer BRAF-Mutation A375 bzw. RKo als IC₅₀-Werte angegeben sowie deren Löslichkeit.

Substanz	CTG K562 (WT) [μM]	CTG SNU-1 (G12D) [μM]	CTG NCI- H441(G12V) [μM]	CTG A375/ RKo (BRAF) [μM]	Löslichkeit [μM]
 58	n.d.	>30	n.d.	>30	n.d.
 61	n.d.	>30	n.d.	>30	416
 67	0.45*	12.04*	n.d.	86.86*	n.d.
 71	82.29 ± 55.42	99.65 ± 20.57	155.26 ± 58.85	60.06 ± 3.08	n.d.
 78	n.d.	15.58 ± 7.17	n.d.	12.41*	n.d.
 97	n.d.	>30	n.d.	>30	302
 119	>30	>30	>30	>30	158
 113	1.65 ± 0.76	2.06 ± 0.53	>3	>3	n.d.
 116	>30	>30	>30	>30	434
 117	>30	>30	>30	>30	378
 118	>30	>30	>30	>30	240
 121	>30	>30	>30	>30	191

*n.d. nicht gemessen; * Einzelmessung*

Da Betulinsäure als Inhibitor des Ras-PI3K-PDK1-Akt-Signalwegs beschrieben ist, wurde zur weiterführenden Charakterisierung des Wirkmechanismus untersucht, wie ausgewählte Betulinsäure-Derivate die quantitative Phosphorylierung zentraler Signaltransduktionsmarker beeinflussen.^[282] Hierzu wurden sowohl die Erk- als auch die Akt-abhängigen Signalwege in KRas^{G12D}-mutierten SNU-1 Zelllinien sowie in A375-Zellen mit KRas^{WT}-Hintergrund analysiert.

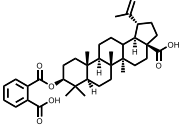
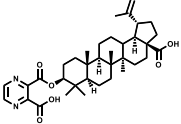
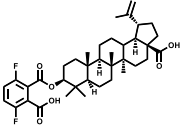
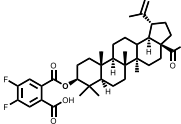
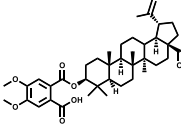
Ziel dieser Untersuchungen war es, zu klären, ob die beobachteten biologischen Effekte primär durch eine Modulation der Ras-Raf-MEK-Erk-Kaskade oder alternativ über den Ras-PI3K-PDK1-Akt-Signalweg vermittelt werden. Die Ergebnisse liefern damit entscheidende Hinweise zur molekularen Wirkweise der untersuchten Triterpen-Derivate und ermöglichen die Eingrenzung potenzieller pharmakologischer Angriffspunkte innerhalb der Ras-vermittelten Signaltransduktion (Tab. 14).

Die untersuchten Derivate pentacyclischer Triterpene zeigten keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk in SNU-1 Zellen (KRas^{G12D}), wohingegen sie eine konzentrationsabhängige Inhibition der Akt-Phosphorylierung mit IC₅₀-Werten im unteren zweistelligen mikromolaren Bereich aufweisen. Diese Befunde stehen im Einklang mit zuvor publizierten Befunden.^[282,283] In der bekannten Signalwegarchitektur der KRas^{G12D}-Mutation kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Ras-PI3K-PDK1-Akt-Signalwegs, während die Raf-MEK-Erk-Aktivierung in diesem Zellkontext nicht beeinflusst wird.^[156,278–281,284] Eine Hemmung des Erk-Wegs war daher nicht zu erwarten, wohingegen die beobachtete Inhibition des Akt-Signalwegs den Eingriff in die Ras-abhängige Signalweiterleitung widerspiegelt.

Bemerkenswert ist die selektive Wirksamkeit der Derivate gegen die KRas^{G12D}-mutierten SNU-1-Zellen, während in A375-Zellen (BRAF-mutiert, KRas^{WT}) keine Inhibition der Akt- oder Erk-Phosphorylierung detektiert wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Triterpen-Derivate nicht nur den GDP/GTP-Austausch an KRas4B *in vitro* inhibieren, sondern darüber hinaus die nachgeschaltete Signaltransduktion entlang der Ras-PI3K-PDK1-Akt-Achse in KRas^{G12D}-mutierten Zellen unterbrechen können (vgl. Abb. 7; Kapitel 1.4).

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Hemmung (IC_{50} [μM]) der Erk- und Akt-Phosphorylierungskaskade durch ausgewählte Derivate der Betulinsäure.

Substanz	SNU-1 pErk	SNU-1 pAkt	A375 pErk	A375 pAkt
 121	>300	83.7*	>1000	>1000
 116	>1000	61.7*	>1000	>1000
 117	134.6*	13.0*	>1000	>1000
 118	>300	18.2*	>1000	>1000
 119	>300	19.1*	>1000	>1000

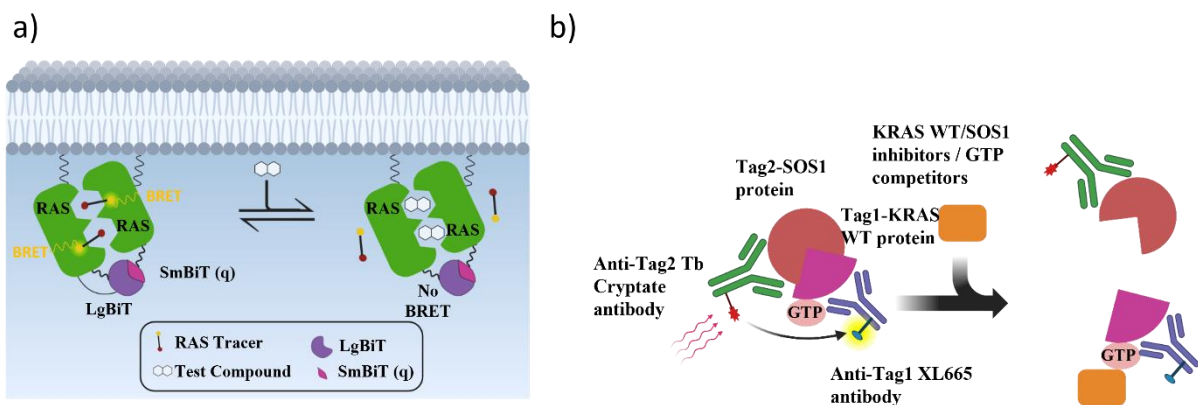
* Einzelmessung

Der erstmalige Nachweis pentacyclischer Triterpene als potente KRas-Inhibitoren in *in vitro*-Modellen kombiniert mit ihrer selektiven Beeinflussung aktiver Ras-Signalwege in KRas^{G12D}-mutierten Zellen markiert damit die Etablierung einer neuen Substanzklasse mit substanziellem Potenzial für die gezielte Inhibierung KRas-gesteuerter Tumorerkrankungen.

Obgleich diese Befunde konsistent erscheinen, erlauben die vorliegenden Daten keine eindeutigen Rückschlüsse auf den exakten molekularen Wirkmechanismus. Weder die Resultate des GDP/GTP-Austauschassays noch die Analysen der Erk- und Akt-Phosphorylierung gestatten eine klare Zuordnung der Zielstruktur innerhalb des Ras-Signalnetzwerks. Theoretisch kann die Hemmung des Nukleotidaustauschs sowohl durch direkte Interaktion mit KRas4B, durch Bindung an den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS, als auch durch Stabilisierung bzw. Disruption eines KRas4B:SOS-Komplexes vermittelt sein. Von besonderem pharmakologischem Interesse sind Inhibitoren, die KRas4B oder den KRas4B:SOS-Komplex mit niedrigen mikromolaren bis nanomolaren IC_{50} -Werten adressieren, da sie ein hohes Potenzial für die selektive Modulation pathologischer Ras-Signalwege aufweisen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Zur weiterführenden Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus wurden ergänzende funktionelle Assays mit ausgewählten GDP/GTP-Austauschinhibitoren durchgeführt (Tab. 15). Als erstes Testsystem wurde ein *Target-Engagement*-Assay auf Basis des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers (BRET) eingesetzt, der die Bindung eines Liganden an den Protein-Komplex detektiert (Abb. 23a). Der BRET-Effekt beruht auf einem Energietransfer zwischen einem Luciferase-markierten Fusionsprotein (Donor) und einem zellgängigen, fluoreszenzmarkierten Tracer (Akzeptor). In diesem System dient der fluoreszente Tracer als Reporter für die Bindung an die SI/SII-Tasche von KRas, wobei die Verdrängung des bekannten Inhibitors BI-2852 (**24**) untersucht wurde. Eine verminderte BRET-Signalintensität weist auf eine erfolgreiche Konkurrenzbindung durch den getesteten Inhibitor hin.



Created in <https://BioRender.com>

Abbildung 23: Darstellung des zellulären Ras-Target-Engagement- sowie Ras:SOS-Protein-Protein-Interaktionsassays; entnommen aus BENARY ET AL..^[285] a) **NanoBRET-basierter Target-Engagement (TE)-Assay:** Bei intrazellulärer Interaktion der Fusionsproteine LgBiT-Ras und SmBiT(q)-Ras wird eine funktionelle Luciferase gebildet, die als BRET-Donor fungiert. Der korrespondierende BRET-Akzeptor ist ein fluoreszierender NanoBRET®-Tracer, der selektiv an KRas bindet. KRas-Binder verdrängen den Tracer in konzentrationsabhängiger Weise, was zu einer Reduktion des BRET-Signals führt. b) **KRAS^{WT}:SOS Protein-Protein-Interaktionsassay:** In Abwesenheit eines Inhibitors bindet (GTP-beladenes) KRas^{WT} an SOS, wodurch beide markierten Zielstrukturen für die jeweiligen Detektionsreagenzien zugänglich bleiben und ein HTRF-Signal generiert wird. Die Zugabe von Inhibitoren gegen KRas oder SOS, ebenso wie von GTP-Konkurrenten, führt zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung des HTRF-Signals.^[285]

In einem zweiten Testsystem wurde die Interaktion von (GTP-beladenem) KRas4B^{WT} mit SOS mittels eines *homogeneous time-resolved fluorescence* (HTRF)-Assays quantifiziert (Abb. 23b). Hierbei fungiert ein mit Terbium-Cryptat markierter SOS-spezifischer Antikörper als HTRF-Donor, während ein KRas4B^{WT}-spezifischer Antikörper mit dem HTRF-Akzeptor XL665 konjugiert ist. Die Bildung des (GTP)KRas4B^{WT}:SOS-Komplexes führt zur Donoranregung und in der Folge zu einem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) mit einer Emission bei 665 nm. Inhibitoren, die KRas4B

oder SOS adressieren und damit die Dissoziation des KRas4B:SOS-Komplexes induzieren, verursachen eine konzentrationsabhängige Abnahme des HTRF-Signals.

Wie erwartet zeigte der SOS-Binder BI-3406 (**32**) im NanoBRET-Assay keinerlei Wirkung. Dagegen konnte der hochaffine S II-Binder MRTX-1133 (**29**) den Referenzinhibitor BI-2852 (**24**) mit nanomolarer Dissoziationskonstante (K_D) aus der S I/II Bindetasche verdrängen (Tab. 15). Obwohl MRTX-1133 (**29**) nicht in dieselbe Bindetasche wie BI-2852 (**24**) bindet, ist eine Verdrängung dieses Liganden möglich. Der Grund dafür ist eine allosterische Bindung zwischen der S II und der S I/II Bindetasche. Durch die Bindung von MRTX-1133 (**29**) in die S II Tasche kommt es zu einer Konformationsänderung in der S I/II Bindestelle.^[286,287] Dies führte zu einer deutlichen Reduktion der Bindungsaffinität von BI-2852 (**24**) und letztlich zur Dissoziation des Liganden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung allosterischer Effekte innerhalb der funktionellen Domänen von KRas4B und verdeutlicht die hohe strukturelle Plastizität der SI/SII-Bindestelle.

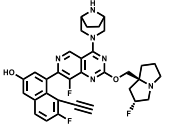
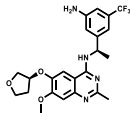
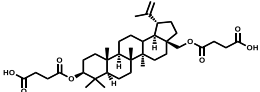
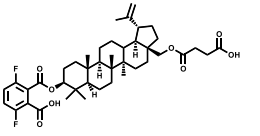
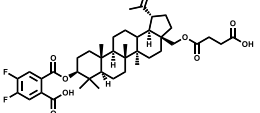
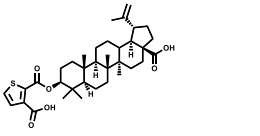
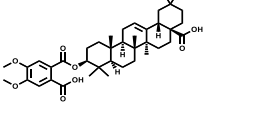
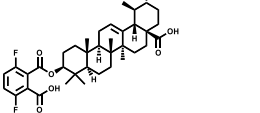
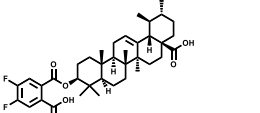
Im Gegensatz hierzu zeigten die im GDP/GTP-Austauschassay besonders aktiven Inhibitoren **60**, **62**, **85** und **97** lediglich bei deutlich erhöhten Konzentrationen eine partielle Verdrängung von BI-2852 (**24**) aus der SI/SII-Bindestelle im NanoBRET-Assay (Tab. 15). Eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit aufgrund ihrer Löslichkeit als Ursache für die reduzierte Aktivität erscheint unwahrscheinlich, da die untersuchten pentacyclischen Triterpene im Vergleich zu BI-2852 (**24**) eine höhere Löslichkeit aufweisen.

Diese Beobachtungen lassen vielmehr den Schluss zu, dass die Monophthalat-Substituenten nicht in direkter Konkurrenz zur SI/SII-Bindestelle treten, sondern eine alternative Bindetasche adressieren. Ein derartiger alternativer Bindungsmodus deutet auf fundamentale Unterschiede gegenüber etablierten SI/SII-Inhibitoren hin und unterstreicht die strukturelle Diversität potenzieller Angriffspunkte innerhalb der Ras-SOS-Interaktion.

Im Protein-Protein-Interaktionsassay bestätigten sich die hohe Wirksamkeit des KRas4B-Site-II-Liganden MRTX-1133 (**29**) sowie des SOS-Liganden BI-3406 (**32**) als Inhibitoren der KRas4B^{WT}:SOS-Komplexbildung. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei sämtlichen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pentacyclischen Triterpenen eine bemerkenswerte Diskrepanz zwischen der ausgeprägten Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay und der vergleichsweise geringen Wirksamkeit im KRas4B^{WT}:SOS-Interaktionsassay.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Erweiterte biologische Evaluierung ausgewählter pentacyclischer Triterpene mittel HTRF-PPI- und NA-NOBRET-Assays.

Substanz	KRas4B ^{WT} :SOS PPI ^a K_D [μ M]	KRas4B ^{WT} Nano- BRET TE ^b K_D [μ M]	KRas4B ^{G12D} Nano- BRET TE ^b K_D [μ M]
 MRTX-1133 29	0.093 $\pm$ 0.015	0.063*	0.042 $\pm$ 0.0099
 BI-3406 32	0.014*	n.d	>100
 60	>100	40.9*	29.1 $\pm$ 9.40
 61	37.5 $\pm$ 16.0	n.d.	26.2 $\pm$ 7.43
 62	>100	n.d.	>100
 65	>50	21.9*	20.1 $\pm$ 10.2
 97	>50	39.1*	>50
 85	>50	n.d.	>50
 86	>50	n.d.	16.6 $\pm$ 3.44

a) Protein-Protein-Interaktionsassay zwischen KRas4B^{WT}(GTP) und SOS. b) Zellulärer Target-Engagement-Assay: Messung der Verdrängung von BI-2852 (**24**) aus der S I/II-Bindestelle von KRas4B. n.d.: nicht gemessen; * Einzelmessung.

Die Dissoziationskonstanten (K_D) für die Auflösung des KRas4B:SOS-Komplexes lagen bei allen potenten GDP/GTP-Austauschinhibitoren mit einstelligen mikromolaren IC₅₀-Werten um den Faktor 20-50 über den entsprechenden Werten aus dem GDP/GTP-Austauschassay. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der GDP/GTP-Austausch bereits in Konzentrationsbereichen gehemmt wird, in denen der KRas4B:SOS-Komplex weiterhin stabil vorliegt. Ergänzende Messungen in einem

Oberflächenplasmonresonanz-(SPR)-Assay ergaben, dass der pentacyclische Triterpen GDP/GTP-Austauschinhibitor Bevirimat (**123**) weder an KRas4B^{G12D} ($K_D > 300 \mu\text{M}$) noch an SOS ($K_D > 1000 \mu\text{M}$) alleine bindet.

Diese Befunde legen nahe, dass die untersuchten pentacyclischen Triterpene nicht durch direkte Interaktion mit KRas4B oder SOS wirken, sondern vielmehr eine Bindung an den präformierten KRas4B:SOS-Komplex eingehen. Ein solcher Wirkmechanismus wäre von erheblichem wissenschaftlichem Interesse, da bislang nur eine sehr begrenzte Anzahl niedermolekularer Verbindungen beschrieben ist, die gezielt den KRas4B:SOS-Komplex adressieren.^[288–292]

3.4 Molecular Modelling

Zur Entwicklung einer fundierten Bindungshypothese wurden umfassende *molecular modeling*-Studien mit ausgewählten Derivaten pentacyclischer Triterpene durchgeführt. Vor dem eigentlichen *in silico*-Docking unter Verwendung des Glide-Moduls (Schrödinger Molecular Modeling Suite) erfolgte zunächst eine systematische Konformationsraumsuche. Auf diese Weise entstand eine repräsentative Auswahl energetisch bevorzugter Konformere als Grundlage der nachfolgenden Dockingstudien. Hierzu wurde eine kombinierte Torsions-/Low-Mode-Sampling-Strategie eingesetzt, die eine adäquate Abdeckung des Konformationsspektrums gewährleistet.

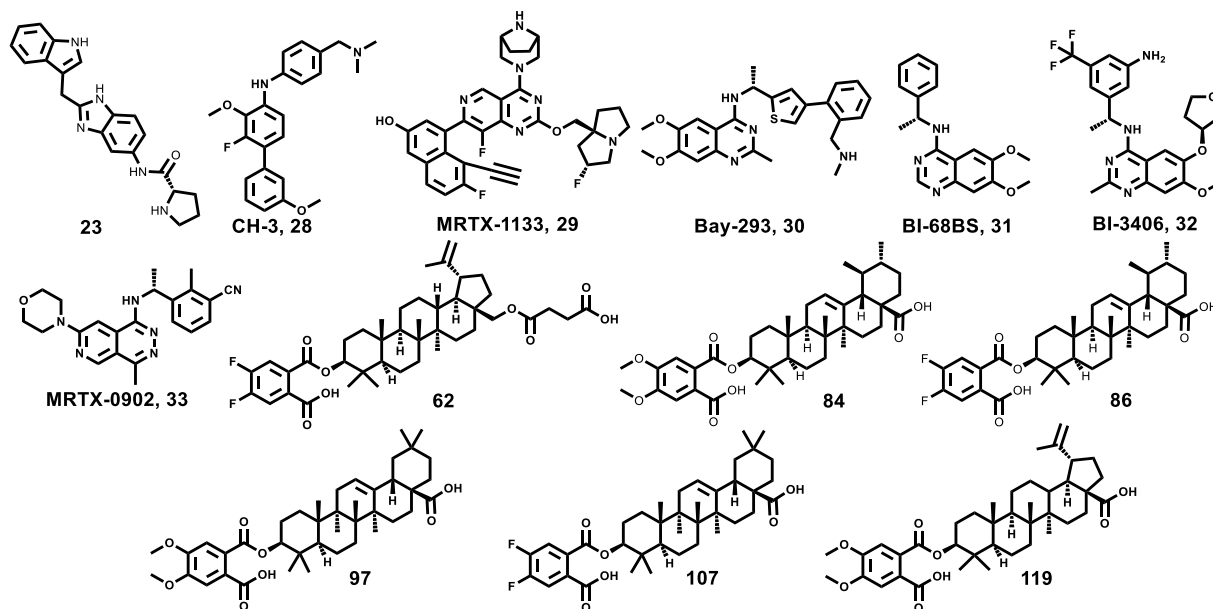


Abbildung 24: Strukturen der im Molecular Modelling verwendeten Referenz-Liganden **23**, **28–33** und Derivate pentacyclischer Triterpene (**62**, **84**, **86**, **97**, **107** & **119**).

Die anschließenden Docking-Studien wurden zunächst im *Standard Precision* (SP)-Modus durchgeführt. Zur Erhöhung der Aussagekraft der resultierenden Bindungsmodi erfolgte anschließend eine Reevaluierung der Posen unter Anwendung des *Extra Precision* (XP)-Modus. Dieses zweistufige Vorgehen ermöglicht eine verbesserte Vorhersagegenauigkeit hinsichtlich potenzieller Protein–Ligand-Interaktionen und bildet die Grundlage für weiterführende Hypothesen zur molekularen Wirkweise der untersuchten Triterpen-Derivate. Die Docking-Studien wurden mit den in Abbildung 24 dargestellten Derivaten pentacyclischer Triterpene durchgeführt. Zusätzlich wurden die nativen Liganden der jeweiligen Kristallstrukturen als Referenzverbindungen in die entsprechenden Bindetaschen gedockt (Abb. 24).

3.4.1 Docking auf die S I/II und S II Bindestelle von KRas

Als Ausgangspunkt diente die von RABBITS ET AL. publizierte Kristallstruktur 6GQY, die den Ras-Inhibitor CH-3 (**28**) im Komplex mit KRas4B^{Q61H} zeigt. Der Inhibitor **28** diente als Referenzverbindung für das *Glide*-Docking und ermöglichte eine pharmakologisch relevante Bewertung der Bindung der Triterpen-Derivate an die Zielstruktur (Abb. 25b).

Die berechneten Dockingscores belegen, dass CH-3 (**28**) eine moderate Bindungsaffinität aufweist (-4.4 kcal/mol), während die Triterpen-Derivate **84**, **97** und **119** durchweg schwächere Werte zeigten (+0.5 bis -2.9 kcal/mol). Insbesondere das Ursolsäure-Derivat **84** erwies sich mit Scores zwischen +0.5 und -2.6 kcal/mol als am ungünstigsten. Ursache hierfür ist die eingeschränkte Anpassungsfähigkeit des starren, sterisch anspruchsvollen pentacyclischen Grundgerüsts an die topologische Beschaffenheit der Switch I/II Bindetasche. Auch die Derivate **97** (Oleanolsäure) und **119** (Betulin-säure) erreichten lediglich moderate Affinitäten (-1.4 bis -2.9 kcal/mol) (Abb. 25a).

Die strukturelle Analyse der Ligandorientierungen verdeutlichte die Ursachen dieser Diskrepanzen. Während sich der hochflexible Ligand CH-3 (**28**) optimal in die Passform der Switch I/II Region einfügt und insbesondere durch hydrophobe Wechselwirkungen des Methoxyphenylrests stabilisiert wird, verbleiben die Triterpen-Gerüste weitgehend oberhalb der Bindefurche. Lediglich periphere Substituenten, wie der Dimethoxyphthalat-Rest des Derivats **97**, zeigen partielle Überlappungen. Aufgrund des Volumens und der Rigidität des Triterpen-Skeletts können die für eine stabile Bindung entscheidenden Wechselwirkungen nicht ausgebildet werden. Dieser Nachteil wird

3. Ergebnisse und Diskussion

durch den Mangel an polaren funktionellen Gruppen verstärkt, sodass Wasserstoffbrücken- oder ionische Kontakte – wie sie für CH-3 (**28**) beschrieben sind, weitgehend ausbleiben (Abb. 25b).

In einem weiteren Ansatz wurde die Bindungsaffinität der Triterpen-Derivate anhand der von FESIK ET AL. veröffentlichten Kristallstruktur 4EPY überprüft, in der der ebenfalls niedermolekulare Inhibitor **23** an der Switch I/II-Bindetasche von KRas4B gebunden ist. Bemerkenswert ist, dass Ligand **23** eine abweichende Orientierung im Vergleich zu CH-3 (**28**) einnimmt und dadurch alternative Interaktionsmöglichkeiten eröffnet (Abb. 25d).

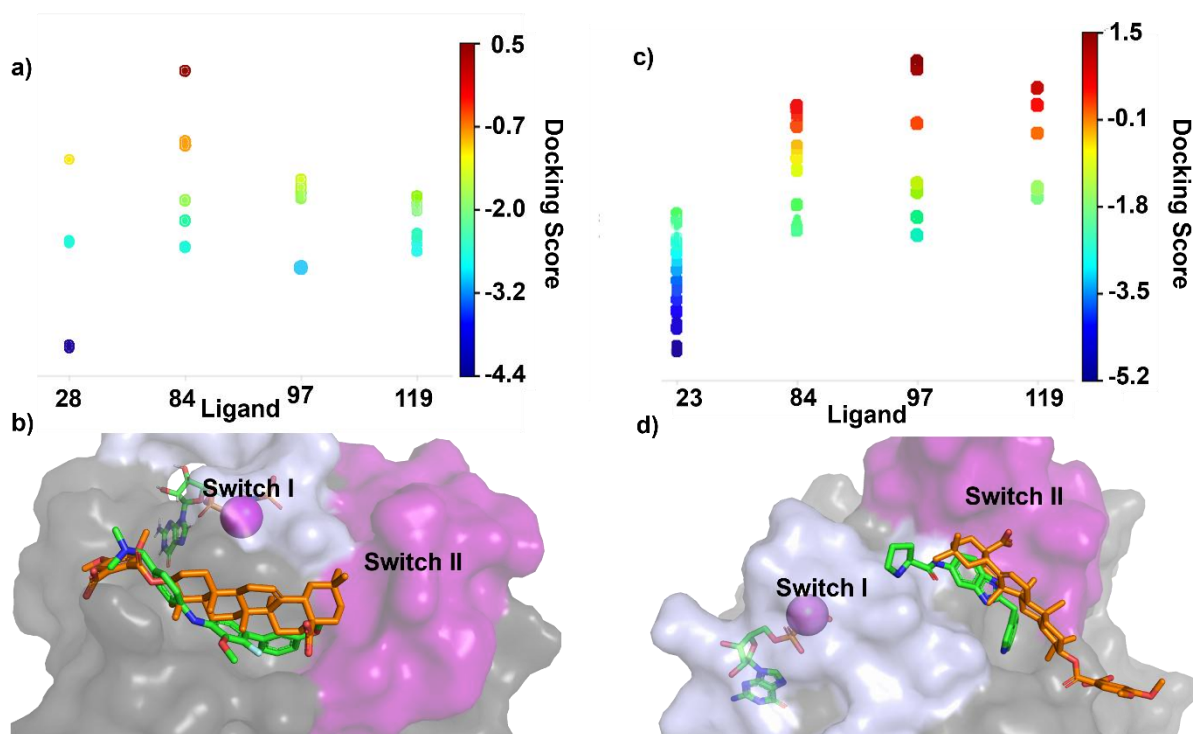


Abbildung 25: Ergebnisse der Glide-XP-Dockingstudien an der Switch I/II Bindetasche von KRas4B. a) Dockingscores für CH-3 (**28**) und die Triterpen-Derivate **84**, **97** und **119**. b) Bindetasche mit CH-3 (**28**, grün) nach RABBITTS ET AL. (PDB: 6GQY)^[160] und dem Dimethoxyphthalat-Oleanolsäure-Derivat **97** (orange, beste Pose). c) Dockingscores für Ligand **23** nach FESIK ET AL. und die Triterpen-Derivate **84**, **97** und **119**. d) Bindetasche mit Ligand **23** (grün) und Derivat **97** (orange, beste Pose; PDB: 4EPY).^[153]

Die Dockingergebnisse bestätigten erneut die deutlich höhere Affinität des Referenzliganden (-1.9 bis -5.2 kcal/mol) im Vergleich zu den Triterpenen. Unter den Derivaten zeigte das Oleanolsäure-Derivat **97** mit -2.4 kcal/mol die günstigste Pose, während die Verbindungen **84** und **119** erneut im schwächeren Bereich verblieben (+0.5 bis -2.4 kcal/mol) (Abb. 25c). Basierend auf langjähriger Erfahrung mit Docking-Studien an Ras in der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK ist bekannt, dass Dockingscores, die schwächer als -5 kcal/mol sind, keine belastbare Aussage über den Bindungsmodus

erlauben. Vor diesem Hintergrund implizieren die hier diskutierten Dockingscores keine relevanten Wechselwirkungen zwischen den Triterpenen und den Bindestellen. Darüber hinaus wurde die Bindung an eine dritte pharmakologisch hoch relevante Bindefasche untersucht: die sogenannte Switch II Pocket (S-IIP), die in der Kristallstruktur 7RPZ durch den kovalenten KRas^{G12C}-Inhibitor MRTX-1133 (**29**) induziert wird und eine tiefe hydrophobe Tasche darstellt (Abb. 26b). Das Docking der Triterpen-Derivate auf diese Struktur zeigte, dass die Zahl energetisch sinnvoller Posen im Vergleich zu den zuvor untersuchten Bindestellen deutlich reduziert war. MRTX-1133 (**29**) erreichte mit -11.4 kcal/mol erwartungsgemäß die höchste Affinität, während die Triterpene lediglich schwache Werte zwischen +5.1 und -4.8 kcal/mol erzielten. Unter den Triterpen-Derivaten zeigte das Betulinsäure-Derivat **119** mit -4.8 kcal/mol die stärkste Affinität, während das Oleanolsäure-Derivat **97** (-2.1 kcal/mol) die schwächste Bindung aufwies (Abb. 26a). Beide Scores sind jedoch so gering, dass daraus geschlossen werden kann, dass auch in dieser Bindefasche keine relevanten Wechselwirkungen zwischen den Liganden und der Bindestelle bestehen.

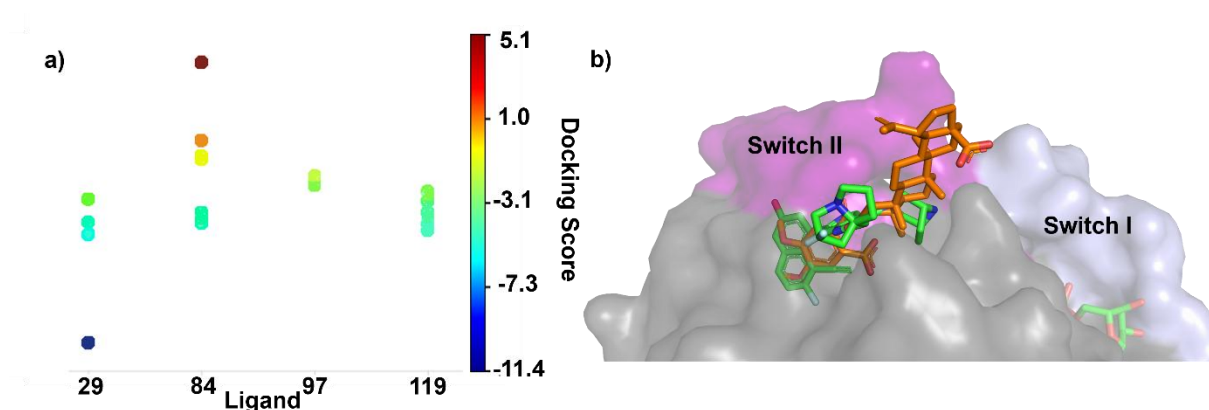


Abbildung 26: Ergebnisse der Glide-XP-Dockingstudien an der Switch II Bindefasche von KRas^{G12D} (PDB: 7RPZ).^[161] a) Dockingscores für den Referenzinhibitor MRTX-1133 (**29**) sowie die Triterpen-Derivate **84**, **97** und **119**. b) Bindefasche mit MRTX-1133 (**29**, grün) sowie dem Dimethoxyphthalat-Betulinsäure-Derivat **119** (orange, beste Pose).

Zusammenfassend zeigen die Dockingstudien, dass die untersuchten pentacyclischen Triterpene zwar in der Lage sind, pharmakologisch relevante Bindefurchen von KRas4B zu besetzen, ihre strukturelle Rigidität sowie der Mangel an polaren Interaktionsmöglichkeiten jedoch eine stabile und spezifische Bindung verhindern. Die Ergebnisse stimmen mit den experimentellen Befunden überein und legen nahe, dass eine direkte, kompetitive Bindung an die etablierten Ras-Inhibitor-Bindestellen unwahrscheinlich ist. Stattdessen erscheint eine alternative Bindemodalität – etwa an einem präformierten KRas4B:SOS-Komplex – als plausibler Ansatz.

3.4.2 Docking auf die KRas4B:SOS1-Interface Pocket von SOS

Im Rahmen der Glide-Docking-Studien wurden ausgewählte Derivate pentacyclischer Triterpene (**84**, **97** und **119**) systematisch auf die etablierte Ligandenbindestelle innerhalb der CDC25-Domäne von SOS1 untersucht, die durch unterschiedliche Referenzinhibitoren definiert ist (BAY-293 (**30**), BI-68BS (**31**), BI-3406 (**32**), MRTX-0902 (**33**)). Obwohl es sich dabei um formal unterschiedliche Kristallstrukturen handelt, adressieren sämtliche Inhibitoren dieselbe funktionell relevante Region – die sogenannte KRas:SOS1-Interface Pocket – welche eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung des Ras-SOS1-Komplexes einnimmt.

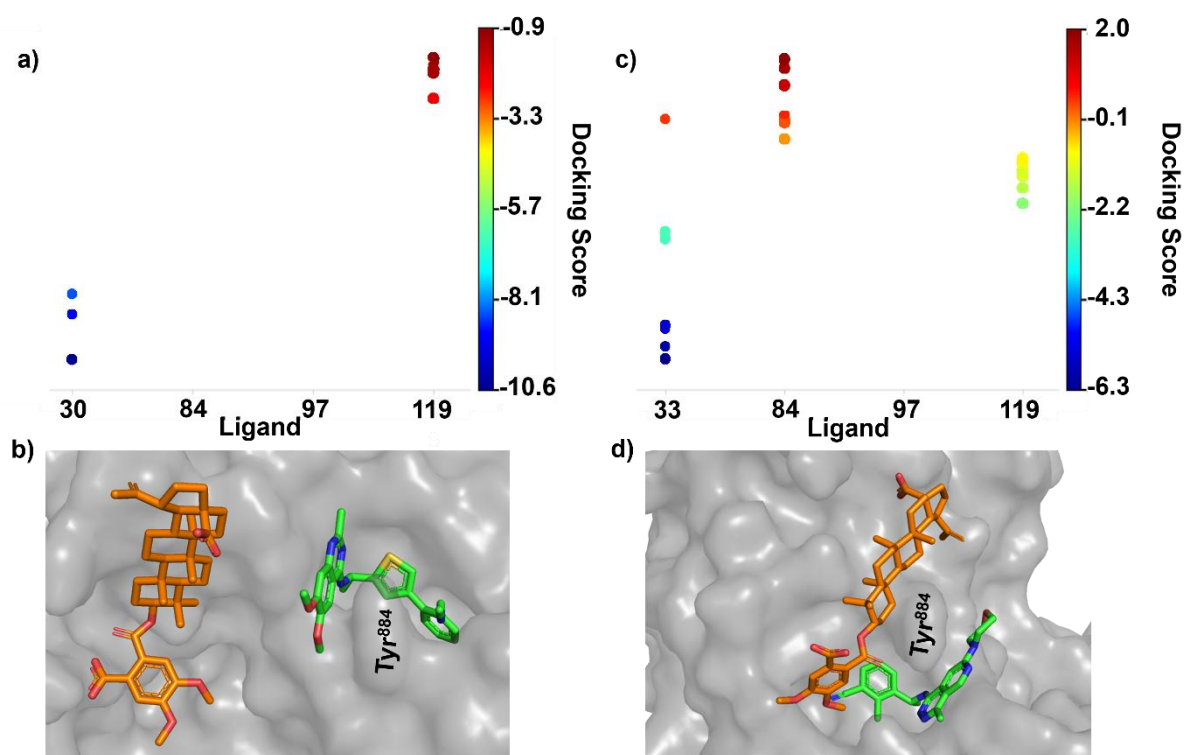


Abbildung 27: Ergebnisse der Glide-XP-Dockingstudien an der KRas:SOS1-Interface Pocket von SOS1. a) Dockingscores für Bay-293 (**30**) und die Triterpen-Derivate **84**, **97** und **119**. b) Bindetasche mit Bay-293 (**30**, grün) und dem Dimethoxyphthalat-Betulinsäure-Derivat **119** (orange, beste Pose, PDB: 5OVI).^[44] c) Dockingscores für MRTX-0902 (**33**) und die Triterpen-Derivate **84**, **97** und **119**. d) Bindetasche mit MRTX-0902 (**33**, grün) und Derivat **97** (orange, beste Pose; PDB: 7UKR).^[167]

Ein zentrales Merkmal, das sich konsistent aus allen Dockingstudien ableiten lässt, ist die räumlich stark eingeeengte und strukturell hochselektive Natur der Bindetasche. Sowohl Bay-293 (**30**) als auch die Inhibitoren von BOEHRINGER INGELHEIM – BI-68BS (**31**) und BI-3406 (**32**) – sowie MRTX-0902 (**33**) zeichnen sich durch eine kompakte Molekülarchitektur mit einem hohen Maß an Flexibilität aus. Diese strukturelle Anpassungsfähigkeit ermöglicht es den Inhibitoren, sich präzise an die Topographie der Interface Pocket anzulagern und dabei multiple, hochspezifische Wechselwirkungen mit der

Proteinoberfläche auszubilden. Bemerkenswert ist, dass selbst für diese optimierten Inhibitoren nur eine geringe Zahl stabiler Bindeposen generiert werden konnte – ein klarer Hinweis auf die intrinsische Enge und Selektivität dieser Interaktionsfläche (Abb. 27b & d).

Im Gegensatz dazu scheitern die untersuchten pentacyclischen Triterpene nahezu vollständig daran, die Bindetasche zu adressieren. Ihr voluminöses, starres Gerüst verhindert eine Einlagerung in die kompakten Bindungskavitäten. Stattdessen positionieren sich die Triterpene lediglich oberflächlich oder in unmittelbarer Nähe der eigentlichen Bindetasche, wodurch weder eine vergleichbare Orientierung noch eine ausreichende Interaktionstiefe erreicht wird (Abb. 27b & d). Diese strukturelle Diskrepanz spiegelt sich in durchweg ungünstigen Dockingscores im Bereich von +0.6 bis -2.2 kcal/mol wider, während die Referenzinhibitoren Werte zwischen -2.8 und -10.6 kcal/mol erzielen (Abb. 27a & c). Diese niedrigen Dockingscores bestätigen die, auf Grundlage der biologischen Daten formulierte Annahme, dass die Triterpen-Derivate nicht in der Lage sind, spezifisch an diese Bindestelle von SOS1 zu binden.

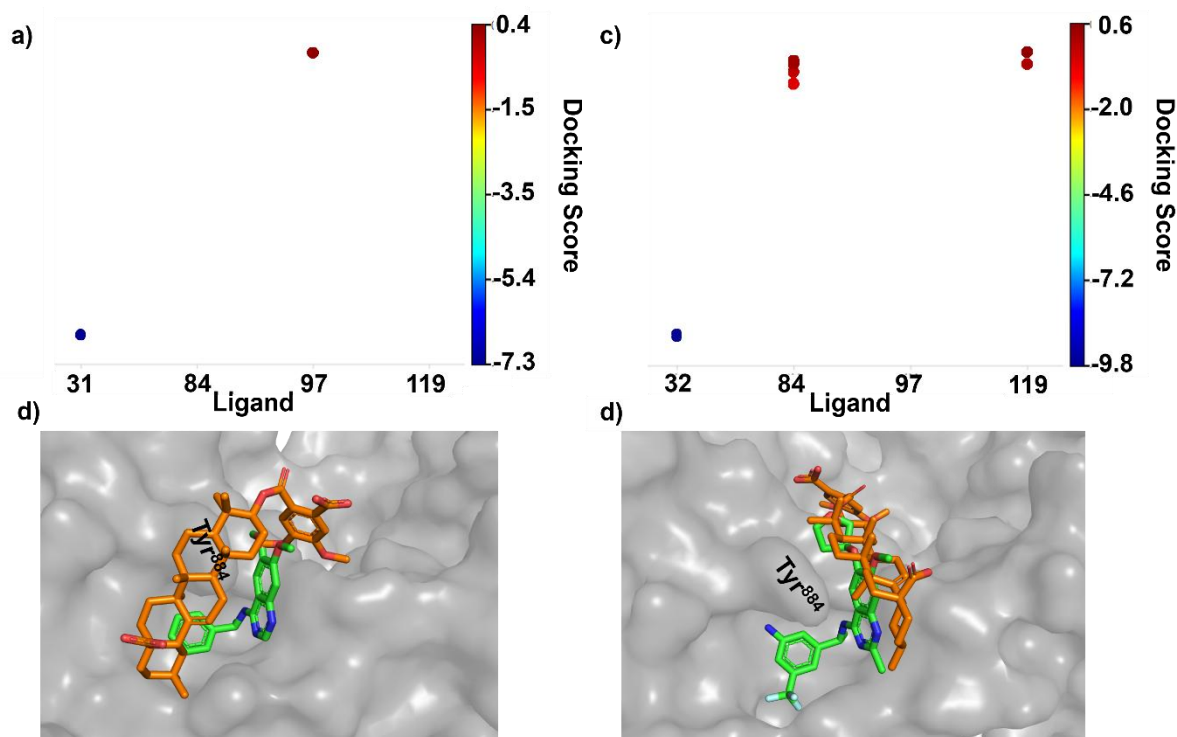


Abbildung 28: Ergebnisse der Glide-XP-Dockingstudien an der KRas:SOS1-Interface Pocket von SOS1. a) Dockingscores für BI-68BS (31) und die Triterpen-Derivate 84, 97 und 119. b) Bindetasche mit BI-68BS (31, grün) und dem Dimethoxyphthalat-Oleanolsäure-Derivat 97 (orange, beste Pose, PDB: 6SFR).^[44,165] c) Dockingscores für BI-3406 (32) und die Triterpen-Derivate 84, 97 und 119. d) Bindetasche mit BI-3406 (32, grün) und dem Ursolsäure-Derivat 84 (orange, beste Pose; PDB: 6SCM).^[44,165]

Besonders deutlich wird dies am Beispiel des Betulinsäure-Derivats **119**, das sich in der MRTX-0902-Struktur (PDB: 7UKR) auf eine alternative, funktional irrelevante Region oberhalb des Tyr884-Rests verlagert (Abb. 26d). In der Kristallstruktur mit Bay-392 (**30**) als Ligand (PDB: 5OVI) liegt das Betulinsäure-Derivat sogar noch weiter von der eigentlichen Bindetasche entfernt (Abb. 27b).

Die Docking-Studien auf den Kristallstrukturen der von BOEHRINGER INGELHEIM entwickelten Inhibitoren BI-68BS (**31**) und BI-3406 (**32**) führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Abb. 28). Auch in diesen Fällen zeigten die pentacyclischen Triterpen-Derivate ausschließlich sehr schwache Docking-Scores. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die untersuchten Triterpene nicht in der Lage sind, spezifisch in die KRas:SOS1-Interface Pocket zu binden.

3.4.3 Docking auf die Interaktionsstelle von Ras^{kat} an SOS

Auf Grundlage der vorangegangenen Ergebnisse kann eine spezifische Bindung der Triterpen-Derivate ausschließlich an KRas oder SOS1 ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf die KRas4B:SOS1-Protein-Protein-Interaktionsfläche einer vertieften Analyse unterzogen. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung alternativer Andockstellen, die aufgrund ihrer topologischen Eigenschaften voluminöseren Molekülen, wie den pentacyclischen Triterpenen, besser zugänglich sind.

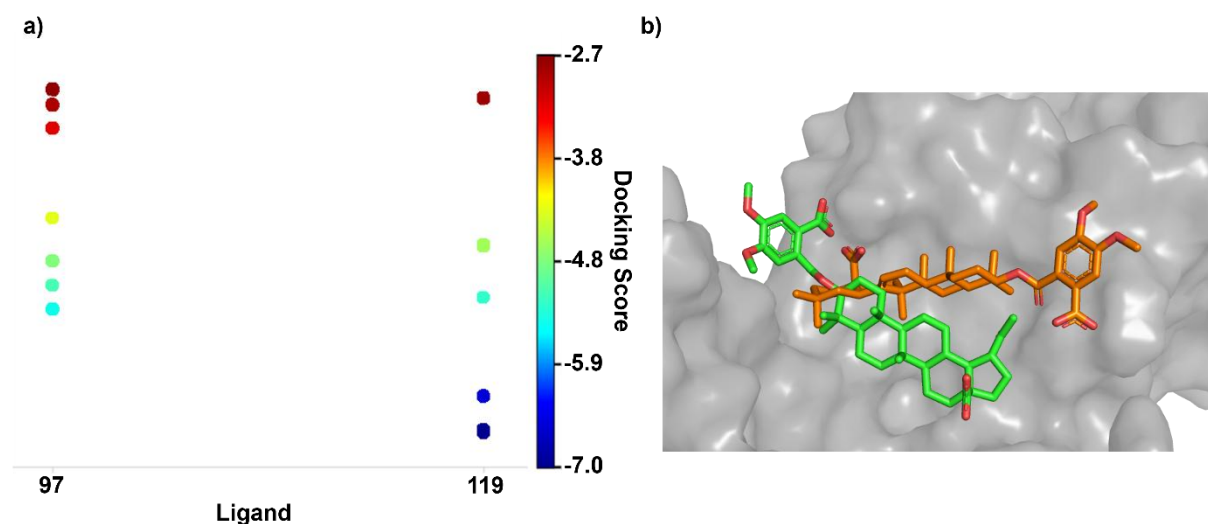


Abbildung 29: Ergebnisse des Glide-Dockings der Triterpen-Derivate **97** und **119** auf die KRas4B^{kat}:SOS1-Interaktionsstelle (PDB: 7KFZ).^[85] a) Dockingscores der untersuchten Liganden. b) Darstellung der Bindesituation in der katalytischen Tasche der CDC25-Domäne (orange: **97**; grün: **119**).

Im Rahmen dieses Ansatzes wurden gezielte *in silico* Docking-Studien mit den Dimethoxyphthalat-Derivaten der Betulinsäure (**119**) und der Oleanolsäure (**97**) durchgeführt. Dabei wurde die Grenzfläche zwischen KRas4B^{kat} und der CDC25-Domäne von SOS1 als Zielregion definiert. Die Auswertung der Dockingscores zeigte im Vergleich zu den zuvor analysierten Bindetaschen eine deutliche Verbesserung der berechneten Affinitäten. So erreichte das Dimethoxyphthalat-Betulinsäure-Derivat **119** einen Wert von -6.4 kcal/mol, während das Dimethoxyphthalat-Oleanolsäure-Derivat **97** mit -5.4 kcal/mol etwas schwächer abschnitt (Abb. 29a). Diese Werte liegen somit im Bereich der Dockingscores, die für die schwächsten niedermolekularen Ras- bzw. SOS1-Referenzinhibitoren in ihren jeweiligen Bindetaschen beschrieben wurden.

Die strukturellen Ursachen für die beobachteten Unterschiede lassen sich durch eine detaillierte Analyse der Kristallstruktur (PDB: 7KFZ) nachvollziehen. Das Betulinsäure-Derivat **119** besitzt im Bereich des D-Rings ein kompakteres Fünfringsystem, das eine günstigere Anpassung an die katalytische Bindetasche innerhalb der CDC25-Domäne von SOS1 ermöglicht. Demgegenüber weist das Oleanolsäure-Derivat **97** an dieser Position ein voluminöseres Sechsringsystem auf, das zu sterischen Konflikten insbesondere mit den Aminosäuren Tyr⁹¹², Gly⁹³¹ und Thr⁹³⁵ führt. Diese sterische Beeinträchtigung erzwingt eine alternative Orientierung des Liganden, wodurch das Molekül nicht tief in die Tasche eindringt, sondern leicht oberhalb der Bindefurche verbleibt. Infolgedessen resultiert lediglich eine oberflächliche, energetisch weniger begünstigte Interaktion mit der Proteinoberfläche, was sich im vergleichsweise schwächeren Dockingscore widerspiegelt.

3.4.4 Docking auf Mg-Bindestellen am Interface von Ras^{allo}-SOS

Eine weitere potenzielle Bindestelle zur Inhibition der Ras–SOS-Aktivität befindet sich an der Schnittstelle zwischen dem im trimeren KRas4B^{kat}:SOS1:KRas4B^{allo}-Komplex (PDB: 7KFZ) GTP-gebundenen allosterischen KRas und SOS1. Dieses KRas^{allo}:SOS1-Interface stellt eine mögliche Binderegion für sterisch anspruchsvolle pentacyclische Triterpene dar. Bislang blieb diese Region weitgehend unberücksichtigt als potenzieller Angriffspunkt für KRas:SOS-Protein-Protein-Interaktions-Inhibitoren. Erst im Frühjahr 2025 identifizierte die Arbeitsgruppe um A. SUNGUR auf Basis von *in silico*-Studien zwei potenzielle Bindetaschen im Bereich des KRas^{allo}:SOS1-Interfaces. Diese Bindestellen liegen jeweils auf beiden Seiten des Tunnels, der sich entlang der

Schnittstelle der CDC25- und der Rem-Domäne von SOS sowie dem allosterischen Ras-Protein erstreckt.^[293]

In dem trimeren Komplex liegt das katalytisch aktive KRas4B-Molekül, das an die CDC25-Domäne von SOS1 gebunden ist, ligandfrei vor, während das allosterische KRas4B auf der gegenüberliegenden Seite in Form eines KRas4B:Mg²⁺:GTP-Komplexes vorliegt (Abb. 30). Das Magnesium-Ion ist dabei fest in die GTP-Bindung integriert: Es bildet eine ionische Wechselwirkung mit der γ -Phosphatgruppe, eine koordinative Bindung zur benachbarten β -Phosphatgruppe sowie eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung zur α -Phosphatgruppe aus. Die oktaedrische Koordination wird durch ein zusätzliches Wassermolekül komplettiert, was zu einer stabilen und hochgradig spezifischen Bindungskonfiguration führt.

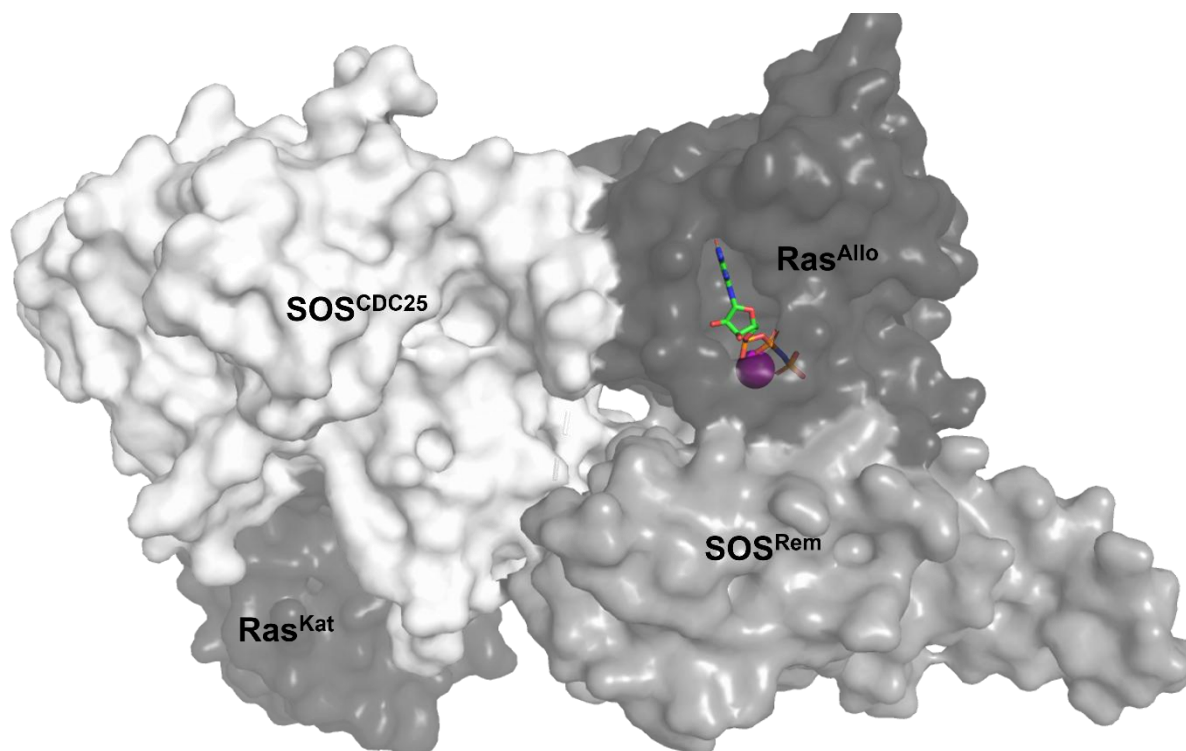


Abbildung 30: Graphische Darstellung des trimeren Ras^{kat}:SOS1:Ras^{allo}-Komplexes (PDB: 7KFZ). Schwarze Oberfläche: katalytisches und allosterisches Ras; Magenta-farbene Sphäre: Mg²⁺; grüne Kohlenstoffatome: GppNHP; graue Oberfläche: Rem-Domäne von SOS1; weiße Oberfläche: CDC25-Domäne von SOS1.

Ein struktureller Überlagerungsvergleich zwischen dem energieminierten Dihydrat des Magnesium-Mono(4,5-dimethoxy-2-(methoxycarbonyl)benzoats) (**126**) und dem GTPyS•Mg²⁺•2H₂O-Komplex offenbarte eine nahezu exakte räumliche Übereinstimmung, insbesondere hinsichtlich der Lage des Magnesiumions (Abb. 31a). In beiden Fällen nimmt das Mg²⁺-Kation eine nahezu identische Position ein. Bemerkenswert ist

zudem die strukturelle Analogie zwischen der Carboxylgruppe der Monophthalat-Einheit und der γ -Phosphatgruppe des GTP-Analogons, während die Ester-Carbonylgruppe eine ausgeprägte Überlappung mit der phosphorylierenden Doppelbindung des β -Phosphats zeigt (Abb. 31a). Im Vergleich dazu ergab die Überlagerung mit dem $\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GDP}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Komplex eine signifikant geringere strukturelle Übereinstimmung (Abb. 31b).

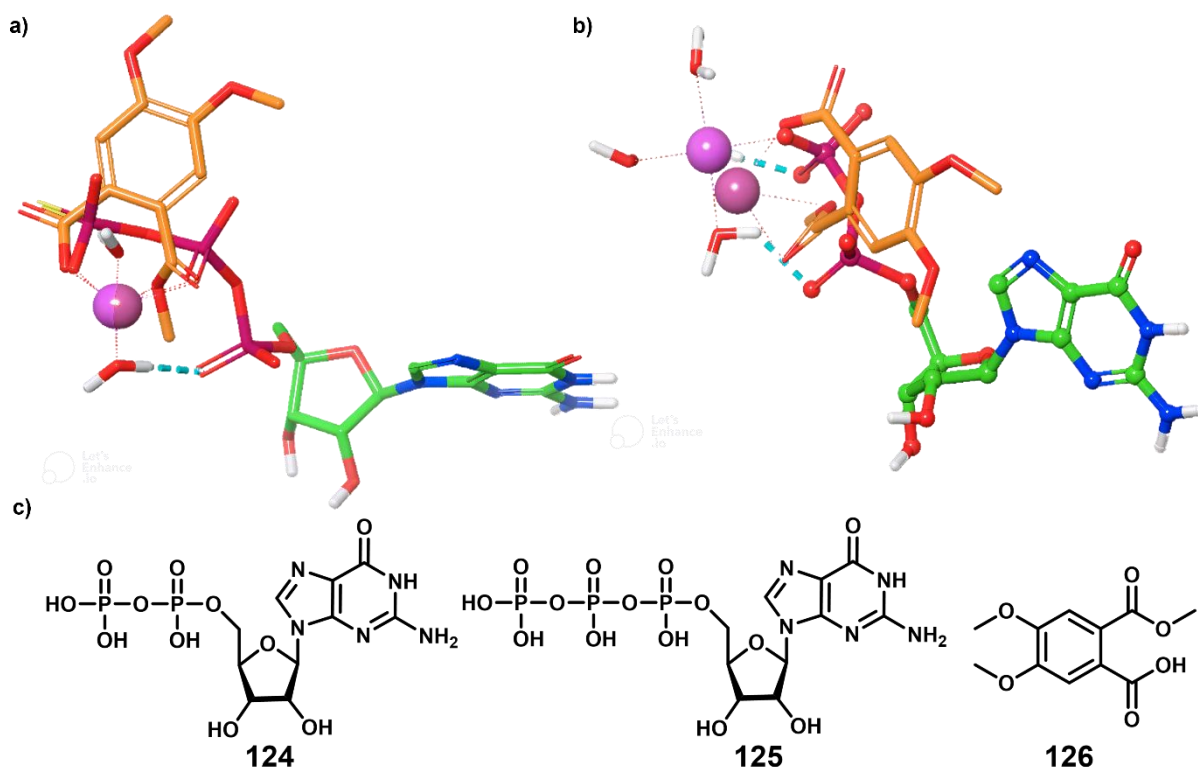


Abbildung 31: a) Superposition von $\text{GTPyS}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PDB: 4DSO) und Monomethyl-Mg-phthalat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.^[291] b) Superposition von $\text{GDP}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (PDB: 4EPR) und Monomethyl-Mg-phthalat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.^[153] c) Strukturen der superpositionierten Verbindungen Guanosindiphosphat (124), Guanosintriphosphat (125) und Monomethylphthalat (126).

Die Monophthalat-Struktureinheit, die sich als gemeinsames Strukturmotiv in nahezu allen triterpenoiden Derivaten mit nachgewiesenem bioaktivem Profil wiederfindet, kann als effektiver Mg^{2+} -Chelator interpretiert werden. Die Fähigkeit von Phthalsäure und deren Monestern als Chelator zu fungieren ist bereits seit Jahrhunderten bekannt. Dabei bilden die beiden in ortho-Position zueinander befindlichen Carboxyl- bzw Carbonylgruppen ein charakteristisches Strukturmotiv für die Chelatisierung zweiwertige Metallionen wie Mg^{2+} .^[294–299] Der durch diese funktionellen Gruppen definierte Bindungswinkel zeigt eine hohe Übereinstimmung mit jenem des terminalen Diphosphats im GTP-Molekül (Abb. 31a). Dieses strukturelle Analogon bildete die Grundlage für die Hypothese, dass monophthalathaltige Triterpen-Derivate prinzipiell in der Lage sein

könnten, über koordinative Wechselwirkungen mit dem Mg^{2+} -Ion an der KRas4B^{allo}:SOS-Grenzfläche zu interagieren.

Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurde die Proteinoberfläche mithilfe des *SiteMap*-Moduls der Schrödinger *Molecular Modeling Suite* systematisch analysiert, mit dem Ziel, potenzielle Bindungstaschen im Bereich des KRas4B^{allo}:SOS-Komplexes zu identifizieren. Das Verfahren detektiert hydrophile und polare Oberflächenregionen, indem ein virtuelles Wassermolekül über die Proteinoberfläche bewegt und so eine Kartierung potenzieller Bindestellen erzeugt wird. Dabei wurden zwei relevante Regionen identifiziert: eine kleinere Tasche in der Nähe der Guanidin-Bindung (rote Markierung) sowie eine größere, dominante Region (grüne Markierung), welche die Switch I und Switch II Domänen sowie die α 2-Helix von KRas4B^{allo} umfasst (Abb. 32).

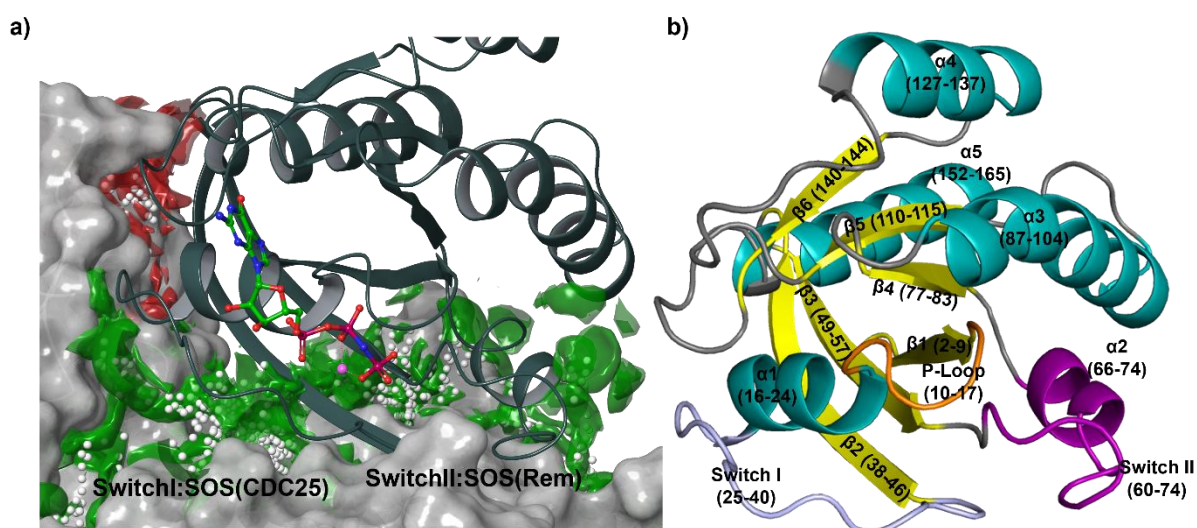


Abbildung 32: Ergebnis der Proteinoberflächenanalyse mittels SiteMap an der KRas4B:SOS-Grenzfläche (PDB: 7KFZ). a) Die mit SiteMap ermittelten Bindestellen an der Interaktionsfläche zwischen SOS1 und KRas4B^{allo}. dunkelgrau: KRas4B^{allo}; magentafarbene Sphäre: Mg^{2+} ; grüne Kohlenstoffatome: GTP; graue Oberfläche: SOS; rote und grüne Oberflächeneinfärbung: mit SiteMap gefundene Bindetaschen. b) Darstellung der einzelnen Regionen in KRas4B^{allo} mit besonderem Augenmerk auf die in hellblau/violett eingefärbten Regionen Switch I, Switch II und der α 2-Helix, die mit der SOS-Oberfläche im Bereich der Bindetasche interagieren.

Die kleinere, rot eingefärbte Tasche ist aufgrund ihrer großen Distanz zum Mg^{2+} -Ion als pharmakologisch wenig relevant einzustufen. Die durchgeführten Docking-Studien auf diese Bindestelle bestätigen die Vermutung der unzureichenden Interaktionsmöglichkeiten der Triterpene mit der SOS1-Oberfläche. Die Analyse der Bindepose mit dem besten Dockingscore für das Dimethoxyphthalat-Ursolsäure-Derivat **84** zeigt, dass dieses in einer kompakten Konformation in diese Bindestelle positioniert ist. Dabei sind lediglich die beiden Säurefunktionen so ausgerichtet, dass sie begrenzte Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche eingehen können (Abb. 33a).

Die geringe pharmakologische Relevanz dieser Bindestelle spiegelt sich auch in den erzielten Dockingscores wider. Während das Ursolsäure-Derivat **84** mit -5.3 kcal/mol den besten Wert erreicht, zeigt das Oleanolsäure-Derivat **97** nur einen Score von -4.6 kcal/mol. Das sterisch anspruchsvollste Betulinsäure-Derivat **62** erzielt mit -3.7 kcal/mol den schwächsten Wert (Abb. 33b). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine stabile Bindung der pentacyclischen Triterpen-Derivate ausgeschlossen werden kann.

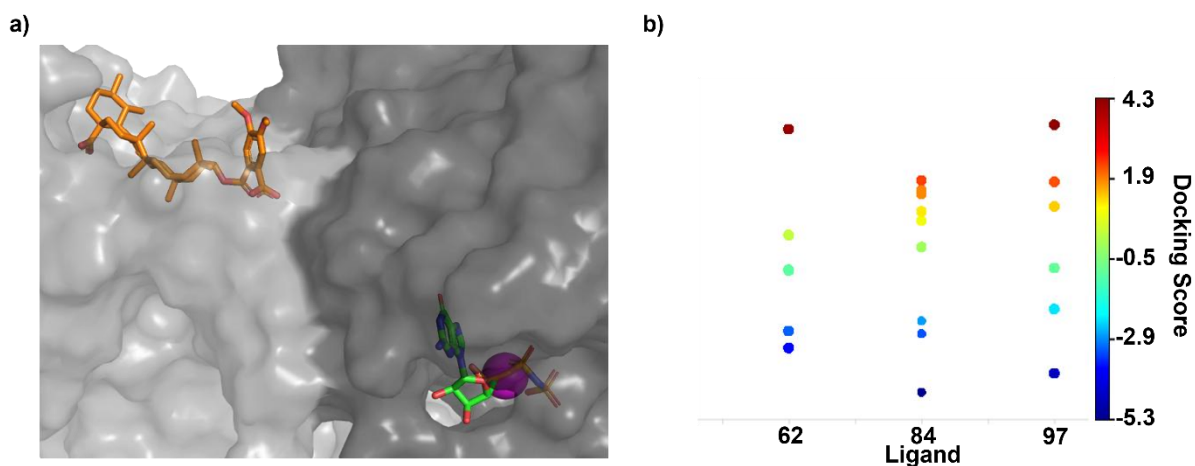


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Dockingergebnisse aus den in situ-Studien auf der kleineren, von der GTP-Bindestelle weiter entfernten Bindestelle. a) Pose des Ursolsäure-Derivats (**84**) mit dem stärksten Dockingscore. orangene Kohlenstoffatome: DiOMe-Ursolsäurephthalat **84**; hellgraue Oberfläche: SOS1; dunkelgraue Oberfläche: allosterisches Ras. b) Darstellung der Dockingscores des Glide-Dockings auf diese Bindestelle.

Die in den *Sitemap*-Analysen identifizierte grün markierte Binderegion weist mehrere topologisch voneinander abgegrenzte Bereiche auf, die ausreichend Raum zur Aufnahme der voluminösen pentacyclischen Triterpengerüste bieten. Eine dieser potenziellen Binderegionen liegt in einem tunnelartigen Hohlraum an der Grenzfläche zwischen der CDC25- und der Rem-Domäne sowie dem allosterischen KRas (Abb. 34a).

Eine weitere Binderegion erstreckt sich von der GTP-Mg-Bindestelle aus in Richtung der CDC25-Domäne unmittelbar unterhalb der Switch I Region des allosterischen Ras. Eine dritte potenzielle Bindestelle verläuft ebenfalls vom Mg^{2+} -Kation ausgehend entlang der Oberfläche der Rem-Domäne in Richtung der Switch II Region von KRas^{allo}. Diese beiden letztgenannten Bindestellen zeichnen sich nicht nur durch ein günstiges Volumen für Einlagerung der sterisch anspruchsvollen Triterpengerüst aus, sondern eröffnen zugleich die Möglichkeit koordinativer Interaktionen mit dem zentralen Mg^{2+} -Ion.

Das *Glide*-Docking auf die Binderegion innerhalb des tunnelartigen Hohlraums zwischen SOS1 und dem allosterischen KRas zeigte ebenfalls keine signifikanten Bindungsergebnisse. Wie in der Abbildung 34a dargestellt, bietet dieser Tunnel zwar ausreichend Raum für die Aufnahme der sterisch anspruchsvollen pentacyclischen Triterpengerüste – exemplarisch das Ursolsäure-Derivat **84**. Der zugehörige Dockingscore von -4.3 kcal/mol weist jedoch auf stark eingeschränkte Interaktionsmöglichkeiten mit der Proteinoberfläche hin, sodass eine stabile oder spezifische Bindung an dieser Stelle ausgeschlossen werden kann (Abb. 34b).

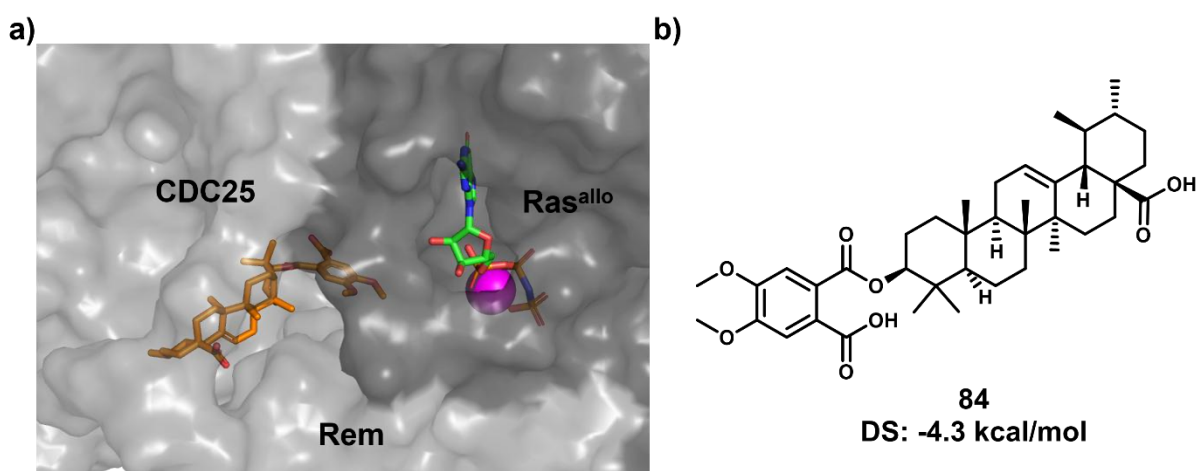


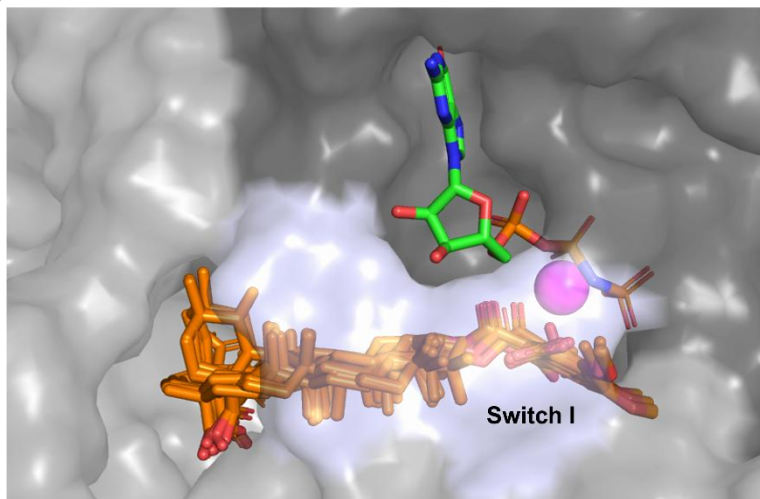
Abbildung 34: Ergebnisse des *Glide*-Dockings auf die Binderegion zwischen der CDC25- und Rem-Domäne. a) Pose von Verbindung **84** mit dem besten Dockingscore. Orange Kohlenstoffatome: Ursolsäure-Derivat **84**; grüne Kohlenstoffatome: GTP; magentafarbene Sphäre: Mg²⁺. b) Struktur und Dockingscore von Verbindung **84**.

Im Gegensatz dazu zeigten die *in silico*-Dockingstudien auf den Bereich zwischen der SOS1-Oberfläche und der Switch I Region des allosterischen KRas ein deutlich strukturierteres Bindungsverhalten. Die Triterpen-Derivate orientieren sich hierbei so, dass der Phthalat-Rest koordinative Wechselwirkungen mit dem Mg²⁺-Kation eingeht. Dieses Verhalten stützt die zuvor formulierte Hypothese, wonach die Phthalat-Einheit – analog zur γ -Phosphatgruppe des GTP – als Chelator fungieren und einen Chelat-Komplex mit dem Magnesium-Kation ausbilden kann (Abb. 35a).

Das pentacyclische Grungerüst der Triterpene richtet sich dabei entlang eines schmalen intermolekularen Kanals zwischen den Proteinen, in Richtung der CDC25-Domäne aus. Der überwiegende Teil des Moleküls liegt dabei unterhalb der Switch I Region von Ras^{allo}, während der Phthalat-Rest gemeinsam mit GTP das Mg²⁺-Kation komplexiert. Der E-Ring des Triterpen-Gerüsts ragt in einen natürlichen hydrophoben Hohlraum an der Grenzfläche zwischen Ras^{allo}, SOS1^{Rem} und SOS1^{CDC25} (Abb. 35a).

Obwohl die Positionierung der Triterpene in dieser Binderegion zunächst mit der zuvor formulierten Hypothese einer Magnesium-Chelatisierung übereinstimmt, zeichnen die berechneten Dockingscore ein ernüchterndes Bild. Das Betulinsäure-Derivat **119** erreichte mit einem Dockingscore von -6.6 kcal/mol lediglich eine mittlere Affinität, während die Werte für das Ursolsäure-Derivat **84** (-3.1 kcal/mol) sowie das Oleanolsäure-Derivat **97** (-3.5 kcal/mol) deutlich schwächer ausfielen (Abb. 35b).

a)



b)

Ligand	Docking score (kcal/mol)
84	-3.1
97	-3.5
119	-6.6

Abbildung 35: a) Docking-Posen an der Bindestelle der $KRas4B^{Switch\ I};SOS^{CDC25/Rem.}$ -Grenzfläche für die drei gedockten Dimethoxyphthalat-Derivate **84**, **97** & **119**. Graue Oberfläche: SOS1, dunkelgraue Oberfläche: $KRas4B^{allo}$, hellblaue Oberfläche: Switch I Region von Ras, grüne Kohlenstoffatome: GppNHP, orange Kohlenstoffatome: Triterpen-Derivate, PDB: 7KFZ. b) Dockingscores für die besten Posen der drei hier gerechneten Verbindungen.

Zur genaueren Beurteilung wurde die Bindepose des Betulinsäure-Derivats **119** einer detaillierten Analyse unterzogen (Abb. 36a). Die zugrunde liegende Kristallstruktur (PDB: 7KFZ) zeigt, dass der Bindungstunnel eine äußerst enge Geometrie aufweist, wodurch das Derivat in unmittelbare Nähe zum GTP-Analogon GppNHP rückt. Die Analyse der interatomaren Abstände verdeutlicht, dass sich die relevanten Sauerstoffatome in einem als neutral zu bewertenden Abstand zueinander befinden. So beträgt der Abstand zwischen dem Sauerstoffatom der γ -Phosphatgruppe und jenem der Methoxygruppe des Dimethoxyphthalatrests 2.9 Å – ein Wert, der knapp unterhalb des addierten Van-der-Waals-Radius zweier Sauerstoffatome (3.04 Å) liegt. Auch der Abstand zwischen dem Carboxylsauerstoff des Phthalatrests und dem α -Phosphoester des GppNHP liegt mit 3.1 Å im Bereich eines typischen Van-der-Waals-Kontakts (Abb. 36b).^[300–302]

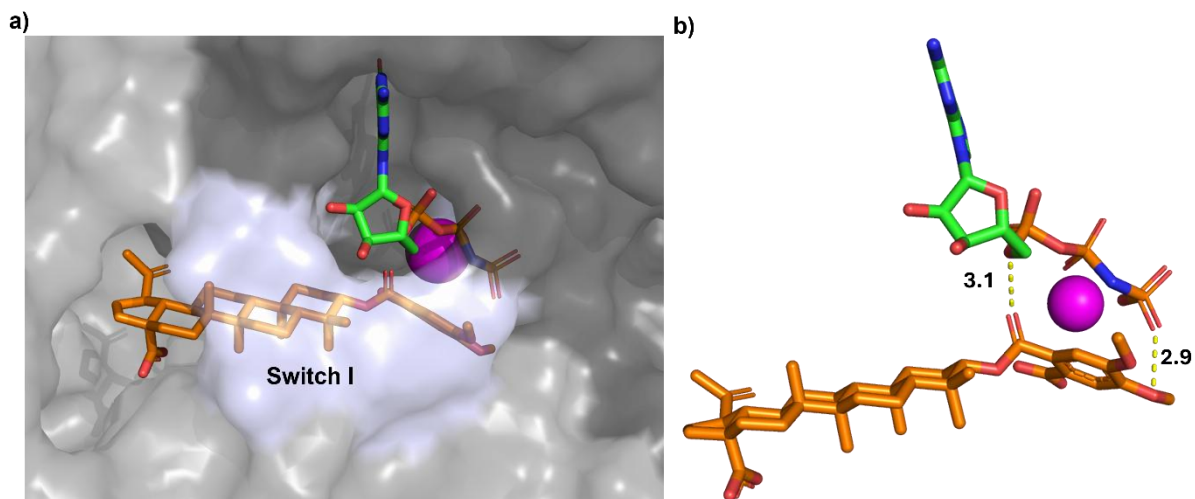


Abbildung 36: a) Pose des Dimethoxyphthalat-Betulinsäure-Derivats (**119**, orange) mit dem besten Dockingscore in dem Bindetunnel-zwischen SOS^{CDC25} (grau) und KRas4B^{allo} (dunkelgrau). b) Lage des Betulinsäure-Derivats **119** (orange) am Mg²⁺-Kation (violett) im Vergleich zu GppNHP. Abstände zwischen den Sauerstoffatomen des Triterpen-Derivats und denen Phosphatsauerstoffen von GppNHP in Angström.

Vor dem Hintergrund dieser Befunde ist anzunehmen, dass die vergleichsweise schwachen Dockingscores eher auf fehlende Interaktionsmöglichkeiten mit der Proteinoberfläche, als auf sterische Spannungen innerhalb des Magnesium-Chelatkomplexes zurückzuführen sein.

Die Dockingstudien an der letzten untersuchten Binderegion der Ras^{allo}-*bindingsite*, die sich zwischen der Rem-Domäne von SOS1 und der Switch II Region von KRas4B^{allo} befindet, liefern hingegen deutlich günstigere Ergebnisse. Besonders auffällig sind dabei die Verbindungen **84** und **97**, deren Dockingscores in einer ähnlichen Größenordnung wie jener des natürlichen Liganden GDP (PDB: 4DSU) liegen. Zwar erreichen sie nicht die Affinität des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons GppNHP (PDB: 7KFZ), das erwartungsgemäß eine deutlich stärkere Bindung an KRas4B zeigt (Abb. 37b).

Die Analyse der Dockingscores der im GDP/GTP-Austauschassay aktiven Verbindungen zeigt deutliche Schwankungen mit Werten zwischen -7.1 kcal/mol (**62**) und -12.2 kcal/mol (**84**). Diese Unterschiede spiegeln jedoch die in den funktionellen Assays beobachteten Aktivitätsunterschiede nur bedingt wider. Dieser Befund unterstreicht erneut die begrenzte Aussagekraft rein statistischer Dockingverfahren hinsichtlich der Vorhersage funktioneller Effekte (Abb. 37b).

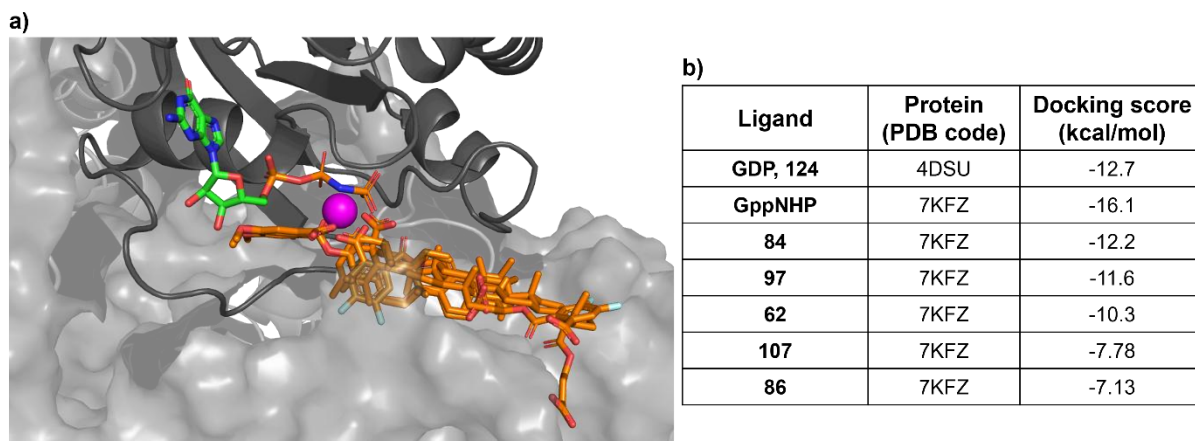


Abbildung 37: a) Überlagerung der Hits **62**, **84**, **86**, **97** & **107** aus dem GDP/GTP-Austausch Assay in der hochaffinen Ras^{Switch II}:SOS^{Rem}-Bindetasche (PDB: 7KFZ). b) Dockingscores der genannten Triterpen-Derivate sowie von GDP **124** und dem GTP(**125**)-Analogon GppNHP.

Im Gegensatz zu den Dockingscores offenbart die strukturelle Überlagerung der gedockten Posen eine bemerkenswerte Konvergenz der Ligandorientierungen (Abb. 37a). Diese für alle Verbindungen konsistente Lage deutet auf einen einheitlichen Bindungsmodus innerhalb der pentacyclischen Triterpene hin.

Zur weiterführenden Analyse wurden für das Ursolsäure-Derivat **84** und das Oleanolsäure-Derivat **97** im Komplex mit der KRas4B^{allo}:SOS^{Rem}-Bindungsregion (PDB: 7KFZ) Molekulardynamik-Simulationen über jeweils 500 ns durchgeführt. Aus den resultierenden Trajektorien mit insgesamt 2000 Einzelkonfigurationen wurden 1000 repräsentative Frames einer nachfolgenden MM/GBSA-Berechnung unterzogen.

Die Analyse ergab für Verbindung **84** eine gemittelte freie Bindungsenergie (ΔG_{bind}) von -92.6 ± 20.6 kcal/mol und einen Spitzenwert von -140.5 kcal/mol. Für das Oleanolsäure-Derivat **97** ergaben sich geringfügig ungünstigere Werte mit einem mittleren ΔG_{bind} -Wert von -60.2 ± 12.4 kcal/mol und einem günstigsten Einzelwert von -124.4 kcal/mol (Abb. 38).

Die Auswertung der MM/GBSA-Ergebnisse über den gesamten Simulationszeitraum von 500 ns zeigt für das Dimethoxyphthalat-Ursolsäure-Derivat (**84**) zwei über die gesamte Simulation hinweg stabile Cluster. Einer dieser Cluster weist eine geringere Affinität im Bereich zwischen -50 und -80 kcal/mol auf, während der zweite einen deutlich günstigeren Bereich zwischen -90 und -120 kcal/mol einnimmt. Die energetisch günstigste Pose, die innerhalb der ersten Nanosekunden erreicht wurde, zeigt mit einem $\Delta G_{\text{bind}} = -140.5$ kcal/mol einen Wert, der leicht außerhalb des zweiten Clusters liegt. Die Bildung zweier klar voneinander abgegrenzten Cluster deutet darauf hin, dass das

Ursolsäure-Derivat **84** zwei alternative Konformationen einnimmt, von denen eine signifikant stärker an die Bindestelle assoziiert ist als die andere (Abb. 38a).

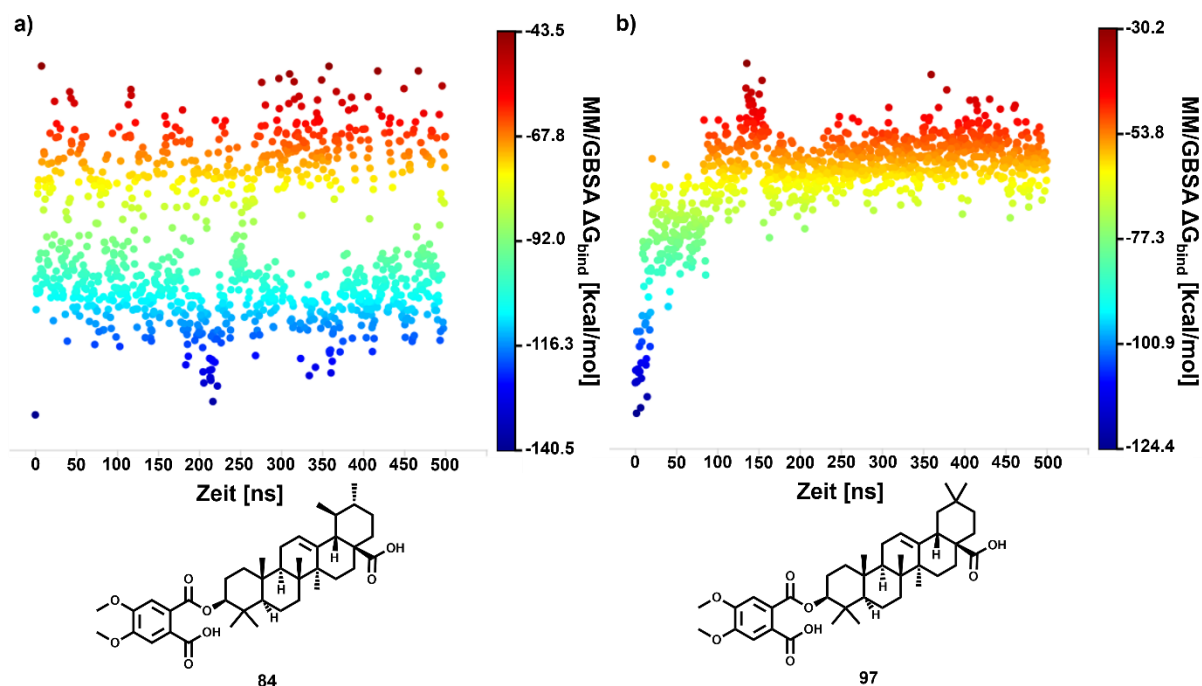


Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse aus den MM/GBSA-Berechnungen der jeweils 1000 Frames aus den MD-Simulationen für das Ursolsäure-Derivat (**84**) und Oleanolsäure-Derivat (**97**). a) Ergebnisse für das Ursolsäure-Derivat **84**. b) Ergebnisse für das Oleanolsäure-Derivat **97**.

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse für das Oleanolsäure-Derivat **97** über den gleichen Zeitraum keine Ausbildung zweier stabiler Cluster. Die energetisch günstigste Pose wird bereits innerhalb der ersten 10 ns erreicht ($\Delta G_{\text{bind}} = -124.4$ kcal/mol). Im weiteren Verlauf nimmt die Bindungsaffinität jedoch kontinuierlich ab. Nach etwa 125 ns stabilisiert sich Verbindung **97** in einem energetisch weniger günstigen Cluster, dessen Werte über den verbliebenen Simulationszeitraum im Bereich zwischen -50 und -70 kcal/mol verbleiben. Dieser Bereich entspricht in etwa dem des schwächer affinen Clusters des Ursolsäure-Derivats **84** (Abb. 38b).

Bemerkenswert ist, dass sich beide Derivate lediglich an der Stellung der beiden Methyl-Gruppen am E-Ring unterscheiden. Diese geringfügige strukturelle Variation scheint jedoch bereits einen signifikanten Einfluss auf das Konformationsverhalten und die dynamische Stabilität der Liganden über den Simulationszeitraum auszuüben.

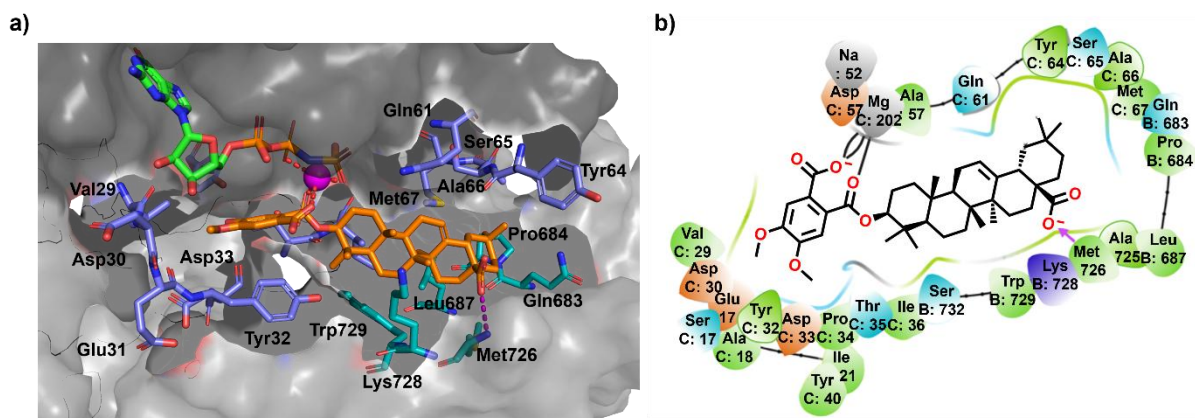


Abbildung 39: a) Schnappschuss der Verbindung **97** an der Switch II:SOS^{Rem}-Grenzfläche aus der Molekulardynamik-Simulation, basierend auf der niedrigsten freien Bindungsenergie ($\Delta G = -124.4$ kcal/mol). orangene Kohlenstoffatome: Verbindung **97**; grüne Kohlenstoffatome: GppNHP; blaue Kohlenstoffatome: Die bindetaschebildenden Aminosäurereste von KRas4B^{allo}; cyan-farbene Kohlenstoffatome: Die bindetaschebildenden Aminosäurereste von SOS1^{Rem}. PDB: 7KFZ b) Ligand-Protein-Interaktionsdiagramm des Derivats **97** an der Switch II:SOS^{Rem}-Domäne; die Farbgebung der Boxen entspricht der Polarität der beteiligten Aminosäurereste.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Molekulardynamik-Simulationen bestätigen die Ausbildung eines über den gesamten Simulationszeitraum stabilen Ligand-Protein-Komplexes. Obwohl die beiden beobachteten Cluster des Dimethoxyphthalat-Ursolsäure-Derivats **84** eine höhere Stabilität und konsistentere Affinität aufweisen, bleibt auch das Oleanolsäure-Derivat **97** trotz der mit zunehmender Simulationsdauer abnehmenden Bindungsaffinität über den gesamten Zeitraum strukturell stabil. Die energetisch günstigsten Konformationen von Verbindung **97** zeigten dabei eine bemerkenswert konsistente Bindepose innerhalb eines engen Kanals. Diese Bindefurche wird dabei durch die Aminosäurereste der Switch I Region (Val29, Glu31, Tyr32, Asp33, Thr35, Ile36, Tyr40) und der Switch II Region (Gln61, Tyr64, Ser65, Ala66, Met67) von KRas4B^{allo} gebildet. Ergänzend wird diese Bindungsumgebung durch die Reste Gln683, Pro684, Leu687, Met726, Lys728 und Trp729 der SOS^{Rem}-Domäne definiert (Abb. 39).

Das Triterpengerüst von Verbindung **97** liegt innerhalb der Bindefurche, die von der Switch II Region von KRas4B^{allo} und der SOS1^{Rem}-Domäne gebildet wird. Die Carbonsäurefunktion erfährt dabei durch die Wechselwirkung mit Met726 eine Fixierung in dieser Region. Die Phthalsäurefunktion orientiert sich in Richtung des Mg²⁺-Kations und wird dadurch in den durch die Switch I Region definierten hydrophoben Bereich eingebettet. Dabei verdrängt der Phthalatrest zwei Wassermoleküle aus dem GTP•Mg²⁺-Komplex, während die beiden Methoxygruppen in die unmittelbare Nähe zu den beiden Ribose-Hydroxygruppen von GTP positioniert sind (Abb. 39a). Die Koordi-

3. Ergebnisse und Diskussion

nation des Mg^{2+} -Kations erfolgt simultan über die ortho-ständige Ester-Carbonylgruppe und das Carboxylatanion des Liganden. Diese Wechselwirkungen führen zu einer hochaffinen Fixierung des Liganden innerhalb der Bindefurche (Abb. 39b). Die für die GTP-Bindung essenzielle oktaedrische Koordination des Mg^{2+} -Ions sowie dessen Wechselwirkungen mit den β - und γ -Phosphatgruppen bleiben dabei weitgehend erhalten.

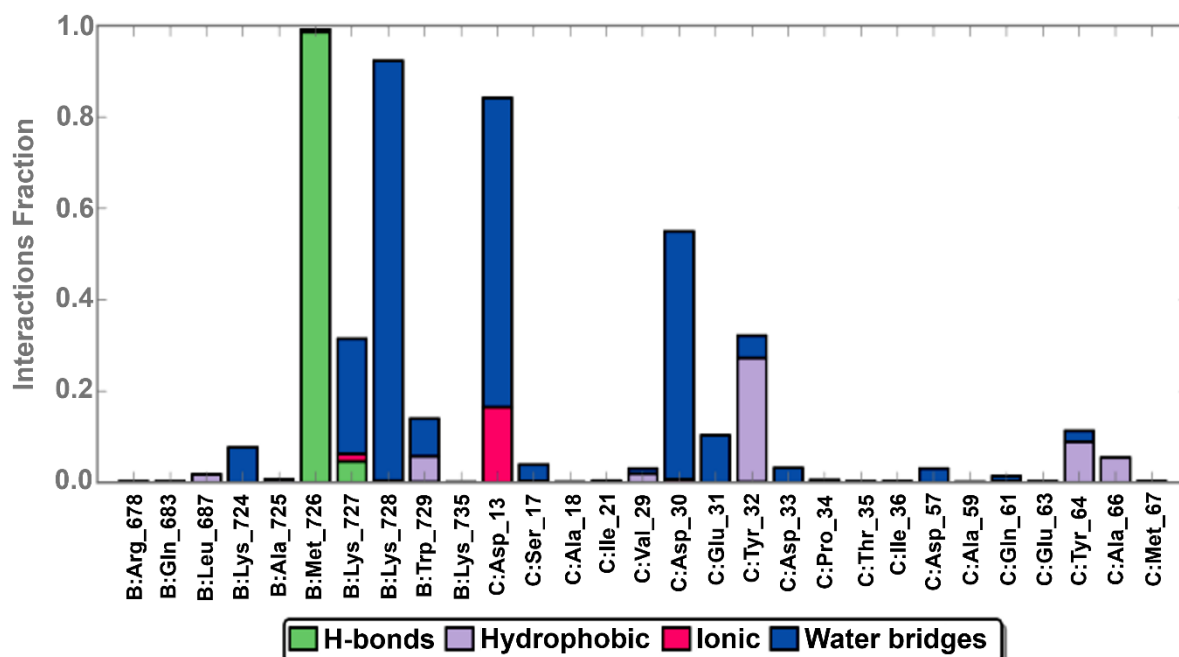


Abbildung 40: Ligand-Protein-Wechselwirkungsdiagramm von Verbindung 97. Interactions Fraction: Beschreibt prozentual über welchen Zeitraum der Simulation die jeweiligen Wechselwirkungen Bestand hatten.

Die Einlagerung des Triterpen-Liganden in die Bindefurche lokale Umlagerungen einzelner Aminosäurereste. Durch die Koordinierung des Phthalat-Rests an das Mg^{2+} -Ion werden insbesondere Ser17 und Thr35 durch den aromatischen Ring aus ihrer ursprünglichen Position verdrängt. Zusätzlich wird die Phthalsäureeinheit über hydrophobe Wechselwirkungen mit Tyr32 sowie wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp13, Asp30 und Glu31 stabilisiert. Die Fixierung des Triterpengrundgerüsts erfolgt vor allem durch eine Wasserstoffbrückenbindung der Carbonsäurefunktion in Position 28 mit Met726 der SOS1^{Rem} -Oberfläche. Diese Bindung bleibt über den gesamten Simulationszeitraum erhalten und kann daher als essenziell für die Ligandbindung angesehen werden (Abb. 40 & 41).

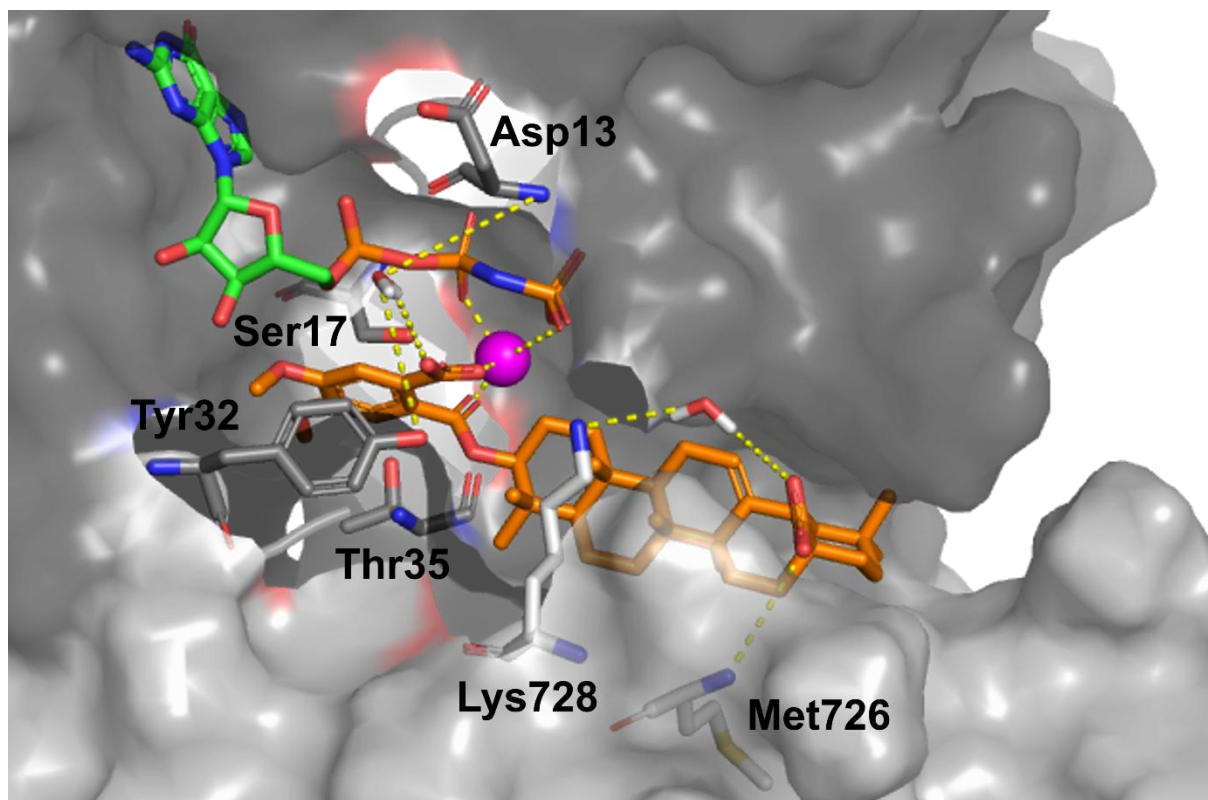


Abbildung 41: Detaillierte Darstellung einiger der wichtigsten Protein-Ligand Wechselwirkungen während der 500 ns andauernden Moleküldynamik-Simulation von der Verbindung **97** in der Bindestelle am KRas^{allo}-SOS-Interface. Dunkelgrau: KRas^{allo}; hellgrau: SOS1; grüne Kohlenstoffatome: GNP; orange Kohlenstoffatome: Verbindung **97**.

Eine zusätzliche Stabilisierung des Grundgerüsts erfolgt über die wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen der Carbonsäurefunktion und den Aminosäuren Lys727 und Lys728 (Abb. 40 & 41). Da die übrigen in Abbildung 40 dargestellten Wechselwirkungen nur für weniger als 20% des Simulationszeitraums bestehen, ist davon auszugehen, dass sie lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Bindung der Triterpen-Liganden spielen.

Die Analyse der molekularen Wechselwirkungen stützt die Hypothese, dass das Monophthalsäure-Derivat der Oleanolsäure **97** sowie verwandte pentacyclischer Triterpene als *molecular glue* fungieren. Durch diesen Wirkmechanismus würde eine Stabilisierung des KRas4B^{allo}:SOS1^{Rem}-Komplexes vermittelt. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Ergebnisse des GDP/GTP-Austauschassays gestützt. In diesem zeigten sowohl das methylgeschützte Phthalsäure-Derivat **101** als auch das Hydroxamsäure-Derivat **103** eine deutlich verminderte Aktivität. Bei Verbindung **101** verhindert die Methylgruppe die koordinative Bindung der Phthalat-Einheit innerhalb des oktaedrischen Mg²⁺-Komplexes. Beim Hydroxamsäure-Derivat **103** führt die sterisch erweiterte Hyd-

roxamsäure-Kette im Vergleich zur Carbonsäure zu einem ungünstigerem Koordinationswinkel, wodurch die Affinität für eine koordinative Bindung an das Mg^{2+} -Ion signifikant reduziert ist.

Dieser postulierte Wirkmechanismus erscheint auf den ersten Blick kontraintuitiv, da eine Stabilisierung des KRas4B:SOS1-Komplexes üblicherweise mit einer gesteigerten GDP-Freisetzung und somit einer erhöhten KRas-Aktivierung assoziiert ist. Die Aktivierung von SOS1 durch KRas4B^{allo} sowie der darauffolgende GDP/GTP-Austausch im katalytisch aktiven KRas4B^{kat} stellen jedoch hochkomplexe, durch zahlreiche Konformationsänderungen regulierte Prozess dar, die in ein dynamisches Rückkopplungssystem eingebettet sind.

Die Initiierung dieses Mechanismus erfolgt durch die Insertion eines helikalen Hairpins, der aus der αH - und αI -Helix der CDC25-Domäne von SOS1 gebildet wird. Diese Insertion induziert strukturelle Umlagerungen in den Switch I und Switch II Regionen von KRas wodurch die Nukleotidbindetasche geöffnet und der gebundene $\text{GDP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ -Komplex freigesetzt wird.^[303] Die Aminosäure Leu938, Bestandteil der αH -Helix, verhindert zum einen sterisch eine Mg^{2+} -Koordination und stabilisiert zugleich den entstandenen nukleotidfreien KRas4B:SOS-Komplex. Ein weiterer, an der GDP-Freisetzung beteiligte Aminosäure ist Glu942, deren Seitenkette mit der Bindestelle der α -Phosphatgruppe des Nukleotids überlappt.

Die Stabilisierung des KRas4B^{kat}:SOS1-Komplexes erfolgt durch mehrere Aminosäurereste von KRas, darunter Phe28, Val29, Asp30, Asn116, Lys117, Asp119 und Ala146, die über spezifische Kontakte mit SOS1 und dem gebundenem Guanosin interagieren.^[303] Während des gesamten Simulationszeitraums von 500 ns wurden bei keinem dieser Reste – weder von SOS1 noch von KRas4B^{kat} – signifikante Konformationsänderungen beobachtet.

Der molekulare Mechanismus, über den die SOS-Aktivität durch KRas4B^{allo} reguliert wird, ist bislang nicht vollständig verstanden. In vertiefenden Studien zu HRas wurde die Bildung eines ternären Komplexes aus (GppNHP)HRasY64A^{allo}:SOS1:HRasWT nachgewiesen. Dieser Komplex induziert eine konformationelle Umlagerung der Rem-Domäne relativ zur CDC25-Domäne. Diese Umlagerung verstärkt die Interaktion zwischen der Switch I Region von HRas und SOS1 und erleichtert somit den GDP/GTP-Austausch.^[304]

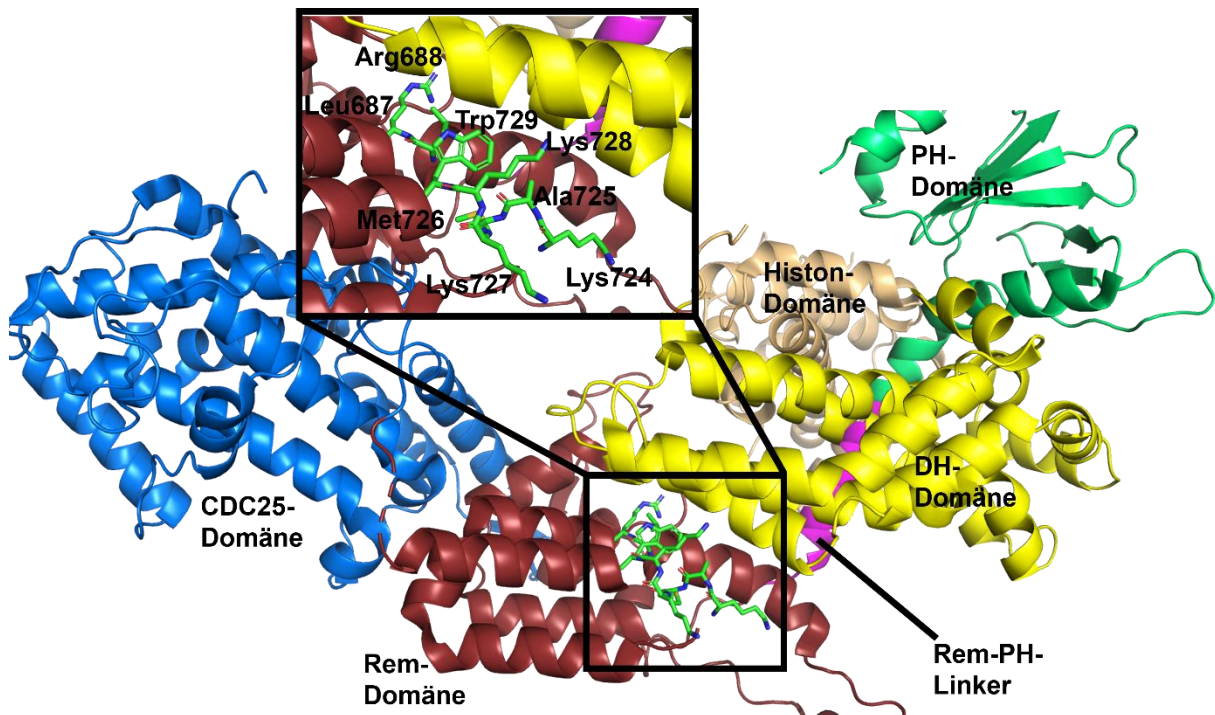


Abbildung 42: Kristallstruktur von SOS1 im autoinhibierten Zustand. Im vergrößerten Ausschnitt sind die Aminosäurereste zu sehen, die eine wichtige Rolle sowohl bei der Bindung des allosterischen Ras-Proteins, als auch bei der Bindung der pentacyclischen Triterpene spielen. Blau: CDC25-Domäne; braun: Rem-Domäne; gelb: DH-Domäne; grün: PH-Domäne; ocker: Histon-Domäne; magenta: PH-Linker. (PDB: 3KSY).

Darüber hinaus wurde in *in vitro* Studien gezeigt, dass die Deletion des N-terminalen Segments von SOS1, bestehend aus der Histon-, DH- und PH-Domäne zu einer signifikanten Steigerung der GDP/GTP-Austauschaktivität führt.^[305–307] Diese Beobachtung belegt den autoinhibitorischen Einfluss dieser Domänen. Die PH-Domäne interagiert dabei ausschließlich mit der DH-Domäne, die wiederum schwach an die Rem-Domäne bindet. Eine direkte Interaktion der PH- mit der Rem-Domäne erfolgt lediglich über einen helikalen Linker, bestehend aus den Aminosäureresten 550-566. Dieser verbindet die Rem-Domäne entlang eines hydrophoben Bereichs der DH-Domäne kovalent mit der PH-Domäne und steuert so die Positionierung des DH-PH-Moduls an der Rem-Domäne (Abb. 42).^[79]

Im autoinhibierten Zustand von SOS1 befindet sich das DH-PH-Modul direkt oberhalb der allosterischen Bindestelle von KRas^{GTP} an die allosterische Bindestelle. SONDERMANN ET AL. haben nachgewiesen, dass die nukleotid-austauschende Aktivität von SOS1 erst dann vollständig durch KRas^{GTP} stimuliert werden kann, wenn dieser Riegel zur Seite schwingt und dadurch die Bindestelle für KRas^{allo} freigibt.^[79]

Ein weiteres Strukturmotiv, das maßgeblich zur Autoinhibierung von SOS1 beiträgt, ist die Histon-Domäne. Diese bildet mit der DH-Domäne und dem Rem-PH-Linker ein

konserviertes Interaktionsnetzwerk, das SOS1 in einem autoinhibierten Zustand stabilisiert (Abb. 42).^[308] An die Histon-Domäne kann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) binden, wodurch SOS1 an die Zellmembran rekrutiert wird. Diese Membranassoziation löst ein Signal aus, das über den Rem-PH-Linker eine Konformationsänderung initiiert.

Infolgedessen schwingt das DH-PH-Modul zur Seite, wodurch die allosterische Bindestelle für KRas^{GTP} zugänglich wird (Abb. 43).^[309] Die anschließende Bindung von KRas^{GTP} an diese allosterische Tasche induziert eine weitreichende Konformationsänderung im gesamten SOS1-Protein. Dadurch wird die katalytische Bindestelle für KRas^{GDP} geöffnet und der GDP/GTP-Austausch aktiviert.^[79,81]

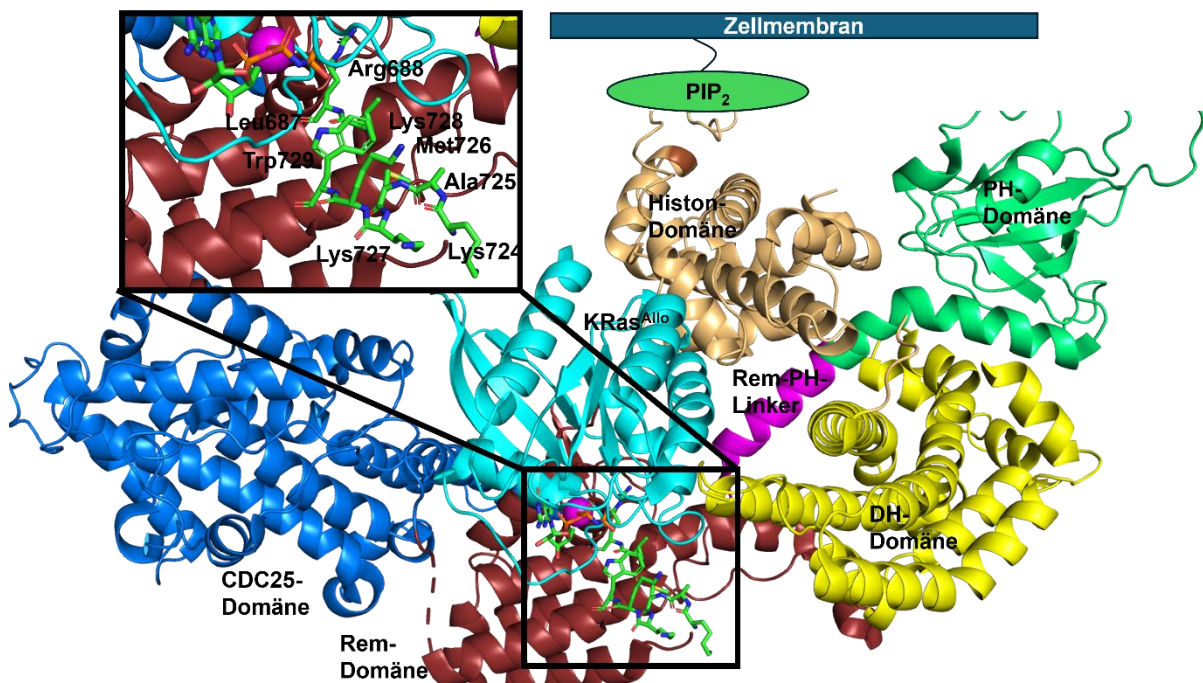


Abbildung 43: Kristallstruktur-Modell wie eine Bindung des allosterischen Ras an SOS inklusive, DH-, PH- und Histon-Domäne aussehen könnte. Da es keine publizierte Kristallstruktur gibt, die den Ras-SOS-Komplex mit allen Domänen von SOS abbildet, wurde dieses Modell mit dem Programm Pymol aus den Kristallstrukturen 7KFZ und 3KSY zusammengestellt. Dargestellt ist eine Möglichkeit, wie sich der N-terminale Rest von SOS1 verschieben könnte, damit die Bindung von Ras^{GTP} an der allosterischen Bindestelle ermöglicht wird. Die Öffnung des DH-Riegels wird durch die Adressierung der Histon-Domäne über PIP_2 induziert und ermöglicht die Bindung von KRas^{GTP} . Deutlich zu sehen ist im vergrößerten Ausschnitt das die Aminosäure der Rem-Domäne die vorher von dem DH-Riegel abgeschirmt waren, nun an der Bindung von Ras^{GTP} beteiligt sind.

Bei der Aktivierung von SOS1 und den damit einhergehenden konformationellen Umlagerungen spielen insbesondere die Wechselwirkungen der Aminosäurereste Trp729, Leu687 und Arg688 mit KRas^{GTP} eine essenzielle Rolle.^[309] Bemerkenswerterweise sind diese drei Aminosäuren zugleich Bestandteil der Bindetasche, die durch die pentacyclischen Triterpen-Derivate adressiert wird. Weitere für die Ligandbindung

relevante Reste befinden sich im Bereich der Aminosäuren 724-728, die im autoinhibierten Zustand vollständig durch die DH-Domäne abgeschirmt werden (Abb. 42).

Die Bindung der Triterpen-Derivate in diesem Bereich führt ebenfalls zu einer Abschirmung genau jener Aminosäuren, die für die Interaktion zwischen KRas und SOS1 von funktioneller Bedeutung sind. Dadurch kann KRas^{GTP} zwar weiterhin an die allosterische Bindestelle von SOS1 binden; aufgrund der sterischen Blockade durch die Triterpene dürfte jedoch die Ausbildung einer katalytisch aktiven Konformation von SOS1 verhindert werden (Abb. 44c). Infolgedessen könnte somit der KRas^{allo}-SOS1-Komplex durch die Bindung der Triterpen-Derivate im autoinhibierten Zustand stabilisiert werden. Eine solche Stabilisierung würde die Interaktion des katalytisch aktiven KRas^{kat} mit SOS1 und damit den GDP/GTP-Austausch effektiv unterbinden.

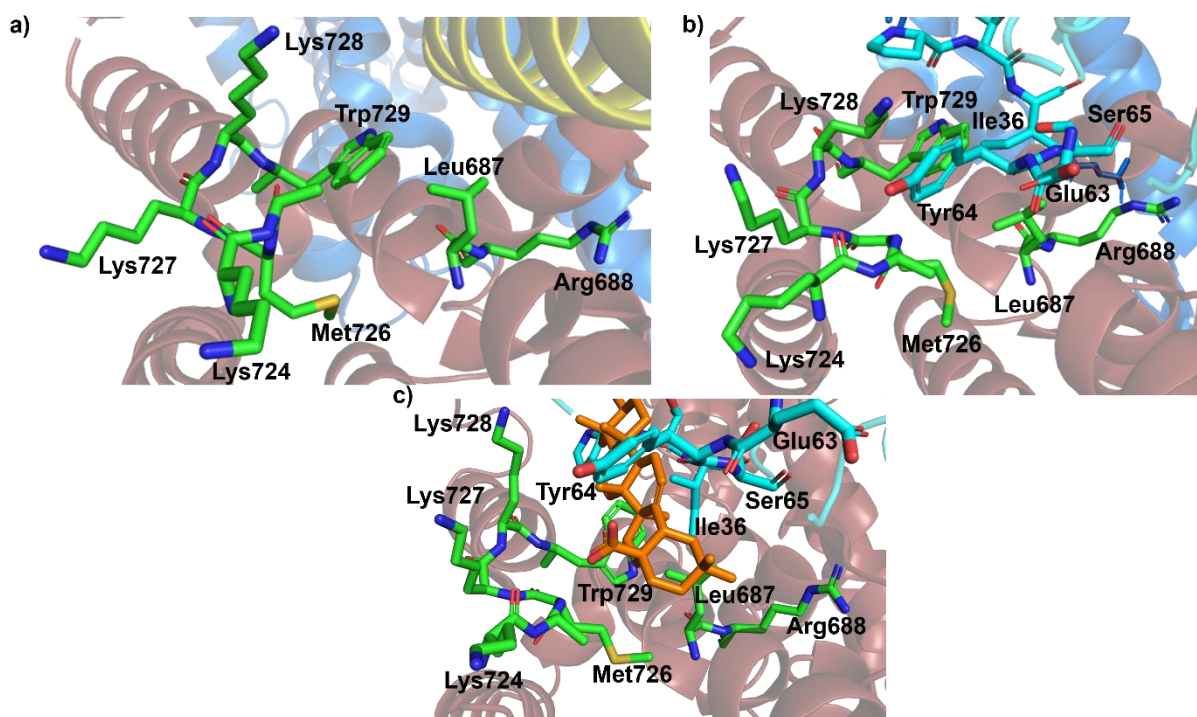


Abbildung 44: Vergleich der Position der Aminosäurereste von SOS und KRas^{allo} a) im autoinhibierten Zustand (PDB: 3KSY), b) im aktiven KRas^{allo}-gebundenen Zustand (PDB: 7KFZ) und c) im KRas^{allo}-gebundenen Zustand mit dem Dimethoxyphthalat-Oleanolsäure-Derivat **97** in der Triterpen-Bindetasche (PDB: 7KFZ). Grüne Kohlenstoffatome: SOS1; cyanfarbene Kohlenstoffatome: KRas^{allo}; orangefarbene Kohlenstoffatome: Verbindung **97**.

Die Analyse der Aminosäurepositionen im Bereich Leu687-Arg688 und Lys724-Trp729 von SOS1 sowie der Reste Ile36 und Glu63-Ser65 von KRas in den drei in Abbildung 44 dargestellten Konformationen zeigt nur geringe strukturelle Unterschiede zwischen den Zuständen. Die Reste von SOS1 erfahren beim Übergang vom autoinhibierten Zustand zum aktiven KRas^{allo}:SOS1-Komplex lediglich eine geringfügige

Repositionierung. Besonders die Thioether-Gruppe von Met726 erfährt bei der Bindung von KRas^{allo} eine deutliche Umlagerung: Während die Methylgruppe im autoinhibierten Zustand in Richtung der CDC25-Domäne orientiert ist (Abb. 44a), zeigt sie im Komplex mit KRas^{allo} in die entgegengesetzte Richtung (Abb. 44b). Zudem richtet sich die Seitenkette des Lys728 im KRas-gebundenen Zustand deutlich stärker auf das Trp729 aus.

Im KRas:SOS1-Komplex bildet Trp729 zudem eine starke π - π -Wechselwirkung mit Tyr64 sowie hydrophobe Kontakte zu Ile36 von KRas aus. Die Seitenkette des Glu63^{KRas} befindet sich dabei in unmittelbarer Nähe zu Lys687^{SOS}, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen entstehen können. Wie in Abbildung 44b ersichtlich, positioniert sich Tyr64^{KRas} zentral zwischen den Aminosäuren 724-729 von SOS und steht mit nahezu allen dieser Reste in direkter Wechselwirkung. Aufgrund dieser Lage spielt Tyr64^{KRas} eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung des aktiven SOS1-Komplexes.

Die Bedeutung dieses Restes für die Aktivierung von SOS1 wurde in zahlreichen Studien untersucht. Mutationen wie Y64A oder Y64F führen zu einer signifikant reduzierten Affinität von KRas^{GTP} zur allosterischen Bindestellen von SOS1 und infolgedessen zu einer deutlich abgeschwächten Aktivierung von SOS1. Durch den Verlust dieser Interaktion wird die allosterische Aktivierung nahezu vollständig aufgehoben.^[68,73,75,80] Mehrere Moleküldynamik-Simulationen zeigten, dass Tyr64^{KRas} einen wiederkehrenden Kontaktpunkt zur SOS1-Oberfläche bildet, der entscheidend an der Regulation der Aktivierung und Inaktivierung beteiligt ist.^[310–314] Tyr64 kann daher als eine Art „molekularer Schaltkontakt“ für die Aktivität von SOS1 betrachtet werden.

Bindet nun ein pentacyclisches Triterpen, wie in Abbildung 44c dargestellt, an diese Grenzfläche, kommt es in dieser Region zu signifikanten Umlagerungen sowohl auf Seiten von SOS1 als auch von KRas. Die ausgeprägteste Konformationsänderung von SOS1 betrifft dabei Trp729, dessen Indolring durch die Bindung des Triterpens nach hinten gekippt wird und somit nicht länger in Richtung von Tyr64 zeigt. Diese Umlagerung unterbricht die zuvor bestehende bestehende π - π -Wechselwirkung zwischen Trp729 und Tyr64 vollständig.

Eine weitere Veränderung betrifft Met726, dessen Seitenkette infolge einer Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe der Oleanolsäure in Richtung von Leu687 rotiert (Abb. 44c). Durch die Einlagerung der Oleanolsäure zwischen die Aminosäuren Ile36, Glu63,

Tyr64 und Ser65 von KRas sowie den Resten 724-729 von SOS1 werden sämtliche intermolekulare Kontakte zwischen diesen Seitenketten aufgehoben. Dadurch verliert Tyr64 die Möglichkeit, mit der Oberfläche von SOS1 zu interagieren, was die Stabilisierung der aktiven SOS1-Konformation verhindert. In der Folge könnte SOS1 trotz gebundenem KRas^{allo} in den autoinhibierten Zustand zurückfallen, wodurch der GDP/GTP-Austausch blockiert wird.

Die Unterbrechung der Wechselwirkungen zwischen Tyr64^{KRas} und der SOS1-Oberfläche stellt somit einen bislang nicht beschriebenen, potenziell neuartigen Mechanismus zur Inhibierung des GDP/GTP-Austauschs dar. Während SUNGUR ET AL. Anfang 2025 mittels *in silico*-Analysen zwei potenzielle Bindestellen am allosterischen KRas^{GTP}:SOS1^{CDC25}-Interface identifizierten,^[293] existieren bislang keine experimentellen Untersuchungen zu der hier formulierten Wirkhypothese. Die postulierte Komplexierung von Mg²⁺•GTP mit einem Phthalat-Rest und die daraus resultierende, durch die spezifische Ausrichtung des Triterpenes bedingte Destabilisierung der aktiven SOS1-Konformation stellen einen innovativen Ansatzpunkt für die Entwicklung allosterischer Inhibitoren dar.

Für KRas-G12-Mutanten ist bekannt, dass diese sich hinsichtlich ihrer Bindung an die allosterische SOS1-Bindestelle weitgehend analog zum Wildtyp verhalten. Dies gilt insbesondere für die Varianten G12C und G12D, während für G12V eine verringerte Affinität zur Bindung an SOS1 beobachtet wurde.^[44,85,315,316] Dementsprechend zeigen die meisten der in dieser Arbeit entwickelten Inhibitoren keine Selektivität zwischen den einzelnen G12-Mutanten. Die G13D-Mutante weist hingegen eine erhöhte Affinität von KRas^{GTP} zur allosterischen Bindestelle auf, während die Q61-Varianten eine deutlich reduzierte Affinität besitzen.^[85,293,313]

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Mutantenselektivität der meisten Triterpen-Derivate könnte in der strukturellen Lage von Gly12 liegen, das in der Switch I Region oberhalb des GTP-Moleküls positioniert ist. Im Gegensatz dazu komplexieren die Phthalat-Reste das Mg²⁺-Kation von der gegenüberliegenden Seite. Dadurch kommt es zu keiner direkten Wechselwirkung zwischen den Dimethoxyphthalat-Triterpenen und den Mutationen in Position 12.

Nichtsdestotrotz konnten im Rahmen dieser Arbeit einige Inhibitoren, darunter die Verbindungen **58**, **118** und **119** identifiziert werden, die eine erhöhte Selektivität gegenüber den G12-Mutanten – insbesondere der G12V-Variante – aufweisen. Auch wenn

die strukturelle Grundlage dieser Selektivität im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden konnte, bietet die Klasse der pentacyclischen Triterpene ein hohes Potenzial für die Entwicklung neuer Inhibitoren gegen KRas-G12-Mutanten. Darüber hinaus eröffnet die hier vorgestellte Wirkhypothese neue Perspektiven für das Design innovativer Strukturklassen zur Inhibition des GDP/GTP-Austauschs.

3.4.5 Identifikation neuer potenzieller Inhibitorstrukturen für die Bindestelle am Interface von Ras^{allo}-SOS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Wirkhypothese zur molekularen Wirkweise pentacyclischer Triterpene entwickelt und mittels computerchemischer Methoden umfassend validiert. Gleichwohl ist zu betonen, dass diese Naturstoffe strukturell nicht den klassischen Kriterien für arzneistoffähnliche („*drug-like*“) Moleküle entsprechen. Ihre ausgeprägte molekulare Starrheit, das hohe Molekulargewicht sowie die begrenzte Zahl funktioneller Gruppen stellen wesentliche Limitationen für ihre Weiterentwicklung dar.

Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll, die erarbeitete Wirkhypothese als Grundlage für die Identifizierung alternativer Leitstrukturen mit verbesserten arzneistofftypischen Eigenschaften zu nutzen. Als Ausgangspunkt diente hierzu die „Enamine Hit Locator Library“, eine kuratierte Substanzbibliothek mit etwa 500.000 niedermolekularen Verbindungen. Für die Berücksichtigung dreidimensionaler Strukturen, relevanter Protonierungszustände bei physiologischem pH-Wert sowie sämtlicher plausibler Stereoisomere, wurde diese Bibliothek mittels LigPrep (Schrödinger Suite) prozessiert. Auf diese Weise wurde die ursprüngliche Datenbasis auf ca. 1.5 Millionen strukturell valide Verbindungen erweitert. Die erweiterte Substanzbibliothek wurde anschließend einem virtuellen Hochdurchsatz Screening (HTVS) unterzogen. Die Top Verbindungen aus diesem HTVS wurden im Anschluss systematisch mittels Glide-Docking – zunächst im SP- und anschließend im XP-Modus – auf die in dieser Arbeit identifizierte Bindetasche an der KRas4B^{allo}:SOS^{Rem}-Interaktionsfläche untersucht.

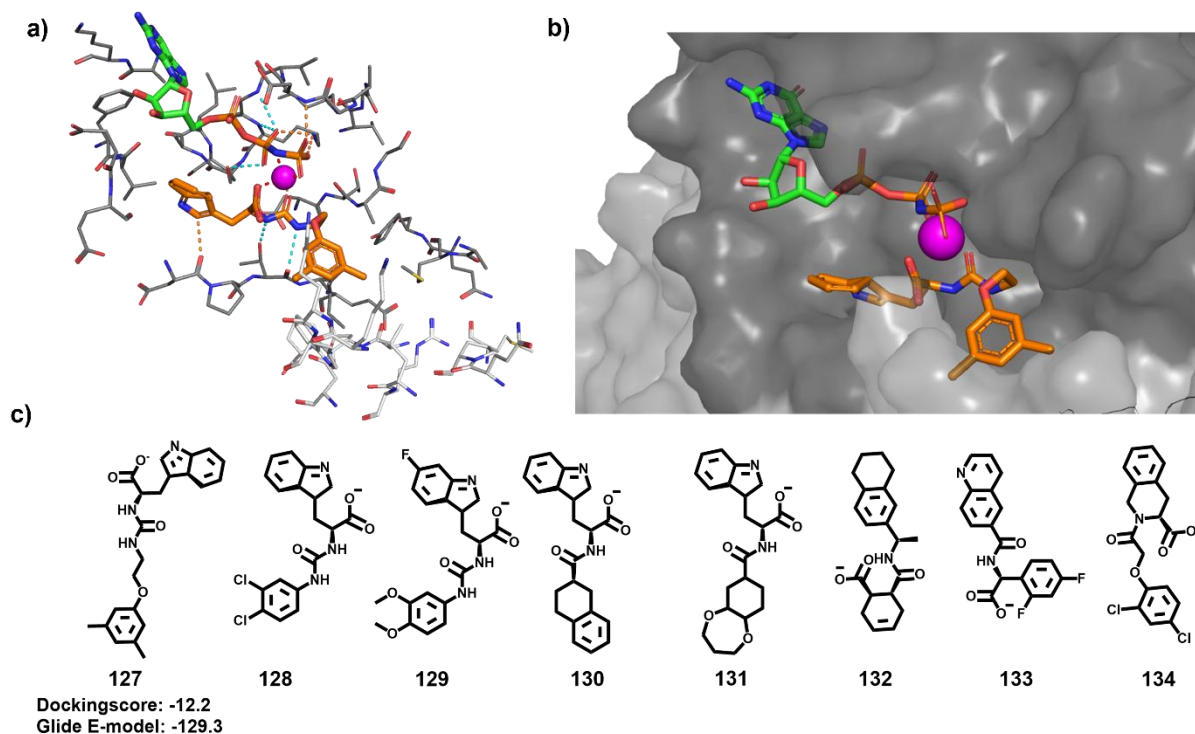


Abbildung 45: Ergebnisse der Top-Verbindungen aus den Glide-Docking-Studien (nach HTVS → Sp- → XP-Modus) der „Enamie Hit Locator Library“ auf die neue Bindestelle. a) Darstellung der Wechselwirkungen des Top-Hits mit der Switch I Region von KRas4B^{allo}. orange: Verbindung 127; grün: GppNHP. b) Lage der Verbindung 127 im KRas4B^{allo}:SOS^{Rem}-Interface. Graue Oberfläche: SOS1; dunkel-graue Oberfläche: KRas4B^{allo}. c) Strukturen des Top-Hits 127 sowie einiger strukturell ähnlicher Verbindungen 128-134.

Die Ergebnisse bestätigten eindrucksvoll die Relevanz dieser Bindestelle: So wies die als Top-Hit identifizierte Verbindung **127** einen exzellenten Dockingscore von -12.2 kcal/mol auf und zeigte einen Bindungsmodus, der demjenigen der pentacyclischen Triterpene bemerkenswert ähnlich ist. Darüber hinaus wurde die Ausbildung zusätzlicher Interaktionen mit Resten der Switch I Region von KRas4B^{allo} beobachtet, was auf eine potenziell gesteigerte Affinität und Wirksamkeit hindeutet (Abb. 45a).

Bemerkenswert an der Bindung von Verbindung **127** ist, dass für die Komplexierung des zentralen Mg²⁺-Ions offenbar kein Phthalat-Rest erforderlich ist. Viel mehr zeigt sich, dass sich dieser Rest durch einen Harnstoff mit einer Carbonsäurefunktion und einem lipophilen Indolring ersetzen lässt. Dieses in der vorliegenden Arbeit erstmals identifizierte Strukturmotiv besitzt das Potenzial, die Zellgängigkeit sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften künftiger Inhibitoren innerhalb dieser Bindetasche erheblich zu verbessern. Darüber hinaus dürfte die deutlich kompaktere Molekülarchitektur verbunden mit einem wesentlich geringeren Molekulargewicht im Vergleich zu den pentacyclischen Triterpenen, zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit beitragen. Die Überlagerung von Verbindung **127** mit dem Triterpen-Derivat **97** verdeutlicht, dass

beide Liganden ein strukturell vergleichbares, oktaedrisches Komplexierungsverhalten mit dem zentralen Mg^{2+} -Ion aufweisen (Abb. 46).

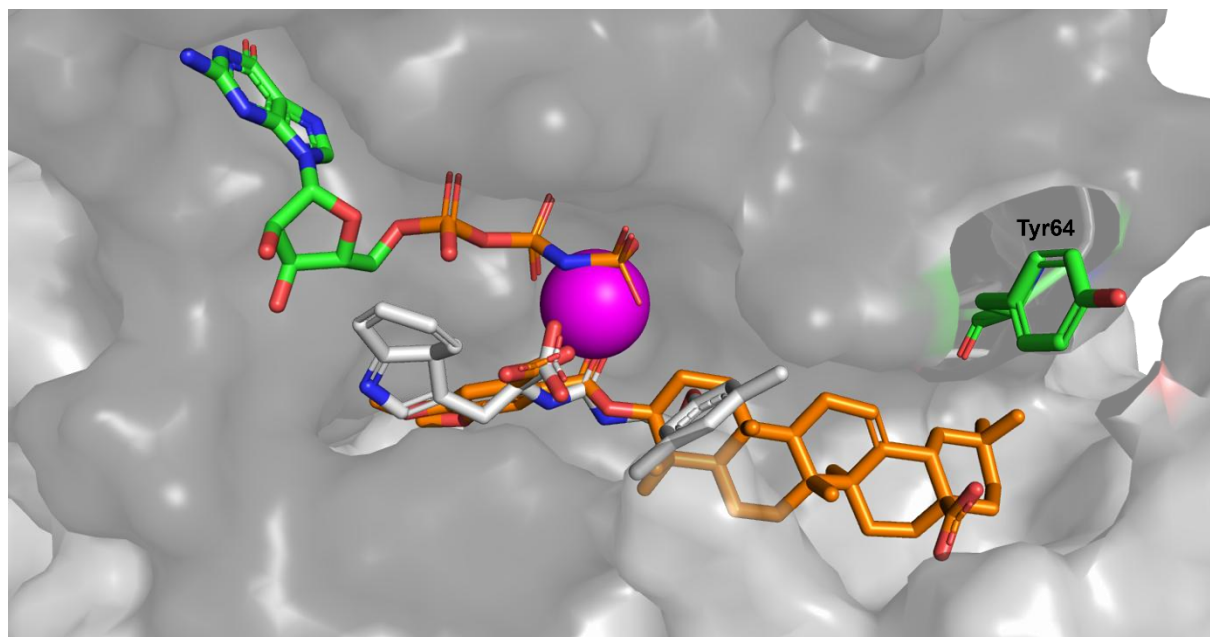


Abbildung 46: Superposition der Top-Verbindung **127** aus den Docking-Screenings der „Enamine Hit Locator Library“ mit dem Oleanolsäure-Derivat **97** in der Bindetasche am SOS:KRas^{allo}-Interface: graue Oberfläche: SOS; dunkel-graue Oberfläche KRas^{allo}; weiße Kohlenstoffatome: Verbindung **127**; orange Kohlenstoffatome: Oleanolsäure-Derivat **97**.

Neben Verbindung **127** wurden weitere strukturell verwandte Liganden (**127-134**) identifiziert, die günstige Dockingscores sowie analoge Bindemodi zeigen (Abb. 45c). Die deutlich verkürzte Kettenlänge dieser Verbindungen sowie die eher zentral im Molekül angeordneten, das Mg^{2+} -Kation koordinierenden Carboxygruppen verhindern eine ausreichende Annäherung an Tyr64. Eine direkte Beeinflussung der Wechselwirkung von Tyr64 mit der SOS1-Oberfläche erscheint daher unwahrscheinlich. Vor diesem Hintergrund ist zu bezweifeln, dass diese kompakteren Moleküle, die für die Stabilisierung der aktiven SOS-Konformation entscheidende Orientierung von Tyr64 in KRas^{allo} signifikant modulieren können. Bleibt die Unterbrechung der Tyr64–SOS1-Interaktion aus, ist davon auszugehen, dass KRas^{allo} weiterhin die aktive Konformation von SOS stabilisiert und der GDP/GTP-Austausch entsprechend fortgeführt wird. Ein weiterer Aspekt, der gegen den Einsatz dieser Verbindungen als potenzielle Wirkstoffe spricht, ist die ausgeprägte Anzahl frei drehbarer Bindungen, besonders im Fall von Verbindung **127**. Die damit einhergehende hohe konformationelle Flexibilität steht im Widerspruch zu den Kriterien der Lipinski-„Rule of Five“ und lässt eine eingeschränkte Arzneistoffähnlichkeit erwarten.^[317]

Vor diesem Hintergrund wurden mittels der *Enumeration*-Applikation der Schrödinger Suite vier zusätzliche virtuelle Substanzbibliotheken generiert. Dieses Vorgehen ermöglichte es eine möglichst hohe Zahl verschiedener Phthalat- und Harnstoff-Derivate zu screenen. Simultan wurden dabei zahlreiche Moleküle generiert, die über eine größere Kettenlänge verfügen, wodurch Sie in der Lage sind die Ausrichtung des Tyr64 effektiver zu beeinflussen und damit die Stabilisierung der aktiven SOS-Konformation zu verhindern.

Das Enumeration-Tool erlaubt eine automatisierte funktionelle Diversifizierung eines Grundgerüsts durch die Substitution an definierten Positionen mit einer Vielzahl chemisch prädefinierter Reste. Bei den für die Substitution vorgesehenen Positionen handelte es sich zum einen um Hydroxy- und zum anderen um primäre Amin-Funktionen. Als chemisch prädefinierte Reste wurden der bereits in der postulierten Wirkhypothese verwendete Dimethoxyphthalat- sowie der aus Verbindung **127** abgeleitet Tryptophan-Rest verwendet. Auf diese Weise wurden zwei Substanzbibliotheken mit Dimethoxyphthalat-Monoestern bzw. -Monoamiden und zwei Bibliotheken mit Tryptophan-Harnstoffen bzw. -Carbamaten als Grundstrukturen generiert. Jede dieser vier Substanzbibliotheken umfasste ca. 300.000 virtuell generierte Liganden.

Alle Bibliotheken wurden anschließend einem virtuellen Hochdurchsatz-Screening unterzogen und die bestbewerteten Kandidaten anschließend mittels *Glide*-Docking zunächst im SP- und anschließend im XP-Modus auf die Mg-Bindestelle gedockt. Die Top Hits aus diesen Dockingläufen erzielten dabei bemerkenswerte Dockingscores zwischen -12.0 und -13.7 kcal/mol (Abb. 47a) und zeigten damit Bindungsaffinitäten im Bereich der besten pentacyclischen Triterpen-Derivate. Die repräsentative Verbindung **135** offenbarte einen Bindungsmodus, der in bemerkenswerter Weise dem der pentacyclischen Triterpene ähnelt: Es bildet sich erneut ein oktaedrisch koordinierter Komplex mit Mg^{2+} und GppNHP aus sowie eine charakteristische Wechselwirkung mit Met726 der SOS^{Rem}-Domäne (Abb. 47b). Die strukturelle Überlagerung sämtlicher Top-Hits ergab eine weitgehend identische Orientierung innerhalb der Bindetasche bei hoher Konformationsdeckungsgleichheit.

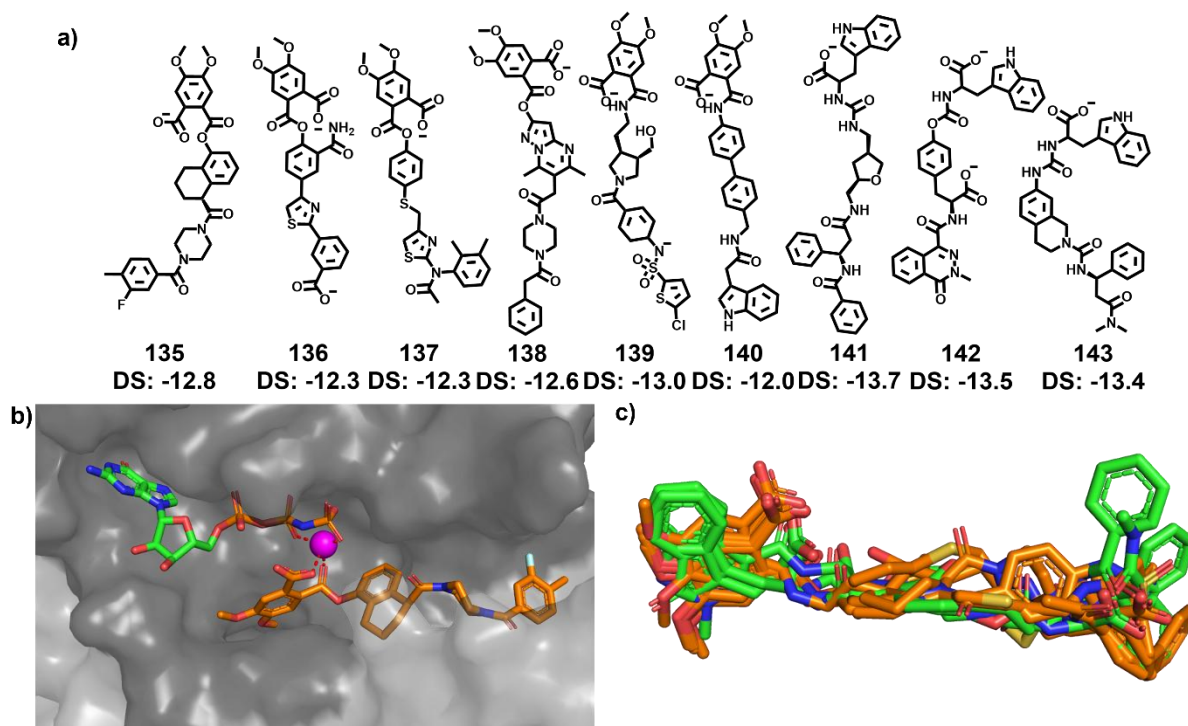


Abbildung 47: Docking Ergebnisse aus den Dockingläufen mit den über Enumeration generierten Substanzbibliotheken. a) Strukturen der Top-Hits aus allen vier Dockingläufen. b) Lage von Verbindung **135** in der Bindetasche. c) Überlagerung aller Top-Verbindungen (**135-143**). Orange Kohlenstoffe: Verbindungen aus den Dimethoxyphthalat-Bibliotheken; graue Kohlenstoffe: Verbindungen aus den Tryptophan-Bibliotheken.

Zur Validierung dieser Dockingergebnisse wurden exemplarisch die Verbindung **135** als Vertreter der Dimethoxyphthalat-Derivate und Verbindung **143** als Beispiel für die Tryptophan-Harnstoff-Derivate jeweils einer 300 ns umfassenden Moleküldynamik-Simulation unterzogen. Aus den resultierenden Trajektorien, bestehend aus insgesamt 600 Einzelkonfigurationen, wurden 300 repräsentative Frames für nachfolgende MM/GBSA-Berechnung ausgewählt.

Die Ergebnisse der MM/GBSA-Berechnung zeichnen zunächst ein ernüchterndes Bild. Bei der Auftragung der freien Bindungsenergie über die Simulationszeit zeigen sich zwei über den gesamten Simulationszeitraum hinweg stabile Cluster. Der erste, über ca 200 ns persisternde Cluster weist ungünstige Bindungsenergien zwischen 0 und 40 kcal/mol auf. Demgegenüber bildet sich in den letzten 100 ns ein zweiter, energetisch etwas günstigerer Cluster mit ΔG_{bind} -Werten zwischen 0 und -34 kcal/mol (Abb. 47a).

Diese Ergebnisse erscheinen bemerkenswert, da die berechneten Bindungsenergien deutlich geringer ausfallen, als es die in den ursprünglichen *in silico*-Dockingstudien erzielten sehr guten Dockingscores erwarten ließen. Für Verbindung **135** zeigt sich im

3. Ergebnisse und Diskussion

Verlauf der Simulation eine stetige Verbesserung der Bindungsenergien, sodass gegen Ende der Trajektorie zunehmend günstigere Werte erreicht werden (Abb. 48a).

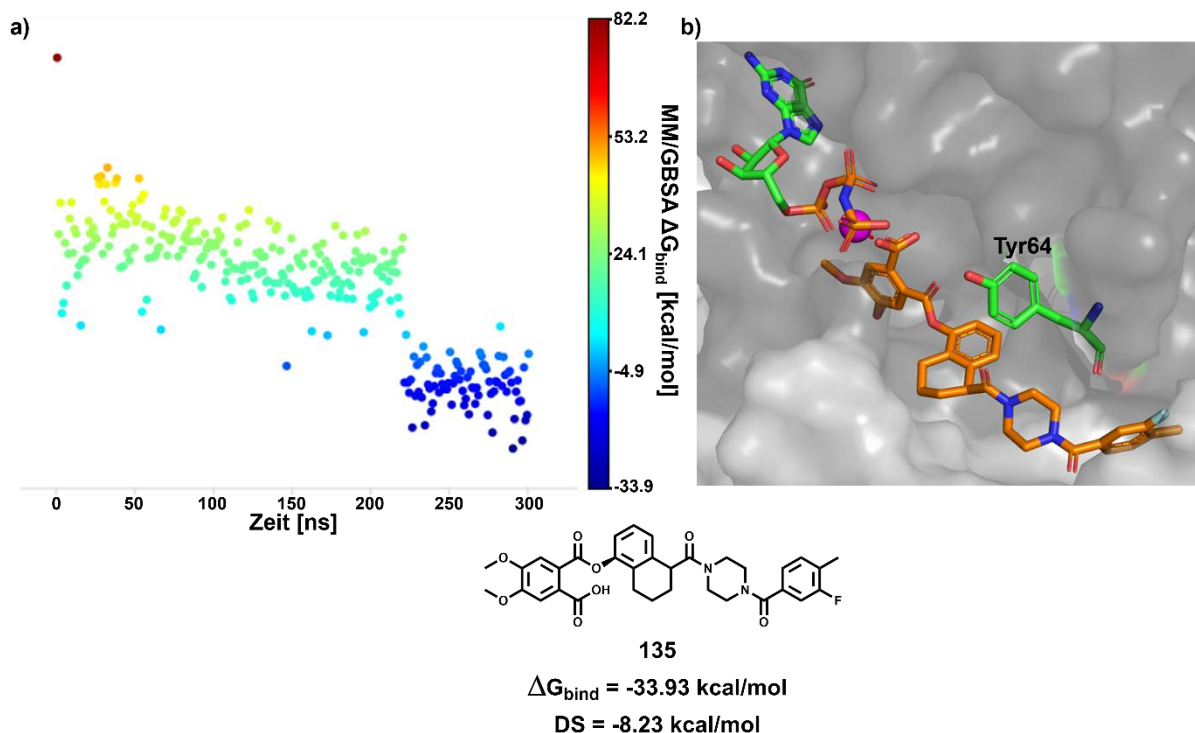


Abbildung 48: Ergebnisse der Moleküldynamik-Simulation von Verbindung **135** in der Mg-Bindetasche. a) Graphische Darstellung der Bindungsenergien über den Verlauf der 300 ns dauernden MD-Simulation. b) Bindungspose für die günstigste Bindungsenergie der MD-Simulation von Verbindung **135**. graue Oberfläche: SOS; dunkelgraue Oberfläche: KRas^{allo}; orange Kohlenstoffatome: Verbindung **135**.

Die Analyse der energetisch günstigsten Bindepose von Verbindung **135** zeigt überraschend, dass das Dimethoxyphthalat kein oktaedrisch koordiniertes Chelat zum zentralen Mg^{2+} -Ion ausbildet, sondern dieses lediglich über die Carbonsäure-Funktion koordiniert wird. Das Ausbleiben der zweizähligen Koordination dürfte maßgeblich zur insgesamt geringen Bindungsaffinität beitragen, da ein Chelat-Komplex eine deutlich stärkere Stabilisierung der Metallbindung vermitteln würde. Dennoch positioniert sich Verbindung **135** in der Bindefurche zwischen der SOS1-Oberfläche und Tyr64 von KRas^{allo} wodurch die Stabilisierung der aktiven SOS-Konformation blockiert wird (Abb. 48b). Ein auf diese Pose durchgeführtes *Glide*-Docking der Konformation mit $\Delta G_{\text{bind}} = -33.9 \text{ kcal/mol}$ ergab einen Dockingscore von -8.2 kcal/mol , der sich damit deutlich unter dem ursprünglichen Wert von -12.8 kcal/mol befindet.

Zur besseren Einordnung dieser Ergebnisse wurde die Benchmark-Verbindung MRTX-1133 (**29**) in ihrer Bindetasche einer MD-Simulation über 300 ns unterzogen. Auch hier wurden aus den resultierenden Trajektorien mit insgesamt 600 Einzelkonfigurationen, 300 repräsentative Frames einer nachfolgenden MM/GBSA-Berechnung

unterzogen. Auch für diesen hochpotenten Ras-Inhibitor, der den GDP/GTP-Austausch im pikomolaren Bereich inhibiert, resultierten geringere Bindungsaffinitäten als zu erwarten waren. Die ΔG_{bind} -Werte lagen überwiegend im Bereich von -65 und -85 kcal/mol und damit zwar klar im Bereich starker Affinitäten, jedoch energetisch deutlich ungünstiger als es für einen derart potenten Inhibitor zu erwarten wäre (Abb. 49). Das erneute *Glide*-Docking der stabilsten MD-Konformation ergab einem Dockingscore von -8.0 kcal/mol einen Wert, welcher deutlich schwächer als der ursprünglich berechnete Wert von -11.4 kcal/mol ist (vgl. Kap: 3.4.1, Abb. 3).

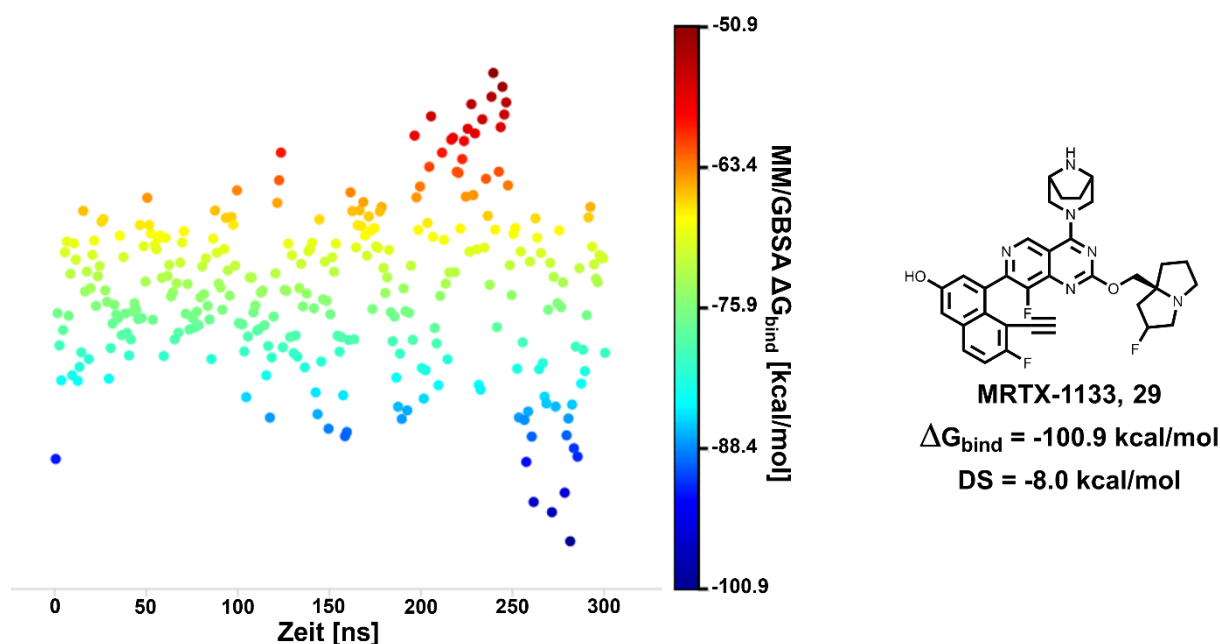


Abbildung 49: Graphische Darstellung der Bindungsenergien über die gesamte Simulationszeit der MD-Simulation für MRTX-1133 (29) in der S II Bindetasche sowie der Struktur mit dem günstigsten ΔG -Wert und dem dazugehörigen Dockingscore.

Diese Befunde zeigen, dass die durch MD-Simulationen ermittelten Bindungsenergien selbst für hochaffine Referenzinhibitoren wie MRTX-1133 (29) systematisch schwächer ausfallen können, als anhand der vorangegangenen Dockingstudien zu erwarten war. Bemerkenswerterweise liegt der rekalkulierte Dockingscore von Verbindung 135 (-8.2 kcal/mol) im gleichen Bereich wie der für MRTX-1133 (29) nach der MD-Simulation. Somit lässt sich aus den energetischen Parametern allein kein Rückschluss auf mangelnde Wirksamkeit von Verbindung 135 ziehen. Vielmehr legt der Vergleich nahe, dass dieses Derivat – analog zu MRTX-1133 – eine spezifische, dynamisch bevorzugte Bindekonformation einnehmen muss, damit seine inhibitorische Wirkung vollständig zur Geltung kommt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Moleküldynamik-Simulation von Verbindung **143** in der Mg^{2+} -Bindetasche zeigt ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu Verbindung **135**. Zwar lagen auch hier die berechneten Bindungsenergien überwiegend im schwachen Bereich, jedoch formierte sich ein über den gesamten Simulationsraum stabiler Cluster, der – abgesehen von wenigen Ausreißern – im Bereich von +10 bis -20 kcal/mol verblieb. Während somit der energetisch günstigste ΔG_{bind} -Wert weniger ausgeprägt ist als bei Verbindung **135**, weisen die Energien über den gesamten Verlauf eine deutlich höhere Konsistenz auf (Abb. 50a).

Die Analyse der energetisch bevorzugten Bindepose offenbart, dass auch Verbindung **143** keine oktaedrische Koordination des Mg^{2+} -Ions ausbildet, was die insgesamt schwachen Bindungsenergien erklärt. Im Unterschied zu Verbindung **135** koordinieren jedoch beide Sauerstoffatome der Carboxyfunktion an das Mg^{2+} -Kation. Diese zweizählige, wenn auch nicht chelatisierende Koordination könnte, die beobachtete konsistenten und im Mittel stabileren ΔG -Werte im Vergleich zum Derivat **135** erklären (Abb. 50b).

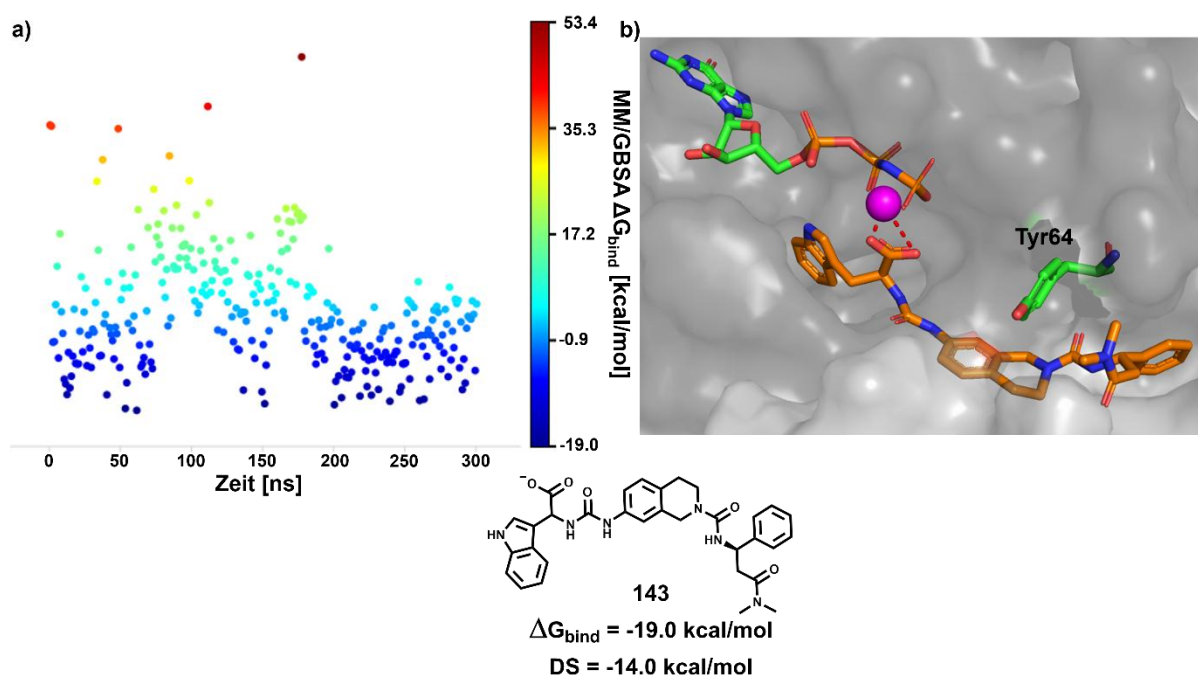


Abbildung 50: Darstellung der Ergebnisse der MD-Simulation für Verbindung **143**. a) Graphische Darstellung der Bindungsenergien aus den MM/GBSA-Rechnung über den gesamten Simulationszeitraum. B) Pose von Verbindung **143** in der Mg-Bindetasche mit der günstigsten Bindungsenergie von -19.0 kcal/mol. graue Oberfläche: SOS; dunkelgraue Oberfläche: KRas^{allo}; orange Kohlenstoffatome: Verbindung **143**.

Bemerkenswert ist, dass das nachfolgende *Glide*-Docking auf die günstigste Bindepose im Gegensatz zu Verbindung **135** und MRTX-1133 (**29**) zu einer Verbesserung des Dockingscores führte. Für das Tryptophan-Harnstoff-Derivat **143** wurde nach der

MD-Simulation ein Dockingscore von -14.0 kcal/mol erzielt (Abb. 50). Dieser Wert liegt somit über dem Score von GDP jedoch nach wie vor unter dem Wert des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons GppNHP (vgl. Kap. 3.4.4, Abb. 33b).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die identifizierten Leitstrukturen einen aussichtsreichen Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung darstellen. Im Gegensatz zu den pentacyclischen Triterpenen weisen die neu charakterisierten Verbindungen eine erhöhte strukturelle Flexibilität sowie ein erweitertes Spektrum polarer funktioneller Gruppen auf. Dadurch ergibt sich ein erheblich größeres Potenzial zur Optimierung pharmakologischer Eigenschaften und Selektivität. Sie bilden zudem eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Rational-Design-Strategien.

Die Ergebnisse Moleküldynamik-Simulationen deuten darauf hin, dass insbesondere Tryptophan-Harnstoff-Derivat das größte Potenzial zur Inhibition der Stabilisierung der aktiven SOS-Konformation besitzt.

3.5 Bicyclische Diterpene als vereinfachte Analoga von Betulinsäure?

Ein zentrales Strukturmerkmal pentacyclischer Triterpene ist ihr sterisch anspruchsvolles und rigide aufgebautes Kohlenwasserstoffgerüst. Diese ausgeprägte Molekülstarrheit verleiht den Verbindungen zwar eine bemerkenswerte thermodynamische Stabilität, führt jedoch zugleich zu einer mangelhaften konformativen Anpassung an eine Bindestelle.

3.5.1 Andrographolid als Leitstruktur?

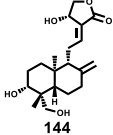
Ein erster Ansatz zur Überwindung dieser Limitierungen bestand in der gezielten Spaltung der zentralen Doppelbindung innerhalb des pentacyclischen Ringsystems der Ursolsäure. Diese Herangehensweise war chemisch jedoch nicht erfolgreich (vgl. Kap. 3.3.2, Tab. 3), weshalb im weiteren Verlauf alternative Strategien verfolgt wurden, die auf eine strukturelle Vereinfachung sowie eine Erhöhung der molekularen Flexibilität abzielten. Als zweiter Ansatz wurde daher die Untersuchung bicyclischer Diterpene als strukturell vereinfachter Analoga von Betulinsäure und verwandten pentacyclischen Triterpenen in Betracht gezogen.

In diesem Zusammenhang rückte insbesondere das bicyclische Labdan-Derivat Andrographolid (**144**) in den Fokus. Dieses Naturprodukt verfügt zusätzlich über eine terminale Laktonfunktion und ist in der Literatur als substrat-kompetitiver Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) beschrieben.^[318,319] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Andrographolid (**144**) mit verschiedenen molekularen Zielstrukturen interagiert, unter anderem durch kovalente Modifikationen von Proteinen wie NF- κ B oder Aktin.^[318,320]

Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten biologischen Assays zeigte Andrographolid (**144**) eine ausgeprägte inhibitorische Wirksamkeit. Im GDP/GTP-Austauschassay wurden IC₅₀-Werte im unteren mikromolaren Bereich bestimmt, wenngleich eine fünffach höhere Affinität gegenüber KRas4B^{WT} im Vergleich zu KRas4B^{G12D} beobachtet wurde. Darüber hinaus erwies sich die Verbindung im zellulären Viabilitätssassay (CellTiter-Glo) als wirksam: Sowohl in KRas-mutierten Zelllinien als auch in einer BRAF-mutierten KRas^{WT}-Zelllinie wurden IC₅₀-Werte zwischen 3.18 μ M und 10.1 μ M bestimmt (Tab. 16), was auf eine breit gefächerte zelluläre Aktivität schließen lässt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Biologische Daten für das bereits als Wirkstoff bekannte Diterpen Andrographolid (**143**) aus dem GDP/GTP-Austausch Assay und dem Cell Titer Glo Assay (IC₅₀).

Verbindung	KRas(WT)- SOS-GDP-Glo [μM]	KRas(G12D)- SOS-GDP-Glo [μM]	CTG SNU-1 (G12D) [μM]	CTG – NCI- H441 (G12V) [μM]	CTG – H358 (G12C) [μM]	CTG – A375 (BRAF) [μM]
 144	4.77 ± 3.51	23.9 ± 2.83	3.8*	10.1*	10.1*	7.51*

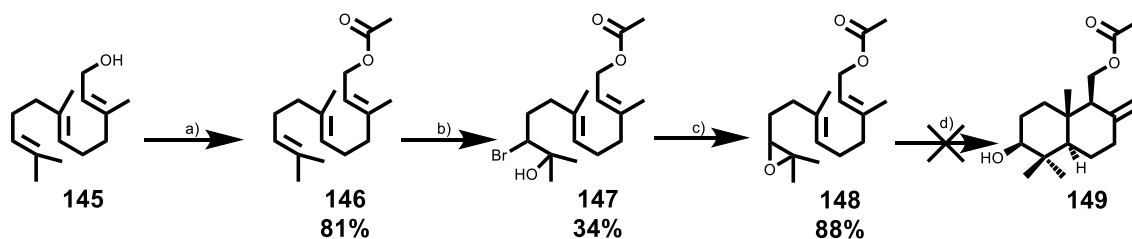
* Einzelmessung

Wie bereits anhand der A375-Zelllinie gezeigt werden konnte, besitzt Andrographolid auch für nicht Ras-induzierte Zellen eine gleichwertige Wirkung. Diese unspezifische zelluläre Wirksamkeit wurde zudem in mehreren weiteren Zelllinien beschrieben.^[321–324] Trotz dieser breiten, nicht selektiven ausgeprägten Wirkweise erschien es sinnvoll, auf Basis stark vereinfachter bicyclischer Analoga systematische Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erarbeiten.

3.5.2 Synthese eines bicyclischen Diterpens

Als Ausgangspunkt für diese Substanzreihe sollte das Diterpen **149** über eine literaturbekannte, vierstufige Syntheseroute ausgehend von Farnesol (**145**) synthetisiert werden (Schema 18). Die ersten drei Schritte der Synthese folgten der von HANZLIK ET AL beschriebenen Strategie zur selektiven Epoxidierung der terminalen Doppelbindung von Farnesol.^[325]

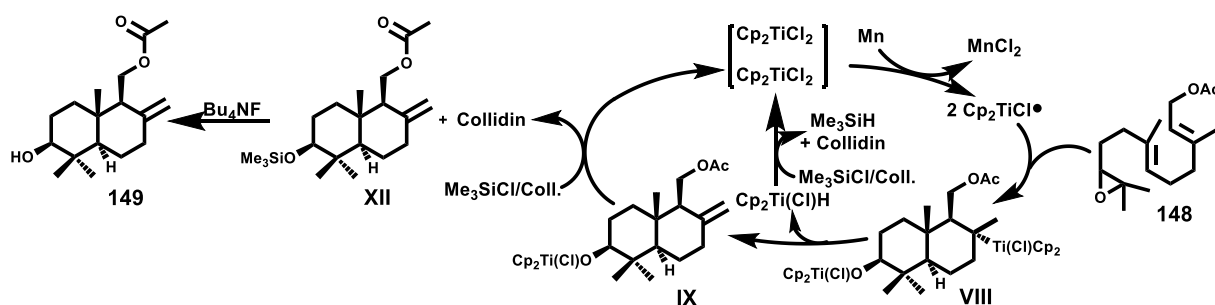
Zunächst wurde die primäre Hydroxyfunktion von Farnesol (**145**) durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin unter milden Bedingungen in das entsprechende Acetat **146** überführt (Ausbeute: 81%). Die zweite Stufe umfasste eine regioselektive Hydroxybromierung mittels N-Bromsuccinimid (NBS) in tert-Butanol/Wasser, aus der das gewünschte Farnesylbromohydrin **147** in 34% Ausbeute erhalten wurde. Dieses wurde anschließend mit einem Überschuss an Kaliumcarbonat in Methanol mit einer Ausbeute von 88% zum entsprechenden Epoxid **148** umgesetzt (Schema 18). Die analytischen Daten bestätigten die Bildung des terminalen Epoxids in Übereinstimmung mit den von HANZLIK berichteten Analytikdaten.^[325]



Schema 18: Syntheschema für die Synthese des bicyclischen Diterpens **149**. a) Pyridin, Ac₂O, Rt; b) NBS, *t*BuOH, H₂O, 0 °C→Rt; c) 1. K₂CO₃, MeOH, Rt; 2. Ac₂O, Pyridin, Rt; d) 1. Cp₂TiCl₂, Mn, 2,4,6-Collidin, Me₃SiCl, THF 2. TBAF, THF.

Im abschließenden Schritt der Synthese wurde eine Titanocen-katalysierte radikalische Zyklisierung nach dem Protokoll von JUSTÍCIA ET AL. durchgeführt.^[326] Hierzu wurde Titanocendichlorid (Cp₂TiCl₂) durch Reduktion mit Manganspänen unter Bildung von MnCl₂ in die reaktive Titanocen(III)-Radikalspezies überführt. Diese greift sowohl den Epoxidsauerstoff als auch die verbleibenden Doppelbindungen von **148** an und initiiert eine radikalische Kaskade, die in das zweifach titanocen-substituierte Zwischenprodukt **VIII** mündet. Unter Eliminierung von Cp₂Ti(Cl)H entsteht anschließend das terminale Alken **IX**.

Das eingesetzte Reagenzgemisch aus Trimethylsilylchlorid (Me₃SiCl) und Collidin erfüllt dabei eine doppelte Funktion: Zum einen wird der Titanocenether **IX** in den entsprechenden Silylether **XII** überführt, zum anderen ermöglicht es die Regeneration des aktiven Cp₂TiCl₂-Katalysators aus Cp₂Ti(Cl)H (Schema 19).^[326]



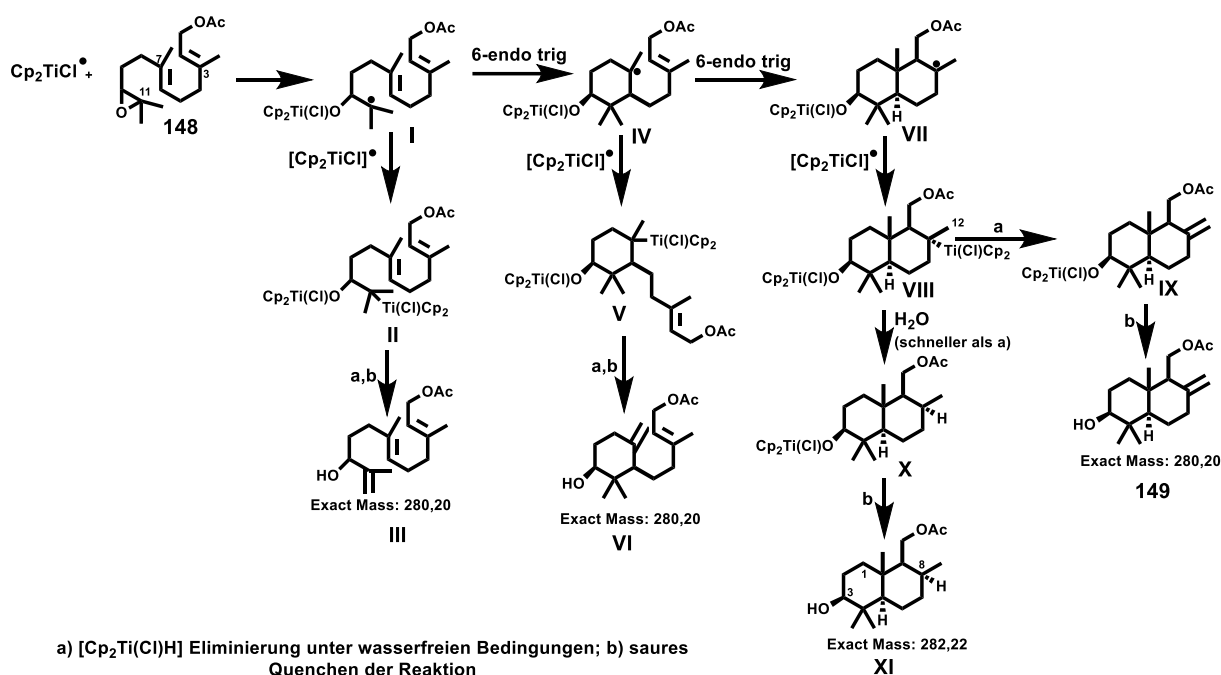
Schema 19: Schematische Darstellung des von JUSTÍCIA ET AL. postulierten Reaktionsmechanismus für die Titanocen-katalysierte Zyklisierung von Epoxyfarnesol (**148**).^[326]

Die Aufarbeitung und Isolierung des Zielprodukts erwiesen sich jedoch als erhebliche Herausforderung. Im Verlauf der radikalischen Zyklisierung entstand eine Vielzahl an Nebenprodukten mit gleicher bzw. sehr ähnlicher Molekülmasse zu dem Zielprodukt, wie durch HPLC-MS-Analysen bestätigt wurde. Die strukturelle und physikochemische Ähnlichkeit verhinderte eine effektive chromatographische Trennung. Weder die Säulenchromatographie auf Kieselgel, noch *Reversed-Phase*-Trennungen oder präparative Dünnschichtchromatographie führten zu einer zufriedenstellenden Isolierung des

3. Ergebnisse und Diskussion

gewünschten Produkts, obwohl dessen Molekülmasse mittels HPLC-MS identifiziert wurde.

Die Entstehung der im Rahmen der Titanocen-vermittelten radikalischen Zyklisierung beobachteten Nebenprodukte lässt sich mechanistisch schlüssig durch die zugrunde liegende Kettenreaktion erklären. Aufgrund der hohen Reaktivität des Titanocen(III)-Radikals besteht während des gesamten Zyklisierungsprozesses die Möglichkeit einer Wechselwirkung mit unterschiedlichen Zwischenstufen der Polyen-Kette, wodurch konkurrierende Reaktionspfade initiiert und unerwünschte Kettenabbrüche hervorgerufen werden können. Diese Nebenreaktionen wurden von JUSTICIA ET AL. bereits bei Anwesenheit geringster Wassermengen während der Reaktionsführung beschrieben. Ihr Auftreten führte zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Aufreinigung des Zielprodukts und ging zugleich mit einer signifikanten Verringerung der isolierten Ausbeute einher (Schema 20).^[326]



Schema 20: Schematische Darstellung der von JUSTICIA ET AL. identifizierten und publizierten möglichen radikalischen Nebenreaktionen während der Titanocen-katalysierten Zyklisierung von Epoxyfarnesol (147) zu dem Diterpen 148.^[326]

Durch die Durchführung der Reaktion unter strikt wasserfreien Bedingungen gelang es JUSTICIA ET AL., die Bildung der beschriebenen Nebenprodukte weitgehend zu unterdrücken und zugleich die Ausbeute des Zielprodukts signifikant zu steigern.^[326] Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Nebenprodukte der Zyklisierungsreaktion sind da-

her plausibel auf Spuren von Wasser zurückzuführen, die trotz sorgfältiger Arbeitsweise nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten. Eine konsequente Reaktionsführung in einer Glove-Box – beginnend mit dem Abwiegen der Edukte bis hin zur vollständigen Durchführung der Umsetzung – war unter den gegebenen Möglichkeiten jedoch nicht realisierbar.

Die experimentelle Evaluierung alternativer Zyklisierungsbedingungen, etwa unter Verwendung von ZrCl_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oder der Supersäure $\text{HSO}_3\text{F} \cdot \text{SO}_2\text{FCl}$, konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr umgesetzt werden.^[327,328] Aufgrund dieser Faktoren wurde dieses Teilprojekt nicht erfolgreich zum Abschluss gebracht.

4. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue KRas4B-Inhibitoren auf der Basis von pentacyclischen Triterpenen zu identifizieren. Diese neuen Leitstrukturen für die Entwicklung von Ras-Inhibitoren wurden zugänglich gemacht, indem die Naturstoffgerüste gezielt chemisch modifiziert wurden.

Als Ausgangsverbindungen dienten die natürlich vorkommenden Grundgerüste Betulin und Betulinsäure (Lupane) sowie Oleanol- und Ursolsäure (Oleane bzw. Ursane). Diese wurden durch klassische Funktionalisierungsstrategien – darunter Acylierungen, Ester- und Amidkupplungen sowie Oxidationen – gezielt modifiziert. Weitere Derivatisierungen erfolgten über die Einführung von Dicarbonsäureanhydriden, Hydroxamsäuren, Tetrazolen und Heteroarylsubstituenten an den Alkohol- und Carbonsäurefunktionen.

Durch diese Ansätze gelang die Erstellung einer Bibliothek sowohl literaturbekannter als auch bislang unbeschriebener Derivate. Besonders hervorzuheben ist die Einführung verschieden substituierter Phthalatgruppen in Position 3, die sich in nachfolgenden biologischen Assays als strukturmodulierende Schlüsselvariation erwies. Bisher waren lediglich unsubstituierte Phthalatester pentacyclischer Triterpene mit einer allgemeinen zytotoxischen Wirkung beschrieben.^[257,329] Die systematische Variation der drei Grundgerüsttypen bildete die Grundlage für eine differenzierte Struktur–Wirkungs-Analyse und ermöglichte die gezielte Untersuchung bioisosterer Konzepte zur Optimierung potenzieller Proteininteraktionen.

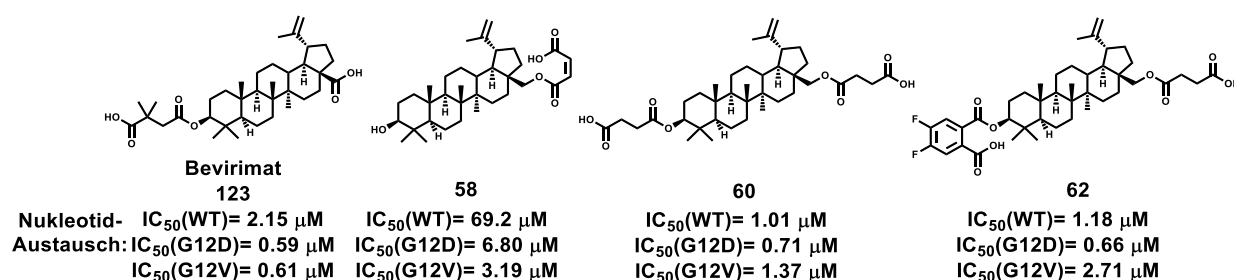


Abbildung 51: Strukturen und IC₅₀-Werte der potentesten Verbindungen im GDP/GTP-Austauschassay.

Die synthetisierten Derivate wurden in einer Reihe biologischer Assays hinsichtlich ihrer Aktivität als potenzielle KRas4B-Inhibitoren untersucht. Im primären GDP/GTP-Austauschassay zeigte sich, dass insbesondere Dimethoxyphthalat- und Difluorphthalat-Substituenten in Position 3 eine signifikante Steigerung der Aktivität bewirkten. Die IC₅₀-Werte der besten Verbindungen lagen im niedrigen mikromolaren

Bereich. Einige Verbindungen wie Bevirimat (**123**) oder die Betulin-Derivate **58**, **60** und **62** erreichten sogar Werte bis in den nanomolaren Bereich gegen die G12D-Mutante. Bemerkenswerterweise inhibierten diese Verbindungen auch die klinisch relevante G12V-Mutante – die aufgrund ihrer unreaktiven Seitenkette besonders schwierig zu adressieren ist – mit IC₅₀-Werten im niedrigen Mikromolarbereich (~1-3 µM) (Abb. 51).

Die SAR-Analysen belegten ebenfalls die essenzielle Rolle der Carboxygruppe in Position 28 sowie der Hydroxygruppe in Position 3. Deren Maskierung durch Veresterung oder Reduktion führte durchweg zum Verlust der Aktivität.

Vertiefende Analysen mittels NanoBRET-, HTRF- und SPR-Assays zeigten, dass die Triterpen-Derivate den GDP/GTP-Austausch an KRas4B hemmen, jedoch nicht über die direkte Destabilisierung der KRas4B:SOS-Interaktion. Zudem unterdrückten die Derivate die Akt-Phosphorylierung in KRas^{G12D}-mutierten Zelllinien signifikant während die KRas^{WT}-Zelllinie unbeeinflusst blieb – ein Nachweis einer selektiven Modulation der Ras-PI3K-PDK1-Akt-Kaskade.

Zur Aufklärung der molekularen Bindungsmodi wurden zunächst umfangreiche Docking-Studien durchgeführt. Hierbei kristallisierte sich schnell heraus, dass die Derivate pentacyclischer Triterpene aufgrund ihrer großen, wenig flexiblen sowie eher unpolaren Struktur nicht in der Lage sind in die klassischen, literatur bekannten Bindestellen sowohl an Ras als auch an SOS zu binden.

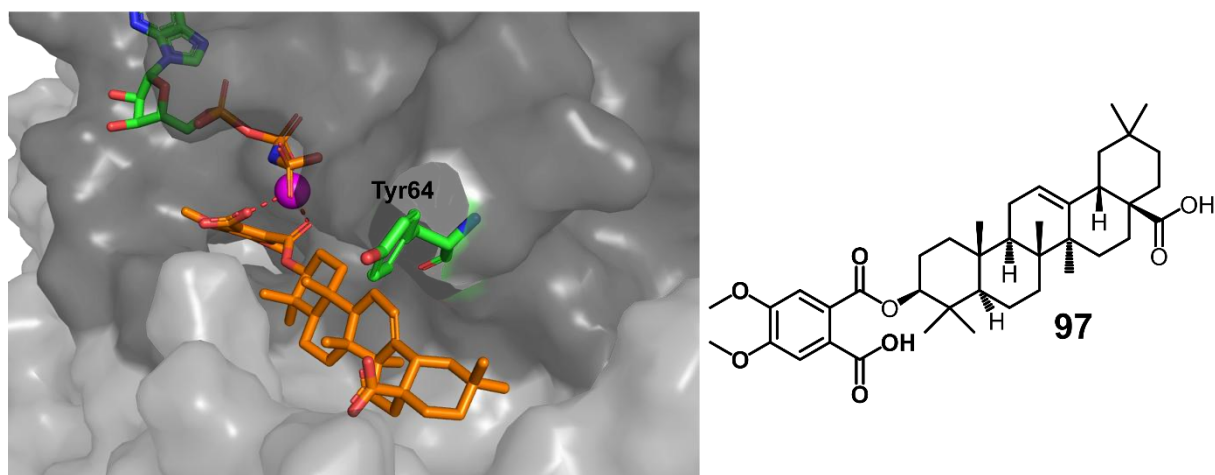


Abbildung 52: Lage des Dimethoxyphthalat-Oleanolsäure-Derivats **97** in der Mg-Bindestelle. Gut zu sehen ist wie Verbindung **97** die Wechselwirkungen zwischen der SOS1-Oberfläche und Tyr64 von KRas^{allo} unterbricht. graue Oberfläche: SOS1; dunkelgraue Oberfläche: KRas^{allo}; orange Kohlenstoffatome: Oleanolsäure-Derivat **97**.

Als Schlussfolgerung daraus wurden anschließend die Interaktionsflächen zwischen SOS1 und KRas näher untersucht. An der KRas4B^{kat}:SOS-Protein-Protein-

Grenzfläche wurden mit den Dimethoxyphthalat-Derivaten von Oleanolsäure (**97**) und Betulinsäure (**119**) erstmals günstigere Dockingscores von -5.4 bis -6.9 kcal/mol erzielt werden.

Diese Ergebnisse konnten an der KRas4B^{allo}:SOS-Bindetasche noch einmal deutlich gesteigert werden. Hier erreichten die Dimethoxyphthalat-Derivate Dockingscores von bis zu -12.2 kcal/mol (**84**), womit sie in den Bereich hochpotenter niedermolekularer Inhibitoren vordringen.

Die Interaktion erfolgte insbesondere über Reste der SOS-Rem-Domäne (Met726, Lys727, Lys728), wobei insbesondere die Chelatisierung des Mg²⁺-Ions durch den Phthalsäure-Rest eine zentrale Rolle in der Wirkhypothese einnimmt. Die inhibitorische Wirkung der pentacyclischen Triterpene ist dabei auf die Störung der Interaktion des Tyr64 von KRas^{allo} mit der SOS1-Oberfläche zurückzuführen. Die Wechselwirkung von Tyr64 mit der SOS-Oberfläche ist maßgeblich für die Stabilisierung einer katalytisch aktiven SOS-Konformation verantwortlich (Abb. 52).

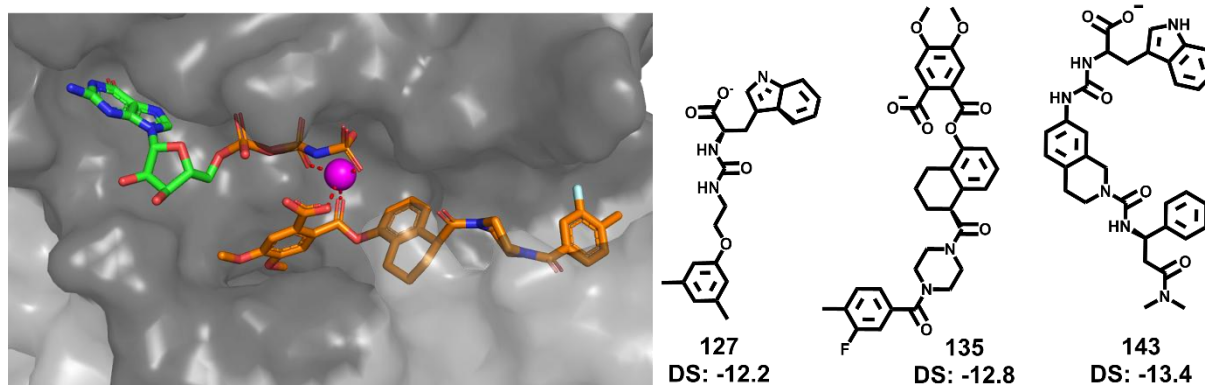


Abbildung 53: Pose des, durch das Enumeration-Tool von Schrödinger generierten, potenziellen Inhibitors **135** in der neu entdeckten Bindetasche sowie die Strukturen und Dockingscore des Top-Hits aus der Enamine Hit Locator Library (**127**) und der Top Verbindungen aus der Reihe der generierten Dimethoxyphthalat-Derivate (**135**) und der Tryptophan-Harnstoff-Derivate (**143**).

Aufbauend auf der hier entwickelten Wirkhypothese erfolgten virtuelle Hochdurchsatz-Screenings mit ca. 2 Millionen Verbindungen, deren Ziel die Identifizierung von *drug-like* Leitstrukturen mit erhöhter Flexibilität und optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften war. Die besten Ergebnisse dieser Screenings wurden mit weiteren *in silico*-Methoden tiefergehend untersucht. Diese Studien lieferten unter anderem die drei in Abbildung 53 gezeigten Verbindungen **127**, **135** und **143** mit Dockingscores die mindestens so potent wie die der besten Derivate pentacyclischer Triterpene waren (Abb. 53).

5. Experimentalteil

5.1 Computerchemische Methoden

5.1.1 *In silico* Docking

Sämtliche Berechnungen wurden unter Verwendung der *Molecular Modeling Software* Maestro (Version 11.5, Schrödinger LLC) durchgeführt. Für die *in silico*-Dockingstudien erfolgte die Ligandenvorbereitung mithilfe des LigPrep-Moduls. Die Protonierungszustände sowie mögliche Tautomere der Liganden wurden unter Berücksichtigung eines pH-Werts von ± 2 mit dem Programm Epik berechnet.

Die Rohdaten der Proteinstrukturen, basierend auf den PDB-Kristallstrukturdaten, wurden mit dem *Protein Preparation Wizard* für *in silico*-Dockingstudien optimiert. Fehlende Aminosäureseitenketten und *Loops* wurden dabei unter Einsatz des Moduls Prime ergänzt. Die Optimierung von Protonierungs- und Tautomerisierungszuständen erfolgte ebenfalls mittels Epik, hierbei wurde ein pH-Wert-Fenster von ± 1 berücksichtigt. Nach Entfernung aller Wassermoleküle, die sich in einer Distanz von mehr als 5 Å von schweren Atomen befanden, wurde das Protein mit einer Energieberechnung unter Anwendung des OPLS2005-Kraftfelds bis zu einer RMSD-Konvergenz von $\pm 0,3$ Å minimiert.

Für die anschließenden *in silico*-Dockingstudien kam das Glide-Modul (SP-Modus, *standart precision*; XP-Modus, *extra precision*) aus der Schrödinger-*Modelingsuite* (Version 2018) unter Verwendung der Standardeinstellungen zum Einsatz.

5.1.2 MM-GBSA-Berechnungen

Die MM-GBSA-Berechnungen wurden unter Verwendung des Moduls *Prime*, Bestandteil der Schrödinger-*Modelingssuite* (Version 2018), durchgeführt. Im ersten Schritt wurde ein Ensemble energetisch begünstigter Konformere des jeweiligen Liganden generiert. Hierzu kam eine kombinierte *Torsional / low mode sampling* Methode mittels der *conformational search* Funktion (CSearch) des Macromodel-Moduls zum Einsatz (Standardparameter, maximale Schrittzahl: 100).

Im Rahmen dieser Konformationssuche wurden jeweils zwischen 60 und 90 verschiedene Konformere identifiziert. Diese wurden anschließend durch Superposition im aktiven Zentrum der Zielstruktur vororientiert.

Für sämtliche MM-GBSA-Berechnungen galten die folgenden Randbedingungen: als Solvatisierungsmodell wurde VSGB verwendet; als Kraftfeld kam OPLS2005 zur Anwendung; eine Flexibilität des Proteinrückgrats wurde nicht berücksichtigt (Protein-Flexibilität: 0 Å).

5.1.3 Molekulardynamik-Simulation

Die Molekulardynamik-Simulation (MD) der Verbindung **90** wurde unter Verwendung des Simulationsmoduls Desmond, Bestandteil der Schrödinger *Molecular Modeling Suite*, durchgeführt. Die Simulationsbedingungen gestalteten sich wie folgt: als Geometrie des Simulationskastens wurde eine orthorhombische Box gewählt; als Solvensmodell kam SPC (Simple Point Charge) zur Anwendung; das umgebende Medium bestand aus einer 0.15 M NaCl-Lösung. Die Gesamtsimulationsdauer betrug 500 Nanosekunden, wobei die Trajektorien in Intervallen von 250 Pikosekunden aufgezeichnet wurden. Die Temperatur wurde konstant bei 300 K und der Druck bei 1.01325 bar gehalten.

Für die MD-Simulationen der Verbindungen **135**, **143** und MRTX-1133 (**29**) galten dieselben Bedingungen, jedoch betrug die Simulationsdauer 300 ns, wobei die Trajektorien in Intervallen von 500 pikosekunden aufgezeichnet wurden.

5.2 Biologische Assays

5.2.1 Nukleotid Austausch Assay

Inaktives, GDP-gebundenes KRas-Protein wurde mit SOS1 und GTP inkubiert. Im Verlauf dieser Reaktion wird KRas in seinen aktiven, GTP-gebundenen Zustand überführt, wobei GDP freigesetzt wird. Das gebundene GTP wird auch in Abwesenheit des entsprechenden GAP-Proteins (GTPase-aktivierendes Protein) hydrolysiert, wodurch erneut GDP entsteht.

Zur Quantifizierung des freigesetzten GDP wurde der GDP *GloBioluminescent GDP Detection Assay* für Glycosyltransferasen (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. In diesem Assay wird GDP in ATP umgewandelt, das anschließend über eine Luciferase/Luciferin-vermittelte Reaktion detektiert wird. Das entstehende Lumineszenzsignal wurde mit einem geeigneten *microplate reader* gemessen. Der Assay wurde sowohl für Wildtyp-KRas als auch für die Mutanten G12D und G12V etabliert.

Für jede Probe wurden 5 µl einer KRas-Arbeitslösung in Assay-Puffer (50 mM HEPES, pH = 7.5; 4 mM MgCl₂; 2 mM EGTA; 0.01% Brij35; 1 mM TCEP) in eine geeignete *microplate* (z. B. Greiner #784075) pipettiert. Anschließend wurde die Prüfsubstanz mithilfe eines Echo-Akustikdispensers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) in einer Konzentrationsreihe von 3000 µM bis 3 µM (achtstufige Verdünnungsreihe) zugegeben. Nach Zugabe von 5 µl eines SOS1-GTP-Gemisches im Assay-Puffer wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 µl des GDP-Nachweisreagenzes hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation bei Raumtemperatur über eine Stunde wurde das Lumineszenzsignal mit einem EnVision-Spektrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) erfasst. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte aus den sigmoiden Dosis-Wirkungskurven mithilfe der Software Quattro Workflow (Quattro GmbH, München, Deutschland).

Zur Identifizierung von Substanzen, die unspezifisch mit dem Nukleotidaustausch-Assay interferieren – das heißt unabhängig von KRas und SOS1 – wurde ein Kontrollassay entwickelt. Hierzu wurde GDP titriert und mit demselben GDP Glo™ Assay detektiert, für die Erzeugung eines Lumineszenzsignal vergleichbar mit dem positiven Kontrollwert des Nukleotidaustausch-Assays. Die zu testenden Substanzen wurden anschließend im selben Konzentrationsbereich wie im Hauptassay auf mögliche Interferenzen geprüft.

Für jede Probe wurden 10 µl einer GDP-Lösung (Endkonzentration im Assay: 125 nM) im oben genannten Assay-Puffer in eine geeignete *microplate* (z. B. Greiner #784075) überführt. Die Prüfsubstanzen wurden erneut mithilfe eines Echo-Akustikdispensers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) in einer Konzentrationsreihe von 3000 µM bis 3 µM (achtstufige Verdünnung) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 10 µl des GDP-Nachweisreagenzes zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte die Messung des Lumineszenzsignals mit einem EnVision-Spektrophotometer. Die IC₅₀-Werte wurden wie zuvor beschrieben mit der Software Quattro Workflow berechnet.

5.2.2 CellTiter-Glo Assay

Der CellTiter-Glo Lumineszenz-Zellviabilitätsassay (Promega) ist ein homogenes Verfahren zur Bestimmung der Vitalität von Zellen in Zellkulturen, welches auf der Quantifizierung von ATP basiert – einem Indikator für metabolisch aktive Zellen. Pro Well wurden 2.5 µl einer Zell-Suspension in einer Zelldichte pipettiert, die eine lineare Korrelation zwischen Zellanzahl und Signalintensität gewährleistet. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ wurden die in DMSO gelösten Testverbindungen in verschiedenen Konzentrationen mithilfe der Echo Liquid Handling Technologie zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in befeuchteten Inkubationskammern weiter kultiviert. Als Positivkontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen, während mit 10 µM Staurosporin behandelte Zellen als Negativkontrollen herangezogen wurden.

Nach 5-72 Stunden Inkubationszeit wurde das CellTiter-Glo-Reagenz gemäß den Herstellerangaben (Promega Inc.) zubereitet. Vor der Messung wurden die Platten auf Raumtemperatur äquilibriert. Das Reagenz-Medium-Gemisch wurde in äquivalentem Volumen zum Zellmedium in jedes Well gegeben. Die Platten wurden bei etwa 300 rpm für zwei Minuten auf einem orbitalen Schüttler bewegt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zur Gewährleistung der vollständigen Stabilisierung des Lumineszenzsignals.

Die Messung erfolgte mittels eines *Victor Microplate Readers* (PerkinElmer) mit einer Integrationszeit von 200 ms. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der XLFit-Software unter Anwendung der sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve (Fit 205) zur Bestimmung der jeweiligen IC₅₀-Werte.

Zur Qualitätssicherung wurde der sogenannte Z'-Faktor auf Grundlage von jeweils 16 Messwerten der positiven und negativen Kontrollen berechnet. Ausschließlich Assays, deren Z'-Faktor einen Wert von ≥ 0.5 aufwiesen, wurden für die weiterführende Auswertung herangezogen.

5.2.3 HTRF Akt/Erk-Phosphorylierungs Assay

SNU-1-Zellen, die die KRas^{G12D}-Mutation (primäres Karzinom des Magens) tragen, wurden in RPMI-Medium kultiviert, ergänzt mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) und 1% L-Glutamin. Zur Durchführung des Versuchs wurden die Zellen in weiße 384-Well-

microplates mit kleinem Volumen (Greiner Bio-One GmbH) bei einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well in 6 µl RPMI-Medium (serumfrei, mit 1% L-Glutamin) ausgesät. Anschließend wurden die Platten für drei Stunden in einen Inkubator mit hoher Luftfeuchtigkeit (37 °C, 5% CO₂, 90% relative Luftfeuchtigkeit) überführt. Auf diese Weise wurde einer Verdunstung des geringen Mediumvolumens vorgebeugt.

Die Behandlung der Zellen erfolgte mittels eines Echo520 *Liquid Handling Systems*. Dabei wurde eine dreifache 8-Punkte-Serienverdünnung der Testsubstanzen mit einer maximalen Endkonzentration von 330 µM und einem Endanteil von 1% DMSO auf die Zellen aufgebracht. Nach Transfer der Substanzen wurden die Zellen für eine Stunde unter denselben Inkubationsbedingungen weiter inkubiert, bevor sie mit 3 µl einer 9 nM EGF-Lösung in serumfreiem Medium behandelt wurden (entspricht einer Endkonzentration von 3 nM EGF pro Well) und für 15 Minuten inkubiert wurden.

Zur Zelllyse wurde der Lysepuffer aus dem Phospho-Erk 1/2 (Thr202/Tyr204)- sowie dem Total Erk 1/2 LANCE Ultra TR-FRET *Cellular Detection Kit* (PerkinElmer Inc.) auf die vierfache Konzentration in Wasser verdünnt. Anschließend wurden 3 µl dieses Lysepuffers pro Well zugegeben, gefolgt von einem Schütteln der Platten bei 300 rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Während dieser Inkubationszeit wurde die Antikörper-Detektionslösung gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Im abschließenden Schritt wurden 3 µl dieser Lösung pro Well hinzugegeben. Die Platten wurden anschließend mit aluminiumbeschichteter Klebefolie versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur (20 Stunden) inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels eines EnVision 2104 *Multilabel Readers*.

5.2.4 NanoBRET Target Engagement Assay

Der NanoBRET *Target Engagement* (TE) Assay zur intrazellulären Bindungsanalyse von Ras basiert auf der NanoBiT®-Technologie, einem strukturellen Komplementierungssystem, das aus einer großen Luciferase-Untereinheit (LgBiT) und einem komplementären Peptid (SmBiT(q)) besteht. In diesem Assay werden in Zellen zwei Fusionsproteine koexprimiert: eines aus LgBiT und *full-length* Ras sowie eines aus SmBiT(q) und ebenfalls *full-length* Ras. Kommt es zur Interaktion bzw. Multimerisierung der Ras-Proteine, lagern sich LgBiT und SmBiT(q) räumlich aneinander und rekonstituieren eine enzymatisch aktive Luciferase, die als BRET-Donor fungiert. Als Akzeptor dient ein zellgängiger fluoreszenter NanoBRET-Tracer, der spezifisch an Ras

bindet. Wird eine testweise eingesetzte Substanz durch Ras gebunden, verdrängt sie den Tracer, was sich in einem dosisabhängigen Verlust des BRET-Signals äußert.

Zur Durchführung des Assays wurden HEK293T-Zellen mit den Fusionsvektoren LgBiT-KRas4B^{G12D} und SmBiT-KRas4B^{G12D} unter Anwendung des Standardprotokolls für das *Mirus LT1 TransIT Transfection Reagent* transfiziert. Es wurden 9 µl einer Zelllösung mit 2.160 Zellen pro Well in geeignete Assayplatten (Greiner #784080) überführt und für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Testsubstanzen wurden anschließend in einem geeigneten Konzentrationsbereich (100 µM bis 0.025 µM; 8-Punkte-Verdünnung) mittels eines akustischen Dispensers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) unter Verwendung der *Echo Dose Response* Software aufgebracht. Nach einer Mischphase von einer Minute und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 µl des NanoBRET TE Ras Tracer 01 (Endkonzentration 1 µM) zugegeben, gefolgt von einem weiteren Mischschritt.

Die Inkubation erfolgte anschließend für 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂, gefolgt von einer 15-minütigen Temperierung bei Raumtemperatur. Danach wurden 5 µl des NanoBRET™ Nano-Glo®-Substrats zugegeben und erneut gemischt. Nach einer Dunkelinkubation von 10-30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das BRET-Signal bei Emissionswellenlängen von 460 nm und 645 nm unter Verwendung eines EnVision *microplate readers* (Revvity, Waltham, MA, USA) erfasst. Die IC₅₀-Werte wurden anhand der sigmoiden Dosis-Wirkungskurven mit der Software *Scigilian Analyze* (Scigilian, Montreal, Kanada) berechnet.

5.2.5 HTRF KRas^{WT}:SOS Protein-Protein Interaktionsassay

Zur Evaluierung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Interaktion zwischen KRas (Wildtyp) und dem *Son of Sevenless* Homolog 1 (SOS1) wurde ein kommerziell erhältlicher HTRF-basierter Protein-Protein-Interaktionsassay (Produktcode: 64KRAS-WTPEG, Revvity) verwendet. Der Assay beinhaltet markierte humane rekombinante Proteine (KRas^{WT} und SOS1) sowie fluoreszenzmarkierte Anti-Tag-Antikörper zur Detektion mittels HTRF (*Homogeneous Time-Resolved Fluorescence*). In Abwesenheit der Inhibitoren bindet GTP-beladenes KRas^{WT} an SOS1, wobei die gleichzeitige Erkennung der beiden markierten Partner durch spezifische Antikörper einen messbaren HTRF-Signaltransfer erzeugt. Bei Vorhandensein von Inhibitoren der KRas^{WT}:SOS1-

Interaktion oder GTP-Kompetitoren wird diese Bindung gestört, was sich in einer Reduktion des HTRF-Signals manifestiert.

Für jede Messung wurden zunächst 1.5 µl Assaypuffer und 3 µl des Tag2-markierten SOS1-Proteins in eine geeignete Mikrottestplatte (Corning #4513) pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Testsubstanz in einem Konzentrationsbereich von 50 µM bis 0.115 µM (8-Punkte-Serienverdünnung) mittels eines Echo-Akustik-Dispensers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 3 µl des Tag1-markierten KRas-Proteins zugegeben, gefolgt von 7.5 µl eines Detektionsmixes, der Anti-Tag2-Antikörper, markiert mit Terbium-Kryptat, sowie Anti-Tag1-Antikörper, markiert mit XL665, enthielt.

Nach einer weiteren Inkubation über 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde das HTRF-Signal mittels eines EnVision Mikroplattenlesegeräts (Revvity, Waltham, MA, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm sowie Emissionswellenlängen von 665 nm und 615 nm detektiert. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse der sigmoiden Dosis-Wirkungskurven unter Verwendung der Software *Scigilian Analyze* (Scigilian, Montreal, Kanada).

5.3 Allgemeine Angaben zur Laborpraxis

5.3.1 Reagenzien, Lösungsmittel und Laborgeräte

In sämtlichen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurden kommerziell erworbene Reagenzien verwendet, die von den folgenden Anbietern bezogen wurden: Alfa Aesar, Thermo Fisher, Fisher Scientific, ABCR, Sigma-Aldrich, TCI, Chempur, VWR, Enamine sowie BLD. Sofern es die experimentellen Anforderungen notwendig machten, wurden die eingesetzten Substanzen vor ihrer Verwendung durch geeignete Reinigungsverfahren wie Kristallisation, Destillation oder andere etablierte Methoden aufgereinigt.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden entweder in analytisch reiner Qualität bezogen oder gemäß etablierten Verfahren zuvor getrocknet und gereinigt. Bei der Notwendigkeit trockener Lösungsmittel (Dichlormethan, Tetrahydrofuran, Acetonitril, Diethylether) erfolgte deren Entnahme aus einem Lösungsmittelreinigungssystem des Typs MB-SPS-800 (MBraun), wodurch höchste Reinheitsstandards gewährleistet wurden.

Dimethylformamid (DMF) wurde vor der Verwendung durch Entgasung mit Helium behandelt; auf diese Weise wurde enthaltenes Dimethylamin zuverlässig entfernt.

Zur Entfernung flüchtiger Lösungsmittel wurden Rotationsverdampfer der Firmen IKA GmbH & Co. KG sowie Büchi Labortechnik GmbH in Kombination mit Vakuumpumpen der Firma Vacuubrand eingesetzt. Zur Gefriertrocknung wässriger Lösungen kam eine Lyophilisationsanlage des Typs GOT2000 der Firma Zirbus zum Einsatz.

Für Wasser- und Sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden sämtliche Glasgeräte zunächst in einem Trockenschrank vorgetrocknet. Anschließend wurden sie mehrfach im Vakuum ausgeheizt. Zur Durchführung dieser Reaktionen wurden klassische Schlenk-Techniken unter Argon- oder Stickstoff-Atmosphäre angewandt.

Die Durchführung von Reaktionen bei niedrigen Temperaturen fand in Dewar-Gefäßen statt, die mit einem Wasser-Eis-NaCl-Gemisch (0 °C), Aceton/Trockeneis (ca. -78 °C) oder EtOAc/flüssiger Stickstoff (-84 °C) befüllt waren. Reaktionen bei hohen Temperaturen wurden in Ölbädern mit Paraffinöl durchgeführt. Die jeweilige Temperatur wurde über Kontaktthermometer eingestellt.

5.3.2 Chromatographische Methoden

Die Durchführung von Dünnschichtchromatographien (DC) erfolgte auf Kieselgelplatten der Firma MACHERY NAGEL (60F-254) oder auf *reversed phase* Kieselgelplatten (Silica gel 60, RP-18, F254, MERCK). Die Visualisierung der Substanzen auf den DC-Platten wurde durch das Anfärben mit wässrigen Lösungen aus 2.0 g Cer(IV)-sulfat, 5.0 g Molybdätophosphorsäure, 16 ml Schwefelsäure sowie 200 ml H₂O oder aus 3.0 g Kaliumpermanganat, 20 g Kaliumcarbonat, 5.0 ml Natriumhydroxid-Lösung (w = 5%) und 300 ml H₂O ermöglicht.

Die Aufreinigung mittels präparativer DC erfolgte auf SIL G-200 UV254 Kieselgelplatten der Firma CARL ROTH mit einer Schichtdicke von 2.0 mm. Die Visualisierung der Substanzen auf den präparativen DC-Platten wurde durch das Anfärben mit einer wässrigen Lösung aus 2.0 g Cer(IV)-sulfat, 5.0 g Molybdätophosphorsäure, 16 ml Schwefelsäure sowie 200 ml H₂O ermöglicht.

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte unter Verwendung vorgepackter Silicagel-Kartuschen unterschiedlicher Größenordnungen (INTERCHIM PF-15SIHP oder PF-30SIHP). Der Chromatographieprozess wurde auf einem puriFlash® XS 420 System durchgeführt.

Für präparative *reversed phase* Chromatographie wurden ebenfalls vorgepackte Kartuschen (INTERCHIM, PF-15C18AQ) verschiedener Größen eingesetzt. Die präparative HPLC-Aufreinigung erfolgte unter Verwendung einer Nucleodur-Säule (SP250/21, 100-5 C18 ec, MACHEREY-NAGEL). Sowohl die Umkehrphasen-Säulenchromatographie als auch die präparative HPLC wurden mit einem puriFlash 4250 System (Interchim) durchgeführt.

5.3.3 Spektroskopische und analytische Methoden

5.3.3.1 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden von der NMR-Abteilung der Bergischen Universität Wuppertal an Spektrometern vom Typ *Bruker Avance III 600* sowie *Bruker Avance 400* aufgenommen, wobei die Messfrequenzen für ^1H -Kerne bei 600 MHz bzw. 400 MHz und für ^{13}C -Kerne bei 151 MHz bzw. 101 MHz lagen. Alle NMR-Spektren wurden ausschließlich unter Verwendung deuterierter Lösungsmittel aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in parts per million (ppm) angegeben, während die Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz) ausgewiesen wurden. Die charakteristischen chemischen Verschiebungen der jeweils verwendeten deuterierten Lösungsmittel dienten als interne Referenzstandards zur Kalibrierung der NMR-Spektren (Tabelle 17).

Tabelle 17 Chemische Verschiebung der internen Standards zur Kalibrierung der NMR-Spektren.^[330]

Lösungsmittel	$\delta(^1\text{H})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]
CDCl_3	7.26	77.16
$\text{DMSO}-d_6$	2.50	39.52
$\text{Aceton}-d_6$	2.05	29.84 206.26
CD_3OD	3.31	49.00
$\text{MeCN}-d_3$	1.94	1.32 118.26

5.3.3.2 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektren wurden unter Verwendung eines Bruker Alpha FT-IR-Spektrometers aufgenommen. Die Analyse erfolgte entweder direkt an der Reinsubstanz oder nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels durch Verdampfen aus entsprechenden Lösungen. Feste Proben wurden auf einen geeigneten Probenträger appliziert und mittels eines Diamantstempels komprimiert. Rückstände aus verdampften Lösungen wurden als dünner Film auf dem Träger detektiert und spektroskopisch erfasst. Die Absorptionsbanden werden in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Ihre Intensitäten sind qualitativ eingestuft und werden als stark (s), mittel (m) oder schwach (w) bezeichnet.

5.3.3.3 Analytische High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden unter Verwendung eines Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus Systems in Kopplung mit einem Shimadzu LCMS-2020 durchgeführt. Für die jeweiligen Substanzen kamen verschiedene analytische Methoden zur Anwendung, deren Parameter im Folgenden spezifiziert sind:

Methode A:

Trennsäule: Perfect Sil Target ODS-3 HD, 5 μm , 100 $\times$ 4.6 mm; Laufmittelgradient: 90% H_2O (5 mM NH_4OAc) zu 90% MeCN über 24 Minuten; Flussrate: 1.5 ml/min; UV-Detektion: 200-800 nm; Ionisationsmodus (ESI): positiv und/oder negativ.

Methode B:

Trennsäule: Shim-pack GISS C18 oder Raptor ARC-18, jeweils 1.9 μm , 50 $\times$ 2.1 mm; Laufmittelgradient: 95% H_2O (0.1% HCOOH) zu 95% MeCN (0.1% HCOOH) über 16 Minuten; Flussrate: 400 $\mu\text{l/min}$; UV-Detektion: 200-800 nm; Ionisationsmodus (ESI): positiv und/oder negativ.

Methode C:

Trennsäule: Shim-pack GISS C18 oder Raptor ARC-18, jeweils 1.9 μm , 50 $\times$ 2.1 mm; Laufmittelgradient: 50% H_2O (0.1% HCOOH) zu 95% MeCN (0.1% HCOOH) über 16 Minuten; Flussrate: 400 $\mu\text{l/min}$; UV-Detektion: 200-800 nm; Ionisationsmodus (ESI): positiv und/oder negativ.

Methode D:

Trennsäule: Knauer Eurospher II C18, 1.8 μm , 100 $\times$ 2 mm; Laufmittelgradient: 50% H_2O (0.1% HCOOH) zu 95% MeCN (0.1% HCOOH) über 16 Minuten; Flussrate: 300 $\mu\text{l/min}$; UV-Detektion: 200-800 nm; Ionisationsmodus (ESI): positiv und/oder negativ.

5.3.3.4 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

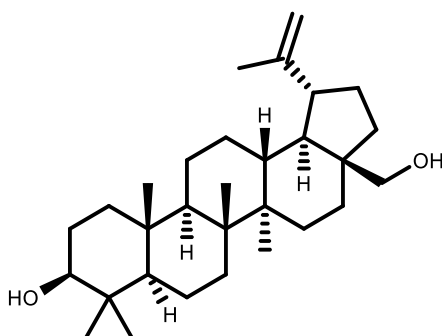
Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde unter Verwendung eines Bruker micrOTOF-Massenspektrometers in Kombination mit einem Flüssigkeitschro-

matographiesystem der Agilent 1100 Series durchgeführt. Die Probenapplikation erfolgte im Modus der Flussinjektion (Flow Injection Analysis, FIA), wobei die Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) realisiert wurde.

5.4 Synthesevorschriften

5.4.1 Synthese der Derivate des Lupan-Typs

(1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-3a-(hydroxymethyl)-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1H-cyclopenta[a]chrysen-9-ol (37, BGE-152)^[207]



Birkenrindengranulat (50.0 g) wurden in einen Soxhlet-Extraktor gegeben und für 24 h mit EtOH (800 ml) und anschließend für 18 h mit DCM (400 ml) extrahiert. Die Lösemittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Birkenrindenextrakt wurde in 34_w% (16.9 g) Ausbeute erhalten.

Für die Aufreinigung des Extrakts wurde eine Lösung aus 5.0 g Rohextrakt in 100.0 ml absolutem Ethanol zum Sieden erhitzt. Ca(OH)₂ (0.50 g, 6.75 mmol) wurde mit 10.0 ml absolutem Ethanol gewaschen. Das nasse Hydroxid wurde zu der ethanolischen Lösung des Extrakts gegeben und für 20 Minuten bei 80°C gerührt. Der heiße Rückstand wurde über eine Glasfritte abfiltriert und das Lösungsmittel des Filtrats vorsichtig im Vakuum entfernt und als Fraktion **B1** an der Luft getrocknet. Der luftgetrocknete Rückstand der Ca(OH)₂-Abfälle wurde als Fraktion **A1** erst mit einer 20%igen HCl-Lösung (100.0 ml) und anschließend mit Wasser (100.0 ml) gewaschen. Nach anschließender Trocknung an der Luft wurde die Fraktion **A1** mit einer Masse von 294.6 mg erhalten.

Fraktion **B1** (4.7 g) wurde dreimal aus Benzol (70.0 ml) umkristallisiert und der Niederschlag abfiltriert. Der Rückstand ergab 1.51 g der Fraktion **B2**. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt und ergab 3.19 g der Fraktion **L2**. Fraktion **B2** wurde in siedendem absolutem Ethanol (60.0 ml) gelöst und unter vermindertem Druck schnell filtriert. Das heiße Filtrat wurde mit 10.0 ml Wasser versetzt und der dadurch entstandene Niederschlag erneut unter Sieden gelöst. Die Lösung wurde zum Ausfällen bei 0°C für 24 h in den Kühlschrank gestellt. Die entstandene Suspension wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das Lösemittel des Überstands wurde unter vermindertem Druck entfernt und ergab 0.533 g der Fraktion **B3F**.

Der so entstandene Feststoff der Fraktion **B3** (0.98 g) wurde in CHCl_3 (50.0 ml) gelöst und mit einer kleinen Filtersäule über Kieselgel (CHCl_3) gereinigt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und ergab 153.0 mg der Fraktion **B4** als hellgelben Feststoff. Dieser wurde unter Sieden in absolutem Ethanol (10.0 ml) gelöst und bei -26°C umkristallisiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, an der Luft getrocknet und das saubere Produkt **37** in 2_w% (83.7 mg, 0.19 mmol) Ausbeute erhalten. Aufgrund der geringen Ausbeute wurden die Zwischenstufen mittels HPLC-MS untersucht und ergaben nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (CycHex:EtOAc 19:1) sauberes Betulin in 42_w% (2.09 g, 4.72 mmol) aus der Fraktion **L2** sowie in 9% (0.44 g, 0.99 mmol) Ausbeute aus der Fraktion **B3F** erhalten. Insgesamt wurde so sauberes Betulin in 52.4_w% (2.62 g, 5.92 mmol) Ausbeute aus den verwendeten 5.0 g Extrakt erhalten. Auf die anfangs eingesetzten 50.0 g Birkenrindengranulat bezogen entspricht dies einer Ausbeute von 18_w%.

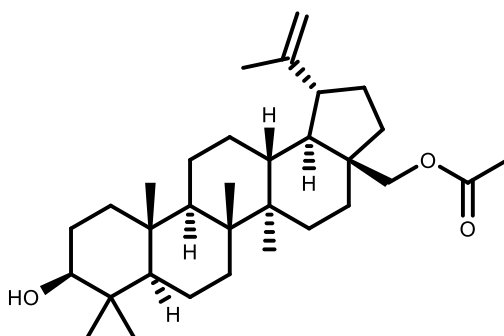
HPLC: t_R = 13.0 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 4.68 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 4.58 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 3.79 (dd, 1H, J = 10.8, 1.9 Hz), 3.33 (dd, 1H, J = 10.9, 1.3 Hz), 3.18 (dd, 1H, J = 11.5, 4.8 Hz), 2.38 (td, 1H, J = 11.1, 5.8 Hz), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.85 (dd, 1H, J = 12.4, 8.5 Hz), 1.73-1.69 (m, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.67-1.49 (m, 7H), 1.44 (s, 4H), 1.42-1.40 (m, 2H), 1.30-1.17 (m, 3H), 1.08-1.06 (m, 1H), 1.06-1.03 (m, 1H), 1.02 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.93-0.86 (m, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.70-0.66 (m, 1H).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] = 150.8, 110.0, 79.4, 60.9, 55.7, 50.8, 49.1, 48.2, 43.1, 41.3, 39.2, 39.1, 37.7, 37.5, 34.6, 34.3, 30.1, 29.6, 28.4, 27.8, 27.4, 25.6, 21.2, 19.5, 18.7, 16.5, 16.4, 15.7, 15.1.

IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3368 (m), 2930 (s), 2868 (w), 1645 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1189 (w), 1008 (s), 879 (s), 544 (m).

((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-Hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysen-3a-yl)methyl acetate (57, BGE-030)^[211]



Zu einer Suspension aus Betulin (100.0 mg, 0.21 mmol, 1.00 Äq) und DMAP (3.0 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) in 4.0 ml DCM wurden DIPEA (0.24 ml, 1.75 mmol, 8.00 Äq) sowie Ac_2O (22.7 μl , 0.24 mmol, 1.10 Äq) Ac_2O zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit 10.0 ml DCM verdünnt und nacheinander dreimal mit je 5.0 ml H_2O , 5.0 ml ges. NaHCO_3 -Lösung sowie 5.0 ml ges. NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex:EtOAc 19:1) gereinigt. Das Produkt **57** wurde in einer Ausbeute von 50% (52.5 mg, 0.11 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 13.7 min (Methode B)

^1H -NMR: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 4.70-4.67 (m, 1H), 4.60-4.56 (m, 1H), 4.24 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 3.88-3.83 (m, 1H), 3.20-3.15 (m, 1H), 2.47-2.40 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.99-1.92 (m, 1H), 1.86-1.82 (m, 1H), 1.79-1.74 (m, 1H), 1.71-1.69 (m, 1H), 1.68 (s, 1H), 1.67-1.62 (m, 3H), 1.61-1.57 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.53-1.50 (m, 1H), 1.43-1.37 (m, 5H), 1.28-1.20 (m, 3H), 1.14-1.03 (m, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.97

(s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.92-0.86 (m, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.69-0.66 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 171.9, 150.5, 110.2, 79.3, 63.1, 55.6, 50.7, 49.2, 48.1, 46.7, 43.0, 41.2, 39.2, 39.1, 38.0, 37.5, 34.9, 34.5, 30.2, 29.9, 28.3, 27.8, 27.4, 25.5, 21.3, 21.1, 19.4, 18.6, 16.5, 16.4, 15.7, 15.1.

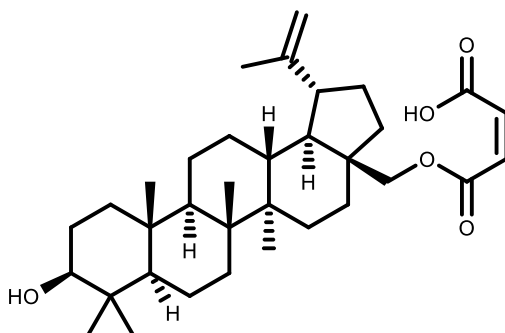
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 3560 (m), 2964 (w), 2939 (m), 2868 (w), 1719 (s), 1452 (m), 1387 (m), 1367 (m), 1257 (s), 1043 (s), 888 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₂H₅₂O₃+Na]⁺

Ber.: 507.3809

Gef.: 507.3808.

(Z)-4-(((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-Hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysen-3a-yl)methoxy)-4-oxobut-2-enoic acid (58, BGE-013)^[331]



Eine Reaktionsmischung aus Betulin (50.0 mg, 0.11 mmol, 1.00 Äq), Maleinsäureanhydrid (88.6 mg, 0.90 mmol, 8.00 Äq) und DMAP (1.4 mg, 0.01 mmol, 0.10 Äq) in 1.5 ml Pyridin wurde 17 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und anschließend zweimal mit 10.0 ml 1 M Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts (CycHex:EtOAc 9:1) ergab das Produkt **58** in einer Ausbeute von 14% (8.7 mg, 0.16 mmol).

HPLC: t_R = 11.9 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 6.35 (m, 2H), 4.71 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.32 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 3.82 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 3.01-2.92 (m, 1H), 2.47-2.41 (m, 1H), 1.96-1.94 (m, 1H), 1.80-1.70 (m, 2H),

1.65 (s, 3H), 1.64-1.50 (m, 5H), 1.49-1.39 (m, 3H), 1.39-1.29 (m, 5H), 1.26-1.18 (m, 3H), 1.12-1.01 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.98-0.96 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.86-0.81 (m, 1H), 0.77 (s, 3H), 0.66 (s, 3H), 0.64-0.61 (m, 1H).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 101 MHz) δ [ppm] = 166.5, 165.7, 149.8, 131.7, 128.2, 109.9, 76.7, 62.5, 54.8, 49.7, 48.3, 46.9, 46.0, 40.1, 40.3, 38.2, 37.1, 36.7, 34.0, 33.7, 29.1, 29.0, 28.1, 27.1, 26.6, 24.7, 20.3, 18.8, 17.9, 15.9, 15.8, 15.6, 14.5.

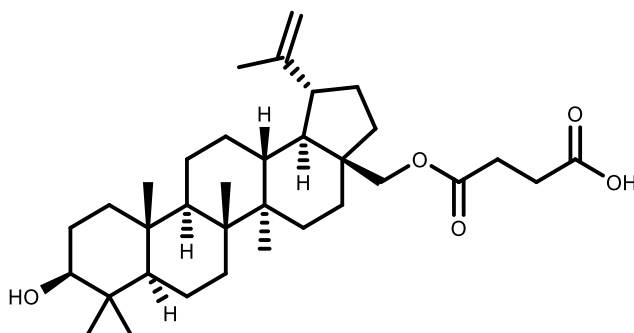
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3394 (m), 2933 (w), 2870 (w), 1714 (m), 1641 (w), 1024 (w), 993 (s), 892 (w), 824 (m), 763 (w), 524 (w), 515 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_5 + \text{Na}$] $^{+}$

Ber.: 563.3707

Gef.: 563.3707.

4-(((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-Hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysen-3a-yl)methoxy)-4-oxobutanoic acid (59, BGE-020)^[212]



Eine Lösung aus Betulin (500.0 mg, 1.11 mmol, 1.00 Äq), Bernsteinsäureanhydrid (169.5 mg, 1.69 mmol, 8.00 Äq) und DMAP (13.8 mg, 0.11 mmol, 0.10 Äq) in 5.0 ml Pyridin wurde 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und anschließend zweimal mit 10.0 ml 1 M Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts (CycHex:EtOAc 3:1) ergab das Produkt **59** in einer Ausbeute von 90% (551.1 mg, 1.02 mmol).

HPLC: t_R = 12.9 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 4.70 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.29-4.22 (m, 2H), 3.77 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 2.99-2.94 (m, 1H), 2.54-2.51 (m, 1H), 2.49-2.42 (m, 2H), 1.94-1.84 (m, 1H), 1.77-1.68 (m, 2H), 1.65 (s, 1H), 1.63-1.59 (m, 3H), 1.58-1.52 (m, 2H), 1.48-1.39 (m, 3H), 1.39-1.27 (m, 5H), 1.27-1.13 (m, 3H), 1.10-0.99 (m, 2H), 0.98 (s, 3H), 0.97-0.95 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.86-0.79 (m, 1H), 0.77 (s, 3H), 0.66 (s, 3H), 0.65-0.59 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 173.4, 172.2, 149.7, 109.8, 76.8, 61.5, 54.6, 49.7, 48.2, 47.0, 46.1, 42.2, 40.3, 38.5, 38.2, 37.0, 36.6, 34.0, 29.2, 29.0, 28.9, 28.7, 28.0, 27.2, 26.6, 24.9, 20.2, 18.8, 17.9, 15.9, 15.7, 15.6, 14.5.

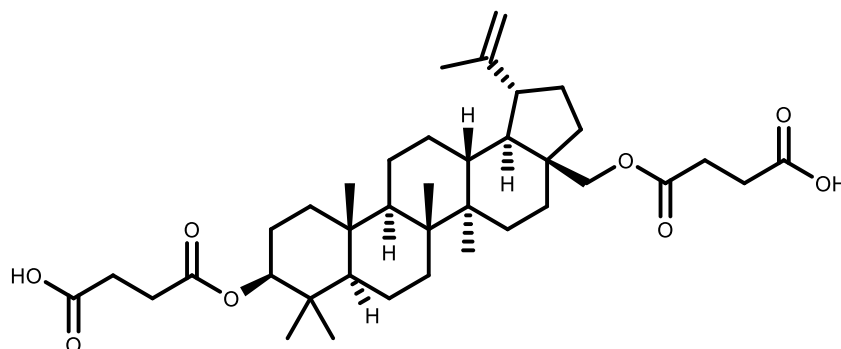
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 3324 (w), 2939 (s), 2866 (w), 2586 (w), 1731 (m), 1707 (s), 1388 (m), 1259 (m), 1160 (m), 1014 (s), 525 (w).

HRMS (ESI(+)): *m/z* [C₃₂H₅₀O₄+Na]⁺

Ber.: 563.3707

Gef.: 563.3707.

**4-(((1*R*,3*aS*,5*aR*,5*bR*,7*aR*,9*S*,11*aR*,11*bR*,13*aR*,13*bR*)-9-((3-Carboxyprop-
anoyl)oxy)-5*a*,5*b*,8,8,11*a*-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3*aH*-cyclo-
penta[*a*]chrysen-3*a*-yl)methoxy)-4-oxobutanoic acid (60, BGE-047)^[214]**



Das Betulin-Derivat **60** wurde als Nebenprodukt der Synthese von Verbindung **59** in einer Ausbeute von 10% (73.9 mg, 0.11 mmol) erhalten.

HPLC: *t_R* = 11.7 min (Methode B)

¹H-NMR: (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ [ppm] = 4.70 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.41-4.34 (m, 1H), 4.21 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 3.77 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz), 2.50-2.40 (m, 19H), 1.97-1.83 (m, 1H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.65 (s,

1H), 1.64-1.40 (m, 9H), 1.39-1.26 (m, 6H), 1.23-1.17 (m, 1H), 1.09-1.03 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.94-0.88 (m, 1H), 0.81 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.79 (s, 4H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 151 MHz) δ [ppm] = 173.3, 172.2, 171.6, 149.8, 109.9, 80.0, 61.7, 54.6, 49.5, 48.2, 47.0, 46.1, 42.2, 40.9, 37.7, 37.4, 37.0, 36.6, 34.0, 33.6, 29.2, 29.2, 29.0, 28.9, 28.8, 28.8, 27.6, 26.6, 24.7, 23.3, 20.3, 18.8, 17.7, 16.4, 15.8, 15.6, 14.5.

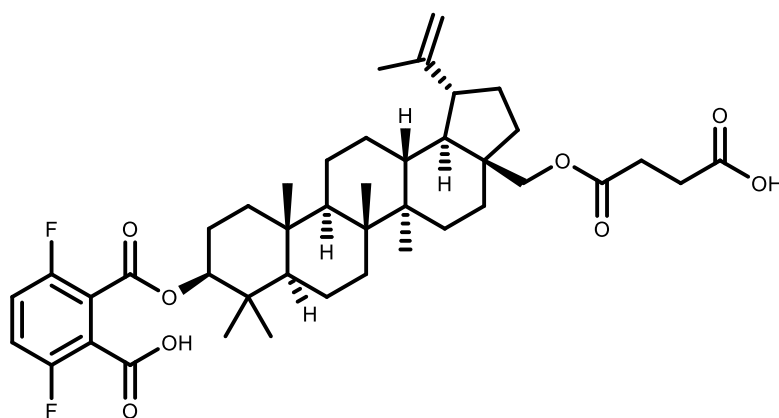
IR: (ATR) ν_{max}/cm⁻¹ 2927 (m), 2871 (w), 1720 (s), 1456 (w), 1376 (w), 1254 (w), 1172 (m), 967 (m), 882 (w), 731 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₈H₅₈O₈+Na]⁺

Ber.: 665.4024

Gef.: 665.4023.

4-(((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-Hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysen-3a-yl)methoxy)-4-oxobutanoic acid (61, BGE-057)



Für die Synthese von Verbindung **61** wurden das Edukt **59** (100.0 mg, 0.18 mmol, 1.00 Äq), 3,6-Difluorphthalsäureanhydrid (67.8 mg, 0.37 mmol, 2.00 Äq) sowie DMAP (2.30 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) in 3.0 ml Pyridin gelöst. Die Reaktion wurde vier Tage lang bei 100 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit 30.0 ml EtOAc verdünnt und zweimal mit 20.0 ml 1 M HCl und einmal mit 20.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (74 → 80% MeCN) aufgereinigt und ergab das saubere Produkt **61** in 34% (45.0 mg, 0.06 mmol) Ausbeute.

HPLC: $t_R = 8.1$ min (Methode C)

$^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ [ppm] = 7.55 (2x d, 2H, $J = 6.4$ Hz) 4.71 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz), 4.65 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz), 4.52 (s, 1H), 4.27 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz), 3.77 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz), 2.54-2.52 (m, 1H), 2.49-2.42), 1.94-1.86 (m, 1H), 1.78-1.68 (m, 3H), 1.67-1.60 (m, 8H), 1.59-1.53 (m, 1H), 1.51-1.46 (m, 1H), 1.42-1.29 (m, 6H), 1.24-1.20 (m, 2H), 0.90 (s, 3H), 0.89-0.85 (m, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.81 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ [ppm] = 173.4, 172.3, 163.2, 157.4, 145.4, 82.9, 61.7, 54.4, 49.4, 48.2, 47.0, 46.1, 42.3, 40.4, 37.6, 37.5, 36.6, 34.0, 33.5, 29.2, 29.0, 28.9, 28.7, 27.5, 26.6, 24.7, 22.8, 20.3, 18.7, 17.7, 16.4, 15.6, 14.5.

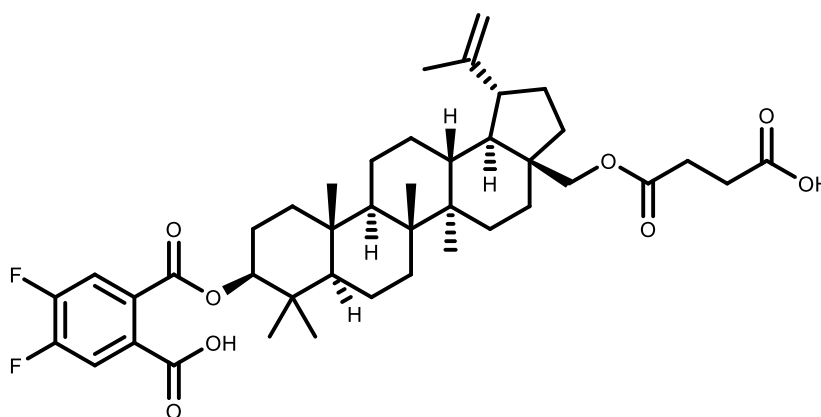
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2944 (m), 2872 (w), 1710 (s), 1474 (m), 1246 (s), 1157 (m), 985 (m), 963 (m), 822 (w), 726 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{O}_8\text{F}_2 + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 749.3835

Gef.: 749.3832.

2-((((1*R*,3*aS*,5*aR*,5*bR*,7*aR*,9*S*,11*aR*,11*bR*,13*aR*,13*bR*)-3*a*-(((3-Carboxyprop-1-en-2-yl)oxy)methyl)-5*a*,5*b*,8,8,11*a*-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]chrysen-9-yl)oxy)carbonyl)-4,5-difluorobenzoic acid (62, BGE-058)



Für die Synthese von Verbindung **62** wurden das Edukts **59** (100.0 mg, 0.18 mmol, 1.00 Äq), 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid (67.8 mg, 0.37 mmol, 2.00 Äq) sowie DMAP (2.30 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) in 3.0 ml Pyridin gelöst. Die Reaktion wurde vier Tage lang bei 100 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit 30.0 ml

EtOAc verdünnt und zweimal mit 20.0 ml 1 M HCl und einmal mit 20.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (74 → 80% MeCN) aufgereinigt und ergab das saubere Produkt **62** in 42% (56.7 mg, 0.08 mmol) Ausbeute.

HPLC: t_R = 8.8 min (Methode C)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 600 MHz) δ [ppm] = 7.83-7.78 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.60 (dd, 1H, J = 10.6, 5.6 Hz), 4.57 (s, 1H), 4.27 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 3.77 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 2.54-2.51 (m, 2H), 2.49-2.43 (m, 2H), 1.94-1.86 (m, 1H), 1.77-1.68 (m, 3H), 1.68-1.60 (m, 8H), 1.60-1.53 (m, 1H), 1.51-1.44 (m, 1H), 1.44-1.30 (m, 6H), 1.24-1.18 (m, 2H), 0.89 (s, 3H), 0.88-0.84 (m, 1H), 0.83 (s, 3H), 0.81 (s, 3H)

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 151 MHz) δ [ppm] = 173.3, 172.3, 166.2, 149.8, 82.5, 61.7, 54.7, 49.5, 48.2, 47.0, 46.1, 42.2, 40.4, 37.7, 37.6, 37.0, 36.6, 34.0, 33.5, 29.2, 29.0, 28.9, 28.7, 27.7, 26.6, 24.7, 22.7, 20.3, 18.8, 17.7, 16.4, 15.7, 15.6, 14.5.

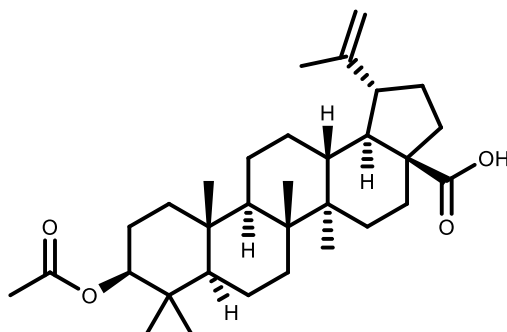
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2942 (m), 2871 (w), 1708 (s), 1606 (w), 1319 (m), 1251 (m), 1178 (s), 1116 (m), 963 (w), 882 (w), 764 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₄₂H₅₆O₈F₂+Na]⁺

Ber.: 749.3835

Gef.: 749.3839.

**(1*R*,3*aS*,5*aR*,5*bR*,7*aR*,9*S*,11*aR*,11*bR*,13*aR*,13*bR*)-9-Acetoxy-5*a*,5*b*,8,8,11*a*-penta-
methyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3*aH*-cyclopenta[*a*]chrysene-3*a*-carboxylic
acid (**63**, BGE-018)^[215]**



Eine Mischung aus Betulinsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq), Essigsäureanhydrid (34.7 µl, 0.32 mmol, 1.50 Äq), DMAP (2.7 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) und DIPEA (0.261 ml, 1.53 mmol, 7.00 Äq) in THF (5.0 ml) wurde über einen Zeitraum von fünf Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 2.0 ml Wasser zugegeben und die Lösung eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend dreimal mit 10.0 ml Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (CycHex:EtOAc 1:1) gereinigt, wodurch das Produkt **63** in 55% (60.0 mg, 0.120 mmol) Ausbeute erhalten wurde.

HPLC: t_R = 13.2 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 4.69 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.36 (dd, 1H, J = 11.7, 4.6 Hz), 2.96 (td, 1H, J = 10.8, 5.1 Hz), 2.26-2.19 (m, 1H), 2.14-2.08 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.83-1.76 (m, 2H), 1.65 (s, 1H), 1.64-1.57 (m, 3H), 1.56-1.45 (m, 3H), 1.46-1.38 (m, 3H), 1.38-1.30 (m, 6H), 1.21-1.07 (m, 2H), 1.03-0.96 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 0.93-0.88 (m, 1H), 0.87 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.79 (s, 6H), 0.78-0.69 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 177.2, 170.0, 150.3, 109.5, 79.8, 54.6, 49.6, 48.5, 46.6, 42.0, 40.2, 37.8, 37.5, 37.3, 36.6, 36.3, 33.7, 31.6, 30.0, 29.1, 27.7, 25.0, 23.3, 21.0, 20.4, 19.0, 17.7, 16.4, 15.9, 15.6, 14.4.

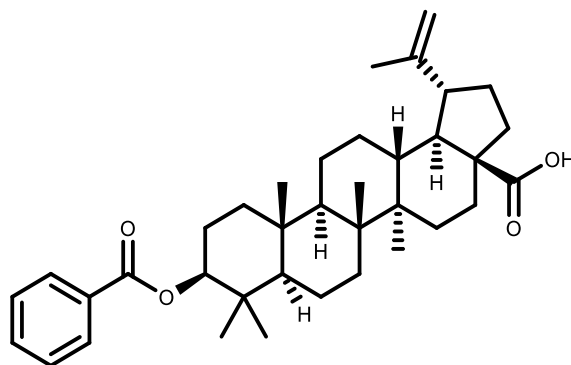
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2940 (s), 2864 (w), 1734 (s), 1690 (s), 1463 (w), 1365 (m), 1245 (s), 1012 (w), 979 (m), 924 (w), 883 (m), 797 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4+\text{Na}]^+$

Ber.: 521.3601

Gef.: 521.3600.

(1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-(Benzoyloxy)-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylic acid (64, BGE-026)^[216]



Betulinsäure (200.0 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) und DMAP (5.35 mg, 0.04 mmol, 0.10 Äq) wurden in Pyridin (5.0 ml) vollständig gelöst. Anschließend wurde Benzoylchlorid (60.55 μl , 0.53 mmol, 1.20 Äq) zugegeben, und die Reaktionsmischung über einen Zeitraum von fünf Tagen bei 100 °C unter Rühren erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit Dichlormethan (20.0 ml) verdünnt und nacheinander mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 $\times$ 20.0 ml), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 $\times$ 20.0 ml) sowie erneut mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 $\times$ 20.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Rekristallisation aus MeCN/H₂O (9:1) gereinigt, wodurch die reine Verbindung **64** in einer Ausbeute von 42% (102.8 mg, 0.183 mmol) erhalten wurde.

HPLC: t_R = 14.5 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 7.97-7.94 (m, 2H), 7.66-7.63 (m, 1H), 7.53 (dd, 2H, J = 7.80, 7.80 Hz), 4.71-4.68 (s, 1H), 4.65-4.59 (m, 1H), 4.58 (s, 1H), 2.95 (td, 1H, J = 10.7, 5.0 Hz), 2.27-2.20 (m, 1H), 2.14-2.09 (m, 1H), 1.86-1.77 (m, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 1.65 (s, 1H), 1.64-1.61 (m, 1H), 1.55-1.50 (m, 1H), 1.50-1.36 (m, 8H),

1.35-1.28 (m, 3H), 1.22-1.14 (m, 1H), 1.14-1.07 (m, 1H), 1.07-0.98 (m, 2H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.85 (s, 6H), 0.81-0.78 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 177.1, 165.2, 150.2, 138.1, 130.1, 128.9, 128.6, 109.5, 80.8, 55.3, 54.5, 49.5, 48.4, 46.4, 41.9, 40.1, 37.6, 37.4, 36.5, 36.2, 33.6, 31.6, 30.0, 29.1, 27.6, 24.9, 23.2, 20.3, 18.8, 17.6, 16.4, 15.7, 15.6, 14.2.

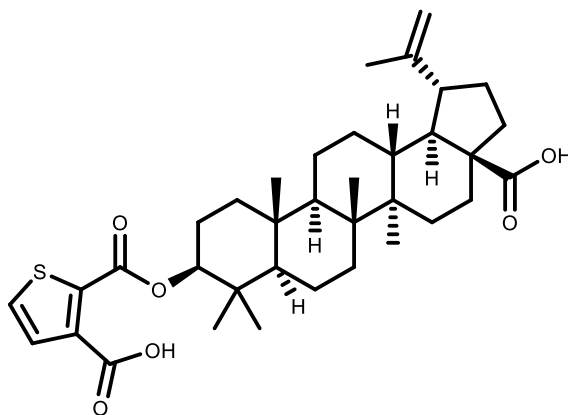
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 2939 (m), 2869 (w), 1717 (m), 1694 (m), 1451 (w), 1270 (s), 1113 (m), 1026 (w), 970 (w), 888 (w), 710 (s).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₇H₅₂O₄+Na]⁺

Ber.: 583.3758

Gef.: 583.3757.

2-((((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-3a-Carboxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1H-cyclopenta[a]chrysen-9-yl)oxy)carbonyl)thiophene-3-carboxylic acid (65, BGE-032)



Betulinsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq), 2,3-Thiophendicarbonsäureanhydrid (135.0 mg, 0.88 mmol, 4.00 Äq) sowie DMAP (2.7 mg, 0.44 mmol, 2.00 Äq) wurden in 1.5 ml Pyridin gelöst und in einem Rundkolben unter Rühren bei 100°C über einen Zeitraum von fünf Tagen umgesetzt. Nach vollständigem Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit 20.0 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit 10.0 ml einer 1 M HCl-Lösung sowie zweimal mit 10.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff wurde mittels präparativer

HPLC (H₂O:MeCN 5% → 95% MeCN) gereinigt. Das saubere Produkt **65** wurde in einer Ausbeute von 7% (8.8 mg, 0.01 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 11.0 min (Methode A)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 600 MHz) δ [ppm] = 7.83 (d, 1H, J = 5.1 Hz) 7.27 (d, 1H, J = 5.1 Hz), 4.70-4.68 (m, 1H), 4.62-4.59 (m, 1H), 4.57-4.56 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 1H), 2.13-2.10 (m, 1H), 1.83-1.77 (m, 2H), 1.70-1.66 (m, 2H), 1.65 (s, 1H), 1.64-1.61 (m, 1H), 1.53 (td, 1H, J = 11.3 Hz), 1.49-1.45 (m, 1H), 1.42-1.36 (m, 6H), 1.34-1.30 (m, 3H), 1.24-1.21 (m, 1H), 1.19-1.15 (m, 1H), 1.03-0.98 (m, 2H), 0.96 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H) 0.87-0.85 (m, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.79 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 151 MHz) δ [ppm] = 177.3, 164.0, 162.1, 150.4, 136.9, 131.3, 128.3, 109.7, 81.8, 55.4, 54.8, 49.7, 48.6, 46.7, 42.1, 40.3, 37.7, 37.6, 37.6, 36.7, 36.4, 33.8, 31.7, 30.1, 29.2, 27.7, 25.1, 23.0, 20.5, 19.0, 17.7, 16.5, 15.7, 15.5, 14.4.

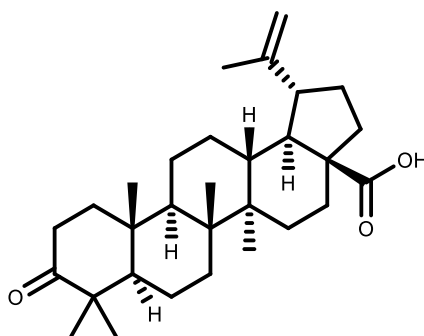
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3559(w), 2939 (m), 2868 (m), 1719 (m), 1683 (w), 1626 (w), 1446 (w), 1386 (w), 1259 (s), 982 (w), 887 (w), 749 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₆H₅₀O₆S + Na]⁺

Ber.: 633.3220

Gef.: 633.3216.

(1R,3aS,5aR,5bR,7aR,11aR,11bR,13aR,13bR)-5a,5b,8,8,11a-Pentamethyl-9-oxo-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylic acid
(**66**, BGE-014)^[226]



Eine Mischung aus Wasser (9.0 μ l) und Dichlormethan (9.0 ml) wurde langsam zu einer Suspension von Betulinsäure (200.0 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) und Dess-Martin-

Periodinan (185.7 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) in Dichlormethan (1.0 ml) bei Raumtemperatur gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über einen Zeitraum von 26.5 Stunden unter Rühren gehalten und anschließend mit Diethylether (10.0 ml) verdünnt. Es folgte eine Waschsequenz bestehend aus einer Mischung von 10%iger Natriumdithionitlösung (5.0 ml) und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (15.0 ml), gefolgt von jeweils einem Waschgang mit Wasser (15.0 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (15.0 ml). Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Reaktionsprodukt **66** wurde als Reinsubstanz mit einer Ausbeute von 92% (188.9 mg, 0.416 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 12.3 min (Methode B)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 4.71 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 2.96 (td, 1H, J = 10.7, 5.1 Hz), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.66 (s, 1H), 1.65-1.61 (m, 1H), 1.56-1.51 (m, 1H), 1.46-1.29 (m, 12H), 1.26-1.21 (m, 1H), 1.19 (t, 1H, J = 7.1 Hz), 1.17-1.09 (m, 1H), 1.00 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.85-0.77 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] = 177.2, 150.3, 109.6, 59.7, 55.4, 53.8, 49.0, 48.5, 46.6, 46.5, 42.0, 40.1, 38.8, 37.7, 36.3, 36.3, 33.6, 33.1, 30.1, 29.2, 26.4, 25.1, 21.0, 19.1, 18.9, 15.6, 15.4, 14.3.

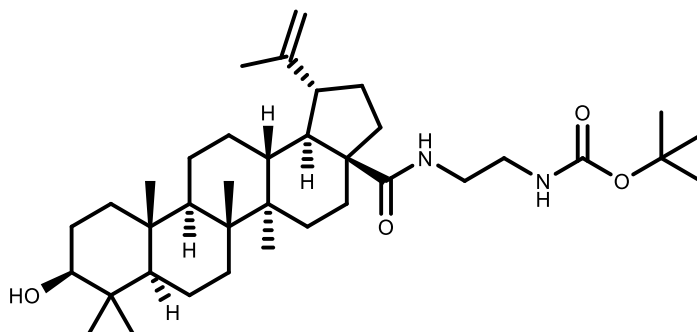
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2932 (s), 2866 (w), 1703 (w), 1687 (s), 1458 (s), 1375 (w), 1261 (w), 1244 (w), 1177 (s), 1165 (w), 1112 (w), 1027 (s), 1002 (w), 941 (w), 887 (s), 800 (w), 763 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3 + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 477.3339

Gef.: 477.3339.

***tert*-Butyl (2-((1*R*,3*aS*,5*aR*,5*bR*,7*aR*,9*S*,11*aR*,11*bR*,13*aR*,13*bR*)-9-hydroxy-5*a*,5*b*,8,8,11*a*-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]chrysene-3*a*-carboxamido)ethyl)carbamate (**71**, BGE-002)^[332]**



Betulinsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq) und HATU (99.9 mg, 0.26 mmol, 1.20 Äq) wurden in 10.0 ml DCM gelöst. Bei 0 °C wurden DIPEA (76.0 µl, 0.44 mmol, 2.00 Äq) und Boc-Ethylendiamin (76.0 µl, 0.48 mmol, 2.19 Äq) zu der Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde 21 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde die Lösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und je einmal mit 10.0 ml H₂O, 20.0 ml ges. NaCl-Lösung und 10.0 ml H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CycHex:EtOAc 3:1) wurde das saubere Produkt **71** in 78% (101.9 mg, 0.17 mmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: t_R = 13.4 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 7.22 (m, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.72 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.58 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 3.36-3.32 (m, 1H), 3.30-3.32 (m, 2H), 3.21-3.06 (m, 2H), 2.44 (ddd, 1H, J = 12.8, 11.4, 3.6 Hz), 1.99-1.88 (m, 2H), 1.77-1.69 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.64 (t, 1H, 3J = 3.6, 3.6 Hz), 1.63-1.46 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.42 (s, 2H), 1.40-1.29 (m, 5H), 1.28-1.22 (m, 2H), 1.13 (dt, 1H, J = 13.1, 2.6, 2.6 Hz), 1.01-0.97 (m, 1H), 0.95 (s, 6H), 0.93 (s, 3H), 0.90-0.82 (m, 1H), 0.81 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.71-0.62 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 177.3, 157.0, 151.1, 109.4, 79.8, 79.1, 55.8, 50.8, 50.3, 46.9 (2C), 42.6, 40.9, 40.4, 39.0, 38.9, 38.5, 37.4, 34.6, 33.7, 31.0, 29.6, 28.5 (3C), 28.1, 27.6, 27.0, 25.8, 21.8, 19.6, 18.4, 16.3, 16.2, 15.5, 14.8.

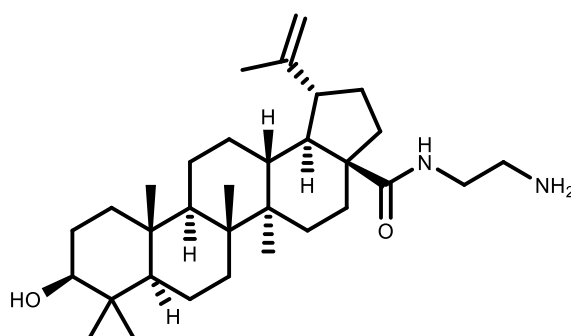
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3363 (m), 2935 (s), 2866 (m), 1694 (s), 1637 (s), 1508 (s), 1450 (m), 1319 (m), 1248 (m), 1166 (s), 1008 (w), 882 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{Na}]^+$

Ber.: 621.4605

Gef.: 621.4602.

(1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-N-(2-Aminoethyl)-9-hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxamide (67, BGE-004)^[332]



Das Boc-geschützte Amin **71** (100 mg, 0.17 mmol, 1.00 Äq) wurde in 5.0 ml 4 M HCl/Dioxan gelöst und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde Säulenchromatographisch (CycHex:EtOAc 2:1) gereinigt. Das Produkt **67** wurde als weißer Feststoff in 97% Ausbeute (86.70 mg, 0.165 mmol) erhalten.

HPLC: $t_R = 7.0$ min (Methode B)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 8.07 (s, H), 7.90 (s, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.54 (s, 1H), 3.31-3.23 (m, 2H), 3.04-2.92 (m, 2H), 2.84-2.74 (m, 2H), 2.24-2.11 (m, 1H), 1.88-1.79 (m, 1H), 1.78-1.66 (m, 1H), 1.63 (s, 3H), 1.59-1.53 (m, 1H), 1.48-1.38 (m, 5H), 1.38-1.19 (m, 9H), 1.18-0.95 (m, 4H), 0.95 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83-0.78 (m, 1H), 0.76 (s, 3H), 0.65 (s, 3H), 0.62-0.57 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 101 MHz) δ [ppm] = 176.3, 150.8, 109.2, 76.2, 54.9 (2C), 50.0, 49.6, 46.2, 41.9, 40.3, 38.6, 38.5, 38.3, 37.4, 36.7, 36.7, 36.4, 33.9, 32.2, 30.3, 28.9, 28.1, 27.1, 25.2, 20.5, 19.0, 17.9, 15.9, 15.8, 15.8, 14.3.

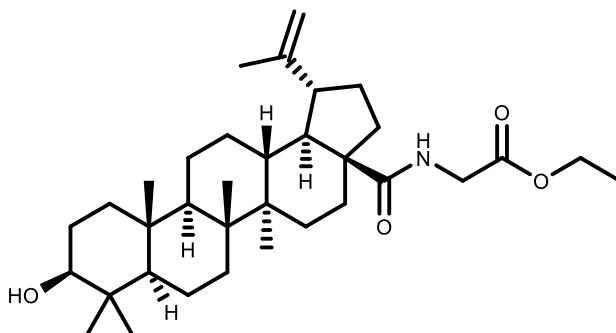
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3394 (s), 2937 (m), 2867 (w), 1638 (m), 1546 (w), 1467 (w), 1447 (w), 1318 (w), 1248 (w), 1024 (s), 994 (s), 879 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$

Ber.: 499.4258

Gef.: 499.4260.

Ethyl ((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1H-cyclopenta[a]chrysene-3a-carbonyl)glycinate (68, BGE-001)^[229]



Bei 0 °C wurde DIPEA (1.91 ml, 10.95 mmol, 10.00 Äq) zu einer Lösung von Betulin-säure (500.0 mg, 1.10 mmol, 1.00 Äq), Glycinethylesterhydrochlorid (458.4 mg, 3.28 mmol, 3.00 Äq) und HATU (1040.7 mg, 2.74 mmol, 1.50 Äq) in DCM (12.0 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde fünf Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (20.0 ml) gelöst. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser (10.0 ml), ges. NaCl-Lösung (10.0 ml), ges. NaHCO_3 -Lösung (10.0 ml), erneut mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) sowie abschließend nochmals mit Wasser (10.0 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex:EtOAc = 19:1) gereinigt. Die Zielverbindung **68** wurde in reiner Form mit einer Ausbeute von 77% (485.4 mg, 0.847 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 11.9 min (Methode B)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 6.06 (t, 1H, J = 5.2 Hz), 4.73 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.59 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.21 (q, 2H, J = 7.1 Hz), 4.00 (dd, 2H, J = 5.25, 3.66 Hz), 3.18 (dd, 1H, J = 11.5, 4.7 Hz), 3.09 (td, 1H, J = 11.1, 4.5 Hz), 2.43 (td, 1H, J = 11.5, 3.7 Hz), 2.02-1.92

(m, 2H), 1.91-1.79 (m, 1H), 1.72-1.69 (m, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.66-1.64 (m, 1H), 1.63-1.57 (m, 3H), 1.57-1.55 (m, 1H), 1.55-1.53 (m, 1H), 1.52-1.45 (m, 2H), 1.42-1.35 (m, 5H), 1.29 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.26-1.24 (m, 2H), 1.19-1.13 (m, 1H), 1.03-0.97 (m, 1H), 0.97 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89-0.86 (m, 1H), 0.81 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.69-0.65 (m, 1H).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] = 176.8, 170.6, 151.0, 109.5, 79.2, 61.4, 55.7, 55.4, 50.6, 50.0, 46.6, 42.5, 41.2, 40.7, 38.8, 38.7, 38.2, 37.7, 37.2, 34.3, 33.6, 30.8, 29.4, 27.9, 27.4, 25.6, 20.9, 19.4, 16.0, 14.6, 14.3.

IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2936 (w), 2869 (w), 1696 (m), 1520 (w), 1456 (w), 1191 (w), 1159 (w), 1083 (s), 1029 (w), 789 (m), 746 (w), 470 (s).

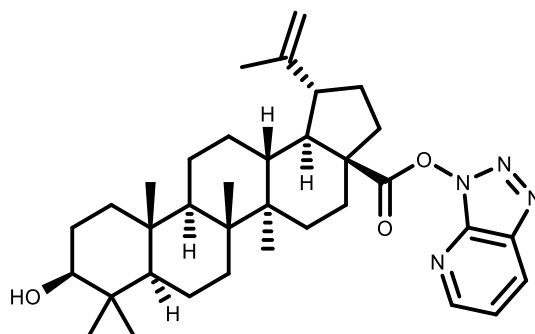
HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{NO}_4 + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 564.4023

Gef.: 564.4028.

3H-[1,2,3]Triazolo[4,5-b]pyridin-3-yl

(1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-hydroxy-5a,5b,8,8,11a-penta-methyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate
(**69**, BGE-021)



Der Aktivester **69** (8.7 mg, 7%) wurde im Rahmen der Synthese der Verbindung **68** als Nebenprodukt isoliert.

HPLC: $t_R = 13.4$ min (Methode B)

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 8.83 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz), 8.71 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 4.71 (s, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.24 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.87-2.78 (m, 1H), 2.55-2.51 (m, 1H), 2.36-2.22

(m, 1H) 2.14-2.02 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 2H), 1.88-1.74 (m, 3H), 1.69 (s, 1H), 1.65-1.58 (m, 1H), 1.57-1.50 (m, 2H), 1.49-1.41 (m, 3H), 1.41-1.32 (m, 5H), 1.17-1.06 (m, 1H), 1.02 (s, 3H), 1.01-0.94 (m, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.87-0.82 (m, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.66 (s, 6H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 171.6, 152.6, 149.1, 140.1, 134.5, 129.8, 121.7, 110.3, 76.7, 56.5, 54.8, 49.8, 49.0, 46.4, 42.1, 40.3, 38.5, 38.2, 38.1, 36.7, 35.7, 33.8, 30.5, 29.7, 29.4, 28.0, 27.1, 24.9, 20.3, 18.9, 17.9, 15.9, 15.7, 15.5, 14.4.

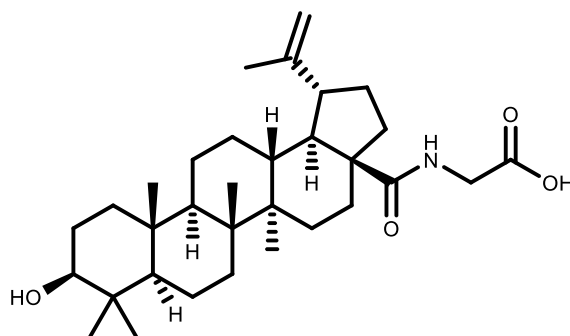
IR: (ATR) ν_{max}/cm⁻¹ 2936 (s), 2869 (w), 1749 (w), 1437 (m), 1376 (m), 1362 (m), 1243 (m), 1105 (m), 1062 (m), 1008 (s), 993 (s), 935 (s), 801 (m), 769 (s), 719 (s).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₅H₅₀N₄O₃ + Na]⁺

Ber.: 597.3775

Gef.: 597.3776.

((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-Hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1H-cyclopenta[a]chrysene-3a-carbonyl)glycine (70, BGE-022)^[229]



Bei 0 °C wurde eine 0.25 molare wässrige NaOH-Lösung (30.0 ml) zu einer Lösung des Edukts **68** (400.0 mg, 0.74 mmol, 1.00 Äq) in THF (10.0 ml) und H₂O (15.0 ml) gegeben. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von vier Tagen bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rühren durchgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingengt und mit Ethylacetat (20.0 ml) versetzt. Nach Phasentrennung wurde die organische Phase nacheinander zweimal mit Wasser (10.0 ml), ges. NaCl-Lösung (10.0 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (10.0 ml), erneut mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) sowie mit Wasser (10.0 ml) gewaschen. Die organische Phase

wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex:EtOAc 1:2) gereinigt, wobei die reine Verbindung **70** in einer Ausbeute von 77% (293.3 mg, 0.569 mmol) erhalten wurde.

HPLC: t_R = 10.5 min (Methode B)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 7.86 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 3.70-3.58 (m, 2H), 3.01-2.93 (m, 2H), 2.53-2.51 (m, 1H), 2.18-2.11 (m, 1H), 1.87-1.80 (m, 1H), 1.79-1.71 (m, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.60-1.48 (m, 3H), 1.47-1.39 (m, 5H), 1.37-1.26 (m, 5H), 1.25-1.20 (m, 2H), 1.17-1.09 (m, 1H), 1.07-0.95 (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.90-0.88 (m, 1H), 0.86 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.82-0.78 (m, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.65 (s, 3H), 0.63-0.58 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] = 176.1, 171.6, 150.9, 109.1, 76.8, 54.9, 54.8, 46.1, 41.9, 40.9, 38.5, 38.3, 37.5, 36.7, 36.6, 34.9, 32.2, 30.2, 28.8, 28.1, 27.2, 25.2, 20.5, 19.0, 17.9, 15.9, 15.8, 15.8, 14.3.

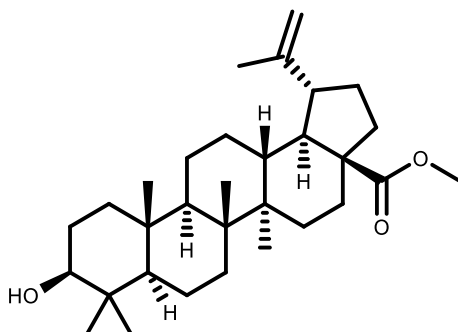
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3594 (w), 2933 (s), 2867 (m), 1737 (m), 1638 (m), 1529 (w), 1447 (w), 1376 (w), 1194 (s), 1029 (m), 1007 (w), 983 (w), 880 (s), 727 (w).

HRMS (ESI(-)): m/z [$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{NO}_4 - \text{H}$] $^-$

Ber.: 512.3745

Gef.: 512.3740.

Methyl (1*R*,3*aS*,5*aR*,5*bR*,7*aR*,9*S*,11*aR*,11*bR*,13*aR*,13*bR*)-9-hydroxy-5*a*,5*b*,8,8,11*a*-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3*aH*-cyclopenta[*a*]chrysene-3*a*-carboxylate (72**, BGE-023)^[230]**



Eine Lösung aus Betulinsäure (1.0 g, 2.19 mmol, 1.00 Äq) in THF (8.0 ml) wurde unter Argonatmosphäre zu einer Suspension von NaH (60%, 157.7 mg, 6.57 mmol, 3.00 Äq) in THF (4.5 ml) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rühren voraktiviert. Anschließend wurde Mel (0.818 ml, 13.14 mmol, 6.00 Äq) zugegeben, und das Reaktionsgemisch für 17 Stunden bei 65 °C unter Rühren weiter umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (50 ml) aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit ges. NH₄Cl-Lösung (20.0 ml) und Wasser (20.0 ml) gewaschen, anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex: EtOAc = 19:1). Die Verbindung **72** wurde so in einer Ausbeute von 79% (818.2 mg, 1.74 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 10.5 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 4.74-4.72 (m, 1H), 4.61-4.59 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.18 (dd, 1H, J = 11.2, 5.1 Hz), 2.99 (td, 1H, J = 11.0, 4.6 Hz), 2.25-2.15 (m, 2H), 1.93-1.84 (m, 2H), 1.73-1.69 (m, 1H), 1.68 (s, 1H), 1.67-1.64 (m, 1H), 1.63-1.54 (m, 3H), 1.51-1.48 (m, 2H), 1.40-1.35 (m, 6H), 1.30-1.23 (m, 2H), 1.16-1.08 (m, 1H), 1.05-0.99 (m, 1H), 0.96 (s, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.90-0.84 (m, 1H), 0.82 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.70-0.65 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 176.8, 150.5, 109.7, 79.2, 56.7, 55.5, 51.4, 50.7, 49.7, 47.1, 42.6, 40.9, 39.0, 38.9, 38.5, 37.4, 37.1,

34.5, 32.4, 30.8, 29.9, 28.1, 27.6, 25.7, 21.1, 19.5, 18.5, 16.3, 16.1, 15.5, 14.9.

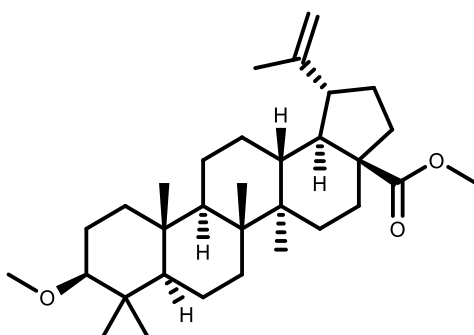
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3538 (w), 3455 (w), 2939 (m), 2869 (w), 1718 (s), 1699 (s), 1640 (w), 1443 (m), 1192 (w), 1083 (w), 886 (s), 782 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3 + \text{Na}]^+$

Ber.: 493.3652

Gef.: 493.3648.

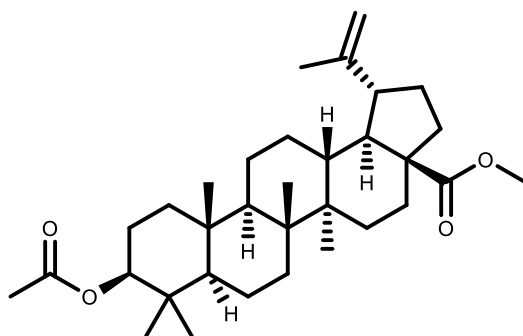
Methyl (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-methoxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate (73, BGE-029)^[333]



Die Verbindung **73** (155.0 mg, 0.32 mmol, 15%) wurde als Nebenprodukt im Rahmen der Synthese von Verbindung **72** erhalten und ohne weitere Charakterisierung unmittelbar zur Darstellung von Verbindung **75** eingesetzt.

HPLC: t_R = 14.4 min (Methode C)

Methyl (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-acetoxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate (74, BGE-070)^[231]



Zu einer Lösung des Substrats **72** (70.8 mg, 0.15 mmol, 1.00 Äq) und DMAP (1.8 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) in trockenem THF (3.0 ml) wurden Ac₂O (28.0 µl, 0.30 mmol,

2.00 Äq) sowie DIPEA (0.18 ml, 1.05 mmol, 7.00 Äq) zugegeben. Nach fünfstündigem Rühren unter Rückfluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in CHCl_3 (10.0 ml) gelöst und dreimal mit Wasser (5.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wodurch das reine Produkt **74** in einer Ausbeute von 91% (70.0 mg, 0.137 mmol) erhalten wurde.

HPLC: $t_R = 14.0$ min (Methode C)

$^1\text{H-NMR}$: (Aceton- d_6 , 600 MHz) δ [ppm] = 4.76 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.63 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz), 4.47 (dd, 1H, $J = 11.3, 5.2$ Hz), 3.69 (s, 3H), 3.05 (td, 1H, $J = 10.8, 5.1$ Hz), 2.36-2.27 (m, 1H), 2.28-2.21 (m, 1H), 2.08-2.02 (m, 6H), 1.96-1.84 (m, 2H), 1.80-1.68 (m, 5H), 1.70-1.59 (m, 2H), 1.59-1.36 (m, 8H), 1.34-1.26 (m, 1H), 1.22-1.16 (m, 1H), 1.13 (td, 1H, $J = 13.0, 4.6$ Hz), 1.05 (s, 4H), 0.97 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 0.88 (s, 3H), 0.88 (s, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (Aceton- d_6 , 151 MHz) δ [ppm] = 174.6, 169.2, 149.0, 107.7, 79.0, 54.8, 53.7, 49.2, 48.8, 47.7, 45.5, 40.7, 39.0, 36.6, 36.6, 36.0, 35.4, 34.9, 32.5, 30.2, 28.8, 28.0, 25.8, 23.9, 21.9, 19.2, 18.6, 16.4, 14.4, 14.1, 13.9, 12.6.

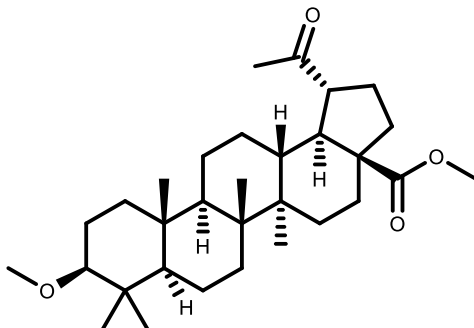
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3377 (w), 2967 (w), 2942 (m), 2873 (w), 1733 (s), 1727 (s), 1451 (m), 1361 (m), 1240 (s), 1156 (m), 1139 (s), 1010 (w), 978 (m), 900 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_4 + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 535.3758

Gef.: 535.3759.

Methyl (1*R*,3*aS*,5*aR*,5*bR*,7*aR*,9*S*,11*aR*,11*bR*,13*aR*,13*bS*)-1-acetyl-9-methoxy-5*a*,5*b*,8,8,11*a*-pentamethylcosahydro-3*aH*-cyclopenta[*a*]chrysene-3*a*-carboxylate (75**, BGE-072)**



Ozon wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden bei -78 °C durch eine Lösung des Edukts **74** (100.0 mg, 0.21 mmol, 1.00 Äq) in einem 4:1-Gemisch aus MeOH/DCM (10.0 ml) geleitet. Der Ozonüberschuss wurde anschließend durch Einleiten von Stickstoff entfernt, bis die charakteristische blaue Färbung der Lösung vollständig verschwunden war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dimethylsulfid (17 µl, 0.23 mmol, 1.10 Äq) gestoppt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel (CycHex:EtOAc 19:1) gereinigt. Das Zielprodukt **75** wurde in einer Ausbeute von 22% (21.9 mg, 0.046 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 12.9 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 3.66 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.25 (dd, 1H, J = 11.3, 4.6 Hz), 2.28-2.21 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.10 (dd, 1H, J = 11.3 Hz), 2.05-1.93 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 1H), 1.79-1.66 (m, 3H), 1.43-1.19 (m, 10H), 1.19-1.15 (m, 1H), 1.09-1.02 (m, 2H), 0.98 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.86-0.82 (m, 1H), 0.80 (s, 3H), 0.72 (s, 3H), 0.70-0.63 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 212.3, 176.3, 80.4, 57.3, 56.2, 55.7, 51.2, 51.0, 50.2, 49.3, 42.0, 40.4, 38.6, 38.4, 37.2, 37.0, 36.4, 34.0, 31.3, 30.0, 29.5, 28.1, 27.8, 27.1, 22.0, 20.7, 18.0, 15.9, 15.9, 15.7, 14.5.

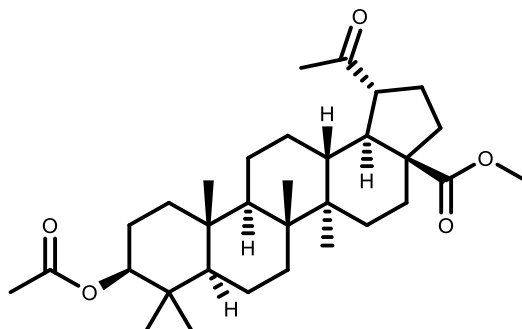
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2947 (s), 2867 (w), 2847 (w), 1724 (s), 1708 (s), 1449 (m), 1353 (m), 1135 (s), 1098 (s), 974 (m), 816 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[C_{31}H_{50}O_4 + Na]^+$

Ber.: 509.3601

Gef.: 509.3598.

Methyl (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bS)-9-acetoxy-1-acetyl-5a,5b,8,8,11a-pentamethylicosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate (76, BGE-071)^[247]



Zu einer Lösung des Edukts **74** (70.0 mg, 0.14 mmol, 1.00 Äq) in einem 1:1-Gemisch aus Aceton und Wasser (2.0 ml) wurden Rutheniumtetroxid (101.4 mg, 0.61 mmol, 4.50 Äq) sowie Natriumperodat (87.6 mg, 0.41 mmol, 3.00 Äq) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde in DCM (20.0 ml) aufgenommen und das unlösliche Rutheniumtetroxid durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde je einmal mit Wasser (10.0 ml) sowie mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie (CycHex:EtOAc 4:1) und ergab die Zielverbindung **76** in einer Ausbeute von 44% (31.1 mg, 0.062 mmol).

HPLC: t_R = 12.9 min (Methode C)

1H -NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz) δ [ppm] = 4.46 (dd, 1H, J = 11.3, 5.0 Hz), 3.67 (s, 3H), 3.25 (td, 1H, J = 11.2, 4.5 Hz), 2.28-2.22 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.13-2.07 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.02-1.96 (m, 1H), 1.91-1.86 (m, 1H), 1.60-1.25 (m, 15H), 1.19-1.15 (m, 1H), 1.09-1.05 (m, 2H), 0.98 (s, 3H), 0.97-0.93 (m, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.84 (s, 6H), 0.82 (s, 3H), 0.80-0.77 (m, 1H).

^{13}C -NMR: ($CDCl_3$, 101 MHz) δ [ppm] = 212.3, 176.5, 171.0, 80.9, 56.4, 55.4, 51.4, 51.3, 50.3, 49.5, 42.2, 40.6, 38.4, 37.8, 37.4, 37.1, 36.6,

34.2, 31.5, 30.0, 29.7, 28.3, 27.9, 27.2, 23.7, 21.3, 20.9, 18.2, 16.5, 16.1, 15.9, 14.7.

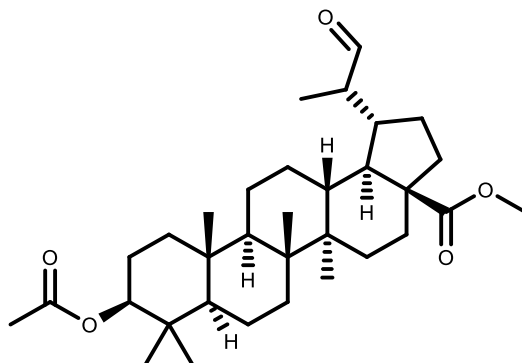
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2944 (m), 2872 (w), 1733 (m), 1714 (s), 1455 (w), 1243 (s), 1152 (w), 1136 (m), 1013 (w), 978 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5 + \text{Na}]^+$

Ber.: 537.3550

Gef.: 537.3550.

Methyl (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-acetoxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-((R)-1-oxopropan-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate (77, BGE-075)



Zu einer Mischung aus einer vierprozentigen Lösung OsO_4 in H_2O (25.0 μg , 0.10 μmol , 2.0 mol%) und NMO (29.7 mg, 0.25 mmol, 1.30 Äq) in 1.0 ml DCM wurde eine Lösung des Edukts **74** (100.0 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq) in 0.5 ml DCM gegeben und für fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer 10%-Lösung aus NaHSO_4 in H_2O (5.0 ml) gequenchet und für eine Stunde weiter gerührt, wodurch die vollständige Zersetzung des OsO_4 gewährleistet wurde. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit 50.0 ml EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 50.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer DC (CH:EA 4:1) gereinigt und das Produkt **77** in 52% (54.0 mg, 0.20 mmol) Ausbeute isoliert.

HPLC: t_R = 7.3 min (Methode C)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 9.83 (d, 1H, J = 1.9 Hz), 4.47 (dd, 1H, J = 11.0, 5.5 Hz), 3.65 (s, 3H), 2.41-2.12 (m, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.91-1.79 (m, 2H), 1.73-1.66 (m, 3H), 1.64-1.57 (m, 3H), 1.52-1.46

(m, 2H), 1.41-1.32 (m, 6H), 1.29-1.23 (m, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.16-1.10 (m, 1H), 1.04-0.97 (m, 1H), 0.96 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.80-0.76 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 207.1, 177.1, 171.4, 81.3, 60.7, 55.7, 51.7, 50.8, 48.8 (2C), 47.1, 43.5, 41.5, 38.8, 38.6, 38.2, 37.4, 37.1, 34.9, 32.5, 30.3, 29.3, 28.3 (2C), 28.2, 25.0, 24.0, 21.8, 21.7, 18.5, 17.9, 16.6, 15.5.

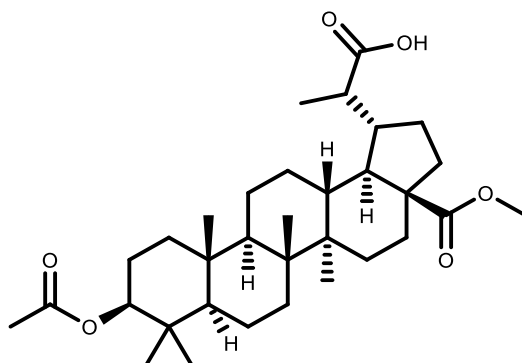
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2943 (m), 2870 (w), 1733 (m), 1714 (s), 1453 (w), 1243 (s), 1156 (w), 1135 (m), 1026 (m), 978 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₃H₅₂O₅ + Na]⁺

Ber.: 551.33707

Gef.: 537.3702.

(R)-2-((1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-Acetoxy-3a-(methoxycarbonyl)-5a,5b,8,8,11a-pentamethylcosahydro-1H-cyclopenta[a]chrysen-1-yl)propanoic acid (780, BGE-073)^[247]



Unter einer Argonatmosphäre wurden KMnO₄ (616.4 mg, 3.90 mmol, 20.00 Äq) und CuSO₄ x 5 H₂O (486.8 mg, 1.95 mmol, 10.00 Äq) zu einer Lösung der Verbindung **74** (100.0 mg, 0.195 mmol, 1.00 Äq) in einem Lösungsmittelgemisch aus DCM (10.0 ml), tert-Butanol (0.5 ml) und Wasser (0.15 ml) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Dichlormethan (10.0 ml) verdünnt und nacheinander dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung (10.0 ml), Wasser (10.0 ml) sowie ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel

im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (CycHex:EtOAc 1:1) gereinigt, wobei die Zielverbindung **76** in einer Ausbeute von 12% (13.1 mg, 0.02 mmol) erhalten wurde.

HPLC: $t_R = 9.3$ min (Methode C)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 4.48 (dd, 1H, $J = 11.2, 5.2$ Hz), 3.65 (s, 3H), 2.74 (dd, 1H, $J = 7.1, 3.1$ Hz), 2.23-2.19 (m, 1H), 2.19-2.14 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.83-1.73 (m, 2H), 1.71-1.66 (m, 3H), 1.64-1.60 (m, 2H), 1.52-1.46 (m, 2H), 1.40-1.31 (m, 9H), 1.28-1.26 (m, 1H), 1.16 (s, 3H), 1.14-1.10 (m, 1H), 1.03-0.96 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.81-0.77 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 101 MHz) δ [ppm] = 181.1, 177.4, 171.1, 81.3, 57.2, 55.8, 51.6, 50.5, 50.1, 43.5, 42.9, 42.6, 41.1, 38.8, 38.5, 38.2, 37.5, 36.8, 34.7, 32.3, 30.1, 28.2, 27.4, 24.9, 24.1, 21.7, 21.3, 18.5, 17.6, 16.9, 16.5, 16.3, 14.9.

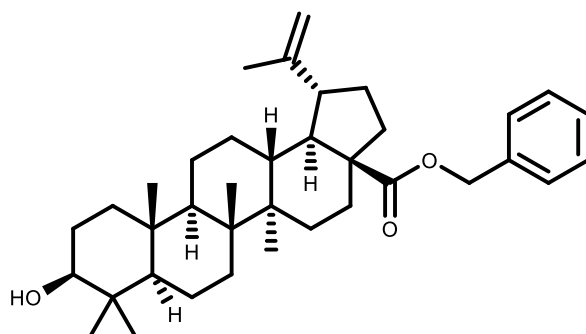
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2941 (s), 2871 (w), 1707 (s), 1454 (m), 1366 (m), 1269 (s), 1156 (w), 1135 (w), 1026 (m), 978 (m), 899 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_6 + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 567.3656

Gef.: 567.3656.

Benzyl (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-hydroxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate (79, BGE-103)^[334]



Betulinsäure (2.40 g, 5.26 mmol, 1.00 Äq) und K₂CO₃ (1.45 g, 10.51 mmol, 2.00 Äq) wurden in 27.0 ml DMF gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit Benzylbromid (1.00 ml, 8.41 mmol, 1.60 Äq) versetzt und drei Tage bei 70°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 200.0 ml H₂O verdünnt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, getrocknet und in 70.0 ml EtOAc gelöst. Die organische Phase wurde dreimal mit 30 ml H₂O und einmal mit 30.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (CycHex) wurde das saubere Produkt **79** in 92% (2.64 g, 4.83 mmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: t_R = 11.9 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 7.38-7.29 (m, 5H), 5.19-5.05 (m, 2H), 4.72 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 4.59 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 3.17 (dd, 1H, J = 11.5, 4.8 Hz), 3.01 (dt, 1H, J = 10.9, 4.8 Hz), 2.28 (dt, 1H, J = 12.4, 3.2 Hz), 2.22-2.13 (m, 1H), 1.94-1.81 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 5H), 1.63-1.46 (m, 4H), 1.45-1.14 (m, 10H), 1.09 (dt, 1H, J = 13.5, 3.2 Hz), 1.01 (dt, 1H, J = 12.8, 4.7 Hz), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.88 (dt, 1H, J = 13.1, 4.2 Hz), 0.80 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.69-0.59 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 176.0, 150.8, 136.7, 128.7 (2C), 128.4 (2C), 128.2, 109.8, 79.2, 65.9, 56.8, 55.6, 50.8, 49.7, 47.1, 42.6, 40.9, 39.1, 38.9, 38.4, 37.4, 37.1, 34.5, 32.3, 30.8, 29.8, 28.2, 27.6, 27.1, 25.8, 21.0, 19.5, 18.5, 16.3, 16.0.

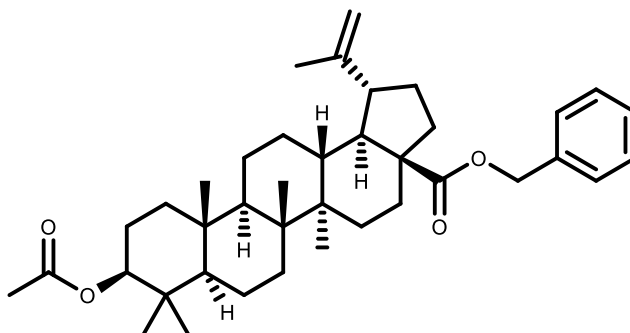
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3531 (s), 3078 (w), 2940 (s), 2868 (w), 1690 (s), 1446 (m), 1184 (m), 1062 (m), 882 (s), 783 (s), 699 (s), 621 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_3 + \text{Na}]^+$

Ber.: 569.3965

Gef.: 569.3967.

Benzyl (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-acetoxy-5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-3aH-cyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylate (80, BGE-104)^[335]



Verbindung **79** (2.62 g, 4.79 mmol, 1.00 Äq) und DMAP (58.5 mg, 0.48 mmol, 0.10 Äq) wurden in 60.0 ml trockenem THF gelöst und mit Ac_2O (0.91 ml, 9.58 mmol, 2.00 Äq) und DIPEA (5.84 ml, 33.52 mmol, 7.00 Äq) versetzt. Die Lösung wurde 6.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in CHCl_3 (50.0 ml) gelöst, mit H_2O (30.0 ml) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CycHex: EtOAc 9:1) wurde das Produkt **80** in 90% (2.53 g, 4.29 mmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: t_R = 13.9 min (Methode C)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 7.38-7.33 (m, 4H), 7.33-7.29 (m, 1H), 5.16-5.08 (m, 2H), 4.72 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.46 (dd, 1H, J = 11.0, 5.4 Hz), 3.01 (dt, 1H, J = 11.0, 4.8 Hz), 2.28 (dt, 1H, J = 12.5, 3.3 Hz), 2.22-2.13 (ddd, 1H, J = 12.9, 11.5, 3.7 Hz), 2.03 (s, 3H), 1.93-1.83 (m, 2H), 1.69-1.67 (m, 3H), 1.66-1.63 (m, 1H), 1.61-1.56 (m, 3H), 1.48-1.25 (m, 11H), 1.20 (td, 1H, J = 12.6, 4.4 Hz), 1.09 (dt, 1H, J = 13.5, 3.2 Hz), 1.05-0.95 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.82 (s, 6H), 0.76 (s, 4H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 176.0, 171.1, 150.7, 136.7, 128.6 (2C), 128.4 (2C), 128.2, 109.8, 81.1, 65.9, 56.7, 55.6, 50.6, 49.6, 47.1, 42.6, 40.8, 38.6, 38.4, 38.0, 37.3, 37.1, 34.4, 32.3, 30.8, 29.7, 28.1, 25.7, 23.9, 21.5, 21.1, 19.5, 18.3, 16.6, 16.3, 16.0, 14.8.

IR: (ATR) ν_{max}/cm⁻¹ 2944 (s), 2868 (w), 1736 (s), 1722 (s), 1454 (m), 1368 (m), 1241 (s), 1127 (s), 975 (m), 750 (s), 697 (s), 627 (w).

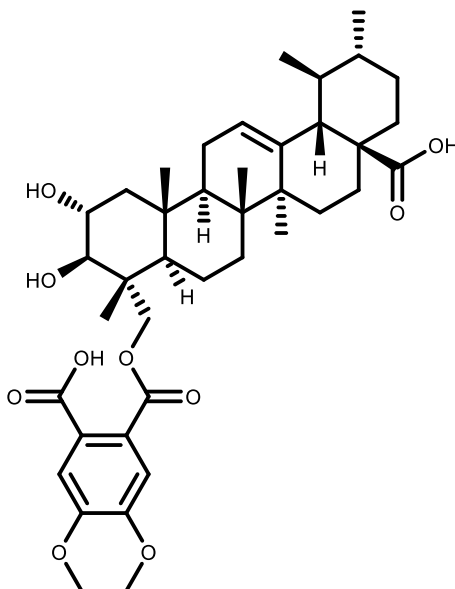
HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₉H₅₆O₄ +Na]⁺

Ber.: 611.4071

Gef.: 611.4073.

5.4.2 Synthese der Derivate des Ursan-Typs

(1*S*,2*R*,4*aS*,6*aS*,6*bR*,8*aR*,9*R*,10*R*,11*R*,12*aR*,12*bR*,14*bS*)-9-(((2-Carboxy-4,5-dimethoxybenzoyl)oxy)methyl)-10,11-dihydroxy-1,2,6*a*,6*b*,9,12*a*-hexamethyl-1,3,4,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,12*b*,13,14*b*-octadecahydronicene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid (83, BGE-025)



Asiatsäure (**82**) (50.00 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq), 5,6-Dimethoxy-2-benzofuran-1,3-dione (85.19 mg, 0.41 mmol, 4.0 Äq) und DMAP (1.25 mg, 0.01 mmol, 0.1 Äq) wurden in 1.5 ml Pyridin gelöst und bei 100°C gerührt. Die Reaktion wurde nach fünf Tagen beendet und mit 10.0 ml EtOAc verdünnt, zweimal mit 5.0 ml 1 M HCl und zweimal mit 5.0 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels

präparativer HPLC (H₂O:MeCN 5% → 95% MeCN) aufgereinigt und ergab das Produkt **83** in 35% (25.0 mg, 0.04 mmol) Ausbeute.

HPLC: t_R = 10.3 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 7.25 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.14-5.11 (m, 1H), 4.15 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 3.98 (d, 1H, J = 11.0 Hz), 3.85-3.84 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.80-3.79 (m, 1H), 3.53-3.50 (m, 1H), 2.10 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 2.08-2.03 (m, 1H), 1.91-1.87 (m, 2H), 1.82-1.73 (m, 1H), 1.59-1.46 (m, 6H), 1.46-1.33 (m, 3H), 1.31-1.20 (m, 4H), 1.06 (m, 3H), 1.02-0.97 (m, 2H), 0.95 (s, 3H), 0.94-0.92 (m, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.79 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 0.76 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 178.3, 167.9, 167.6, 167.2, 167.0, 150.5, 150.3, 150.2, 149.7, 138.3, 126.6, 125.4, 125.2, 124.2, 124.1, 111.7, 111.6, 111.4, 111.0, 73.3, 72.0, 66.4, 55.9, 55.9, 55.8, 55.8, 52.4, 46.8, 46.8, 42.5, 42.4, 41.6, 40.1, 38.5, 38.4, 37.5, 36.3, 32.0, 30.2, 27.4, 23.7, 23.0, 22.9, 21.0, 17.7, 17.0, 16.9, 16.7, 13.4.

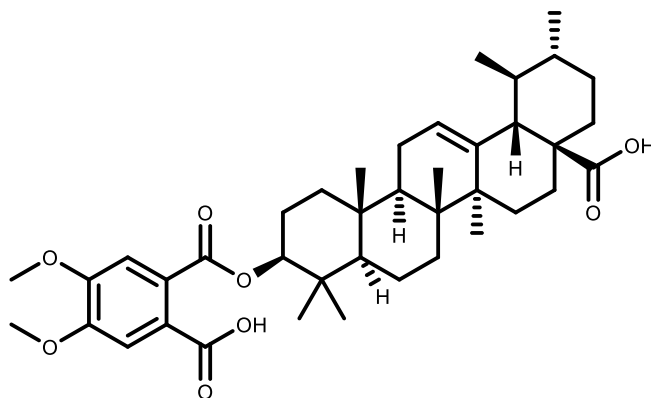
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2925 (m), 1695 (s), 1520 (w), 1353 (w), 1280 (s), 1209 (s), 1134 (m), 1055 (w), 1026 (w), 727 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₄₀H₅₆O₁₀ + Na]⁺

Ber.: 719.3766

Gef.: 719.3769.

(1*S*,2*R*,4*aS*,6*aS*,6*bR*,8*aR*,10*S*,12*aR*,12*bR*,14*bS*)-10-((2-Carboxy-4,5-dimethoxybenzoyl)oxy)-1,2,6*a*,6*b*,9,9,12*a*-heptamethyl-1,3,4,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,12*b*,13,14*b*-octadecahydronicene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid (84**, BGE-017)**



Für die Synthese des Produkts **84** wurden Ursolsäure (200.0 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) und 5,6-Dimethoxy-2-benzofuran-1,3-dion (182.3 mg, 0.88 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (5.4 mg, 43.8 µmol, 0.10 Äq) in 3.0 ml Pyridin gelöst. Die Reaktion erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 100 °C. Die Reaktionslösung wurde mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und zweimal mit 10.0 ml 1 M HCl sowie zweimal mit 10.0 ml H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der Reinigung mittels präparativer HPLC (H₂O:MeCN 5% → 95% MeCN) wurde das saubere Produkt **84** in 8% (23.6 mg, 35.5 µmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: t_R = 12.2 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 7.20 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.17-5.13 (m, 1H), 4.62-4.56 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.18-2.06 (m, 1H), 2.01-1.75 (m, 5H), 1.75-1.67 (m, 2H), 1.76-1.59 (m, 2H), 1.59-1.39 (m, 8H), 1.38-1.27 (m, 4H), 1.24 (s, 3H), 1.20-1.10 (m, 1H), 1.08 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.77 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 184.1, 170.6, 168.3, 151.3, 150.8, 138.0, 126.0, 125.9, 125.7, 124.0, 113.4, 112.1, 83.6, 56.2, 56.1, 55.3, 52.4, 48.0, 47.3, 41.9, 39.5, 39.0, 38.8, 38.1, 37.9, 36.9, 36.8, 32.7, 30.5, 29.6, 28.3, 28.0, 24.0, 23.6, 23.3, 22.8, 21.1, 18.1.

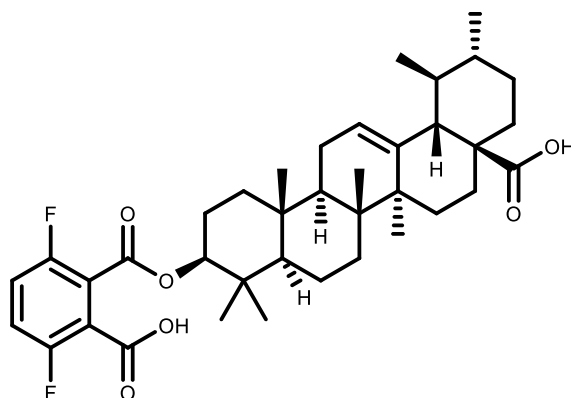
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2924 (m), 2850 (w), 1714 (w), 1694 (s), 1463 (w), 1353 (w), 1277 (s), 1205 (s), 1174 (s), 1136 (s), 986 (w), 949 (w), 703 (s), 647 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_8 + \text{Na}]^+$

Ber.: 687.3867

Gef.: 687.3873.

(1S,2R,4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,12bR,14bS)-10-((2-Carboxy-3,6-difluorobenzoyl)oxy)-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2H)-carboxylic acid (85, BGE-044)



Die Synthese des Produkts **85** erfolgte, indem Ursolsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq) und 3,6-Difluorphthalsäureanhydrid (80.6 mg, 0.44 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (2.7 mg, 21.9 μmol , 0.10 Äq) in 3.0 ml Pyridin gelöst wurde. Nach einer Reaktionsdauer von sieben Tagen bei 100 °C wurde die Reaktionslösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und zweimal mit 10.0 ml 1 M HCl sowie zweimal mit 10.0 ml H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der Reinigung mittels präparativer HPLC (H₂O:MeCN 5% → 95% MeCN) wurde das saubere Produkt **85** in 14% (19.2 mg, 29.96 μmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: t_R = 9.3 min (Methode A)

¹H-NMR: (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ [ppm] = 7.54 (dd, 2H, J = 6.5 Hz), 5.16-5.10 (m, 1H), 4.68 (dd, 1H, J = 9.1 Hz), 2.12 (d, 1H, J = 11.3 Hz), 1.96-1.82 (m, 3H), 1.78-1.62 (m, 3H), 1.61-1.38 (m, 8H), 1.35-1.21 (m, 4H), 1.17-1.08 (m, 1H), 1.07 (s, 3H), 1.05-0.96 (m, 1H), 0.92 (s, 10H), 0.84-0.80 (m, 6H), 0.76 (s, 3H).

^{13}C -NMR: (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ [ppm] = 178.3, 163.7, 162.5, 156.1, 153.7, 138.3, 122.1, 121.8, 120.3, 82.9, 54.5, 52.4, 46.9, 46.8, 41.7, 38.5, 38.4, 37.6, 37.4, 36.4, 36.3, 32.5, 30.2, 27.7, 27.6, 23.8, 23.3, 22.9, 22.7, 21.1, 17.8, 17.0, 16.9, 16.6, 15.1.

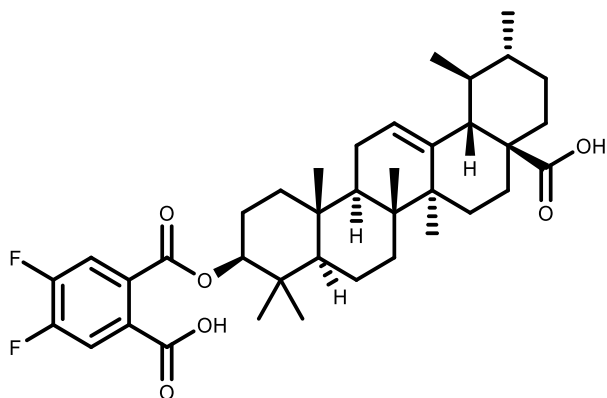
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2925 (m), 1718 (s), 1685 (s), 1473 (m), 1273 (s), 1252(s), 1139 (w), 1024 (w), 990 (s), 965 (s), 820 (m), 727 (m), 663 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{F}_2 + \text{H}$] $^+$

Ber.: 639.3503

Gef.: 639.3502.

(1S,2R,4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,12bR,14bS)-10-((2-Carboxy-4,5-difluorobenzoyl)oxy)-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2H)-carboxylic acid (86**, BGE-046)**



Die Synthese des Produkts **86** erfolgte, indem Ursolsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq) und 4,5-Difluorphthalsäureanhydrid (80.6 mg, 0.44 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (2.7 mg, 21.9 μmol , 0.10 Äq) in 3.0 ml Pyridin gelöst wurde. Nach einer Reaktionsdauer von neun Tagen bei 100 °C wurde die Reaktionslösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und zweimal mit 10.0 ml 1 M HCl sowie zweimal mit 10.0 ml H_2O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der Reinigung mittels präparativer HPLC ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 5% $\rightarrow$ 95% MeCN) wurde das saubere Produkt **86** in 29% (40.8 mg, 0.06 mmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: t_R = 14.1 min (Methode B)

^1H -NMR: (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ [ppm] = 7.70 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.52 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 5.25 (m, 1H), 4.73 (dd, 1H, J = 12.0, 4.7 Hz), 2.20

(d, 1H, $J = 11.0$ Hz), 2.06-1.97 (m, 1H), 1.97-1.82 (m, 4H), 1.75-1.63 (m, 5H), 1.59-1.47 (m, 4H), 1.39-1.28 (m, 4H), 1.17-1.07 (m, 5H), 1.06-1.00 (m, 1H), 0.96 (s, 6H), 0.93 (s, 3H), 0.90-0.86 (m, 4H), 0.85 (s, 3H), 0.79 (s, 3H).

^{13}C -NMR: (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ [ppm] = 178.3, 163.7, 162.5, 156.1, 153.7, 138.3, 124.5, 122.0, 121.8, 120.3, 82.9, 54.5, 52.4, 46.9, 46.8, 41.7, 38.5, 38.4, 37.6, 37.4, 32.5, 30.2, 27.7, 27.6, 23.8, 23.3, 22.9, 22.7, 21.1, 17.8, 17.0, 16.9, 16.6, 15.1.

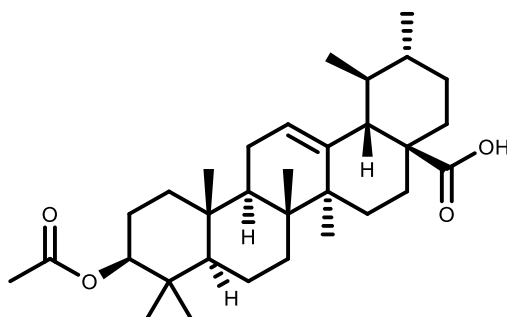
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2924 (m), 1685 (s), 1606 (w), 1320 (m), 1253 (m), 1180 (m), 1116 (w), 965 (w), 899 (w), 734 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{F}_2 + \text{H}$] $^{+}$

Ber.: 639.3503

Gef.: 639.3502.

(1S,2R,4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,12bR,14bS)-10-Acetoxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydro-picene-4a(2H)-carboxylic acid (87, BGE-045)^[336]



Ursolsäure (200.0 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) wurde in 7.0 ml trockenem THF gelöst und mit Acetanhydrid (69.5 μl , 0.66 mmol, 1.50 Äq), DIPEA (0.52 ml, 3.07 mmol, 7.00 Äq) und DMAP (5.4 mg, 0.04 mmol, 0.1 Äq) versetzt und für fünfeinhalb Stunden zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wurde im Vakuum eingeeengt und mit 20.0 ml EtOAc verdünnt. Die organische Phase wurde mit 10.0 ml H_2O und 10.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (CycHex:EtOAc 9:1) gereinigt und das Produkt **87** als weißes Pulver in 63% (148.4 mg, 0.27 mmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: $t_R = 14.6$ min (Methode B)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 600 MHz) δ [ppm] = 5.13(t, 1H, *J* = 3.6 Hz), 4.40 (dd, 1H, *J* = 11.5, 4.7 Hz), 2.15-2.08 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.94-1.75 (m, 4H), 1.59-1.47 (m, 8H), 1.42-1.14 (m, 6H), 1.05 (s, 3H), 1.03-0.95 (m, 2H), 0.93-0.89 (m, 7H), 0.87-0.84 (m, 1H) 0.83-0.80 (m, 9H), 0.76 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 151 MHz) δ [ppm] = 178.3, 170.1, 138.3, 124.4, 79.9, 54.5, 52.4, 46.8, 46.8, 41.7 (2C), 38.5, 38.4, 37.7, 37.3, 36.4, 36.3, 32.5, 30.2, 27.8 (2C), 27.6, 23.8, 23.3, 22.8, 21.1, 21.1, 17.8, 17.0, 16.9, 16.7, 15.2.

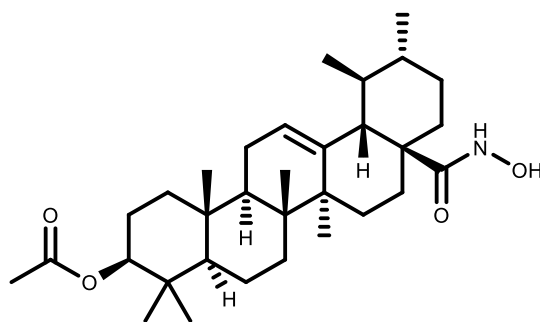
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 2924 (s), 1733 (s), 1689 (s), 1455 (m) 1369 (m), 1242 (s), 1027 (m), 967 (w), 905 (w), 732 (m) 661 (w).

HRMS (ESI(+)): *m/z* [C₃₂H₅₀O₄ +Na]⁺

Ber.: 521.3601

Gef.: 521.3603.

(3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,11*R*,12*S*,12*aS*,14*aR*,14*bR*)-8*a*-(Hydroxycarbamoyl)-4,4,6*a*,6*b*,11,12,14*b*-heptamethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-icosahydricen-3-yl acetate (88, BGE-154)^[258]



Acetoxyursolsäure (**87**) (536.00 mg, 1.07 mmol, 1.00 Äq) wurde in 18.0 ml DCM gelöst und bei 0°C mit Oxalylchlorid (0.55 ml, 6.45 mmol, 6.00 Äq) versetzt. Die Lösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 34.0 ml DCM gelöst. Die Lösung wurde mit NEt₃ (1.05 ml, 7.52 mmol, 7.00 Äq) und HNOH x HCl (582.524 mg, 8.38 mmol, 7.80 Äq) versetzt und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionlösung wurde je einmal mit 20.0 ml ges. NaCl-Lösung, 20.0 ml ges. NaHCO₃-Lösung, 20.0 ml H₂O und 20.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit 20 ml DCM ex-

trahiert und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels *reversed phase* Säulenchromatographie (MeOH:H₂O 5% → 95% MeOH) gereinigt und ergab das Produkt **88** in 47% (260.9 mg, 0.50 mmol) Ausbeute.

HPLC: t_R = 12.3 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 8.59 (s, 1H), 5.40-5.38 (m, 1H), 4.49 (dd, 1H, J = 10.3, 5.5 Hz), 2.04 (s, 3H), 2.02-1.97 (m, 3H), 1.85 (d, 1H, J = 10.7 Hz), 1.79-1.71 (m, 1H), 1.67-1.61 (m, 3H), 1.58-1.46 (m, 5H), 1.42-1.41 (m, 2H), 1.34-1.25 (m, 2H), 1.09 (s, 3H), 1.08-1.01 (m, 2H), 0.96-0.93 (m, 7H), 0.90-0.82 (m, 12H), 0.82-0.80 (m, 1H), 0.80 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 151 MHz) δ [ppm] = 177.2, 171.1, 140.5, 126.7, 80.9, 55.4, 52.2, 47.6, 47.1, 42.5, 39.7, 39.6, 39.1, 38.4, 37.8, 37.0, 36.8, 32.5, 30.7, 28.2, 27.9, 27.1, 24.9, 23.7, 23.4, 21.4, 21.3, 18.3, 17.3, 16.8 (2C), 15.7.

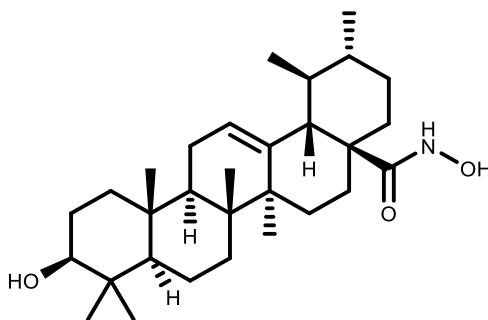
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2953 (w), 2922 (s), 2853 (w), 1735 (m), 1463 (m), 1377 (m), 1275 (m), 950 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₂H₅₁O₄N + Na]⁺

Ber.: 536.3710

Gef.: 536.3709.

(1S,2R,4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,12bR,14bS)-N,10-Dihydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2H)-carboxamide (89, BGE-156)^[258]



KOH (235.7 mg, 4.20 mmol, 9.50 Äq) wurde in 22.0 ml MeOH gelöst und Acetoxysolhydroxamsäure (**88**) (227.2 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) hinzugefügt. Die Lösung

wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels *reversed phase* Säulenchromatographie (MeOH:H₂O 5% → 95% MeOH) gereinigt. Das Produkt **89** wurde in 87% (180.8 mg, 0.83 mmol) Ausbeute isoliert.

HPLC: t_R = 10.5 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 5.41-5.39 (m, 1H), 3.22 (dd, 1H, J = 11.3, 4.5 Hz), 2.03-1.97 (m, 3H), 1.86 (d, 1H, J = 10.7 Hz), 1.78-1.74 (m, 1H), 1.53-1.43 (m, 3H), 1.63-1.42 (m, 11H), 1.32-1.25 (m, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.09-1.05 (m, 1H), 1.04-1.00 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (d, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92-0.90 (m, 1H), 0.89-0.87 (m, 1H), 0.86 (s, 1H), 0.85 (s, 1H), 0.79 (s, 6H), 0.74-0.71 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 177.4, 140.5, 126.8, 79.1, 55.3, 52.1, 47.7, 47.1, 42.5, 39.7, 39.6, 39.1, 38.9, 38.8, 37.1, 36.8, 30.7, 29.9, 28.2, 27.9, 27.3, 24.9, 23.6, 23.4, 21.3, 18.4, 17.3, 16.9, 15.7, 15.6.

IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3361 (w), 2920 (s), 2852 (m), 1634 (s), 1456 (s), 1378 (m), 1028 (s), 997 (s), 805 (w).

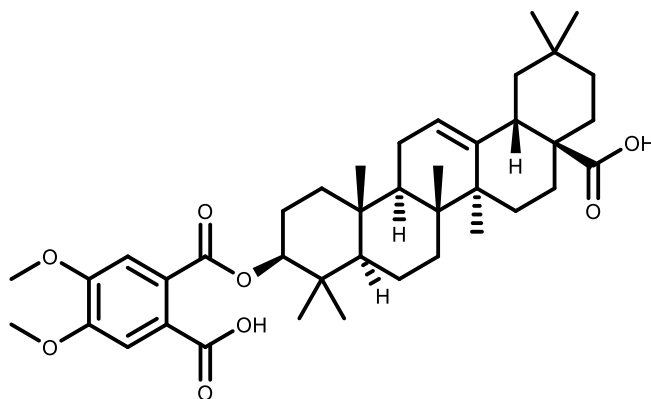
HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₀H₄₉O₃N + Na]⁺

Ber.: 494.3605

Gef.: 494.3606.

5.4.3 Synthese der Derivate des Oleantyps

(4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,12bR,14bS)-10-((2-Carboxy-4,5-dimethoxybenzoyl)oxy)-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2H)-carboxylic acid (97**, BGE-016)**



Für die Synthese des Produkts **97** wurden Oleanolsäure (200.0 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) und 5,6-Dimethoxy-2-benzofuran-1,3-dion (136.7 mg, 0.66 mmol, 1.50 Äq) und DMAP (5.4 mg, 43.8 µmol, 0.10 Äq) in 3.0 ml Pyridin gelöst. Die Reaktion erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 100 °C. Die Reaktionslösung wurde mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und zweimal mit 10.0 ml 1 M HCl sowie zweimal mit 10.0 ml H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der Reinigung mittels präparativer HPLC (H₂O:MeCN 5% → 95% MeCN) wurde das saubere Produkt **97** in 11% (32.2 mg, 48.4 µmol) Ausbeute erhalten.

HPLC: $t_R = 12.1$ min (Methode B)

¹H-NMR: (Acetone-d₆/Essigsäure-d₄ (3:2), 400 MHz) δ [ppm] = 7.21 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 5.19-5.16 (m, 1H), 4.63-4.55 (m, 1H), 2.80-2.71 (m, 1H), 1.97-1.88 (m, 1H), 1.88-1.80 (m, 2H), 1.74-1.64 (m, 3H), 1.64-1.55 (m, 4H), 1.54-1.40 (m, 4H), 1.38-1.20 (m, 4H), 1.18-1.14 (m, 1H), 1.13 (s, 3H), 1.10-0.96 (m, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 6H), 0.83 (s, 3H), 0.74 (s, 3H).

¹³C-NMR: (Aceton-d₆/Essigsäure-d₄ (3:2), 101 MHz) δ [ppm] = 181.4, 169.8, 168.1, 152.0, 151.6, 144.7, 127.2, 125.6, 123.1, 112.8, 112.5, 83.2, 56.4, 56.4, 56.2, 48.3, 47.1, 46.7, 42.5, 42.1, 40.2, 38.8,

38.5, 37.7, 34.4, 33.4, 33.3, 31.2, 30.3, 28.5, 28.4, 26.2, 24.1, 23.8, 23.7, 23.6, 18.9, 17.5, 17.2, 15.7.

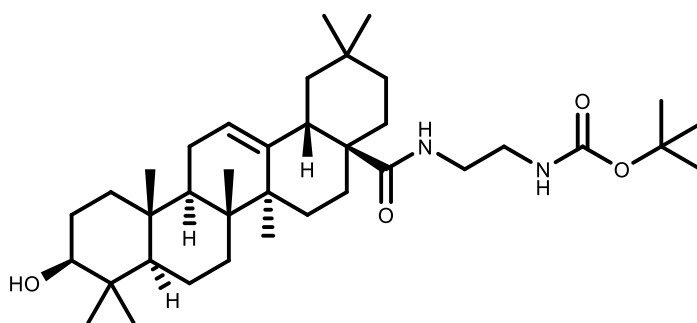
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2941 (m), 2626 (w), 1736 (m), 1691 (s), 1598 (w), 1373 (w), 1292 (s), 1213 (s), 1179 (m), 1137 (m), 1059 (s), 986 (w), 876 (w), 767 (w), 633 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_8 + \text{Na}]^+$

Ber.: 687.3867

Gef.: 687.3862.

***tert*-Butyl (2-((4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-icosahydronicene-4a-carboxamido)ethyl)carbamate (92, BGE-123)^[337]**



DIPEA (1.34 ml, 7.66 mmol, 7.00 Äq) wurde zu einer Lösung aus Oleanolsäure (500.0 mg, 1.10 mmol, 1.00 Äq), N-Boc-ethylendiamin (0.38 ml, 2.40 mmol, 2.20 Äq), HATU (499.5 mg, 1.31 mmol, 1.20 Äq) und DMAP (13.4 mg, 0.11 mmol, 0.10 Äq) in frisch entgastem DMF (2.8 ml) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Dichlormethan (70.0 ml) verdünnt. Die organische Phase wurde nacheinander dreimal mit Wasser (je 50.0 ml), ges. NaCl-Lösung (50.0 ml), ges. NaHCO_3 -Lösung (50.0 ml), nochmals mit ges. NaCl-Lösung (50.0 ml) und abschließend mit Wasser (50.0 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex:EtOAc 3:1), wodurch das reine Produkt **92** in einer Ausbeute von 90% (592.7 mg, 0.99 mmol) erhalten wurde.

HPLC: t_R = 8.4 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 6.35 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 5.41-5.33 (m, 1H), 3.61-3.41 (m, 1H), 3.27-3.17 (m, 3H), 3.16-3.10 (m, 1H), 2.54 (dd, 1H, *J* = 13.3, 4.4 Hz), 1.95-1.91 (m, 1H), 1.79-1.68 (m, 2H), 1.68-1.56 (m, 5H), 1.59-1.46 (m, 5H), 1.42 (s, 10H), 1.36-1.32 (m, 2H), 1.25-1.23 (m, 1H), 1.20-1.15 (m, 2H), 1.14 (s, 3H), 1.04-1.00 (m, 1H), 0.97 (s, 3H), 0.96-0.92 (m, 1H), 0.93-0.88 (m, 9H), 0.77 (s, 3H), 0.74 (s, 3H), 0.73-0.69 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 179.4, 156.9, 144.9, 123.3, 79.8, 79.2, 55.5, 48.0, 47.0, 46.6, 42.3, 40.8, 40.6, 39.7, 39.1, 38.8, 37.3, 34.5, 33.3, 33.0, 32.7, 31.0, 28.8, 28.4, 27.7, 27.5, 26.2, 24.0, 23.9, 18.6, 17.2, 15.9, 15.7.

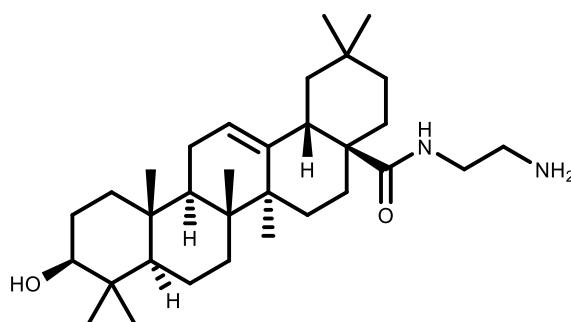
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 3551 (w), 2926 (s), 1692 (s), 1634 (m), 1519 (s), 1454 (m), 1388 (w), 1364 (s), 1251 (m), 1167 (s), 1029 (w), 997 (m).

HRMS (ESI(+)): *m/z* [C₃₇H₆₂O₄N₂ + Na]⁺

Ber.: 621.4602

Gef.: 621.4602.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-N-(2-Aminoethyl)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxamide (93, BGE-125)^[337]



Das Boc-geschützte Amin **92** (592.7 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq) wurde in 4 M HCl/Dioxan (12.0 ml) gelöst und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (DCM:MeOH 1:1), wobei die Zielverbindung **93** in einer Ausbeute von 87% (465.9 mg, 0.87 mmol) erhalten wurde.

HPLC: $t_R = 7.8$ min (Methode D)

$^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ [ppm] = 8.12 (s, 1H), 7.68 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz), 5.52-5.04 (m, 1H), 3.54-3.14 (m, 2H), 2.99 (dd, 1H, $J = 9.6, 6.1$ Hz), 2.90-2.65 (m, 3H), 1.91 (dt, 1H, $J = 13.7, 6.7$ Hz), 1.83-1.76 (m, 2H), 1.71-1.54 (m, 3H), 1.53-1.39 (m, 9H), 1.37-1.17 (m, 2H), 1.13-1.10 (m, 1H), 1.08 (s, 4H), 0.90-0.88 (m, 7H), 0.88-0.86 (m, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.66 (s, 4H), 0.65 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ [ppm] = 177.2, 143.9, 121.5, 76.8, 54.8, 47.1, 45.9, 45.3, 41.2, 38.5, 38.4, 38.1, 36.7, 36.6, 36.6, 33.6, 33.0, 32.5, 32.3, 30.4, 28.2, 27.0, 25.7, 23.4, 22.9, 22.2, 18.0, 16.8, 16.0, 15.1.

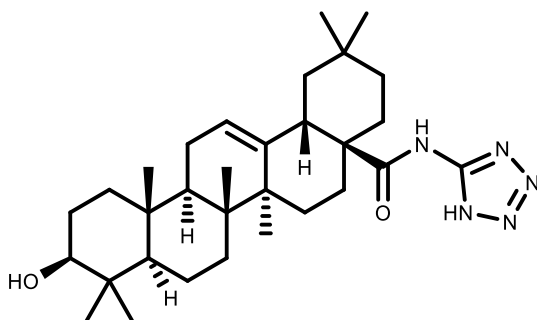
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3394 (w), 2928 (s), 1737 (w), 1639 (s), 1547 (m), 1464 (m), 1391 (w), 1240 (w), 1169 (w), 1080 (w), 1044 (s), 997 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{O}_2\text{N}_2 + \text{H}$] $^+$

Ber.: 499.4258

Gef.: 499.4259.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-Hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-*N*-(1*H*-tetrazol-5-yl)-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxamide (94, BGE-127)



DIPEA (0.534 ml, 3.07 mmol, 14.00 Äq) wurde zu einer Lösung aus Oleanolsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq), 5-Amino-1*H*-tetrazol-Monohydrat (99.3 mg, 0.96 mmol, 4.40 Äq), HATU (99.9 mg, 0.26 mmol, 1.20 Äquivalente) und DMAP (2.70 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) in frisch entgastem DMF (2.8 ml) gegeben. Nach zweitägigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit DCM (20.0 ml) versetzt und nacheinander zweimal mit Wasser (10.0 ml), ges. NaCl-Lösung (10.0 ml),

ges. NaHCO₃-Lösung (10.0 ml), nochmals mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) sowie abschließend mit Wasser (10.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex:EtOAc 3:1) gereinigt, wobei die Reinsubstanz **94** in einer Ausbeute von 23% (25.9 mg, 0.05 mmol) erhalten wurde.

HPLC: t_R = 5.7 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 13.92 (s, 1H), 10.95 (s, 1H), 5.45 (t, 1H, J = 3.8 Hz), 3.21 (dd, 1H, J = 11.5, 4.4 Hz), 2.91 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 2.29 (td, 1H, J = 14.3, 3.9 Hz), 2.06-2.00 (m, 1H), 1.99-1.84 (m, 3H), 1.78 (d, 1H, J = 13.6 Hz), 1.71 (td, 1H, J = 13.8, 4.1 Hz), 1.58-1.48 (m, 6H), 1.34-1.24 (m, 4H), 1.25-1.05 (m, 6H), 0.96 (s, 4H), 0.94 (s, 6H), 0.87 (s, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.73-0.69 (m, 1H), 0.63 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 178.9, 150.7, 143.4, 123.5, 78.9, 55.1, 47.6, 47.5, 46.1, 41.8, 41.1, 39.2, 38.7, 38.4, 36.4, 33.9, 32.8, 32.4, 32.0, 31.4, 28.0, 27.3, 27.0, 25.8, 23.5, 23.4, 23.3, 18.2, 16.7, 15.5, 15.3.

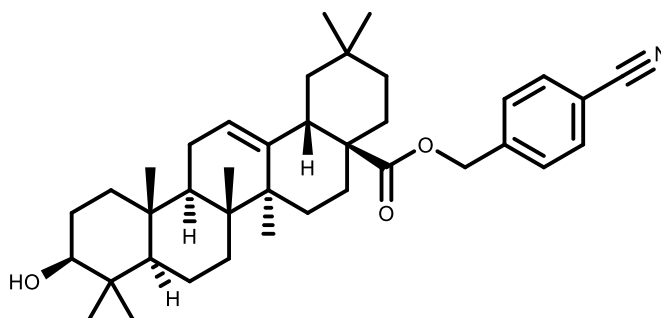
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3194 (w), 2925 (s), 1668 (m), 1606 (m), 1582 (s), 1532 (w), 1463 (m), 1386 (m), 1028 (s), 996 (s), 920 (w), 655 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₁H₄₉N₅O₂ +Na]⁺

Ber.: 546.3778

Gef.: 546.3783.

4-Cyanobenzyl (4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxylate (95, BGE-135)



Oleanolsäure (500.00 mg, 1.09 mmol, 1.00 Äq) und K₂CO₃ (303.00 mg, 2.19 mmol, 2.00 Äq) wurden in 5.00 ml DMF gelöst. Die Lösung wurde mit 4-Cyanobenzylbromid (299.60 mg, 1.53 mmol, 1.40 Äq) versetzt und für sieben Stunden auf 70°C erhitzt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt (50.0 ml) und der ausgefallene Feststoff abfiltriert und getrocknet. Der Rückstand wurde in 70.0 ml EtOAc gelöst und dreimal mit 30.0 ml H₂O und einmal mit 30.0 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde Säulenchromatographisch gereinigt (CH:EA 15% → 25% EA) und das Produkt **95** in einer Ausbeute von 81% (503.8 mg, 0.89 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 11.9 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 7.64 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 7.45 (d, J = 8.3 Hz), 5.28 (t, J = 3.7 Hz), 5.17-5.02 (m, 2H), 3.20 (dd, 1H, J = 11.1, 4.6 Hz), 2.88 (dd, 1H, J = 13.9, 4.6 Hz), 1.84 (dt, 1H, J = 10.0, 3.6 Hz), 1.72-1.50 (m, 9H), 1.42 (s, 6H), 1.38-1.28 (m, 3H), 1.28-1.16 (m, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.09-1.02 (m, 1H), 0.97 (s, 3H), 0.97-0.93 (m, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.77 (s, 3H), 0.70 (dd, 1H, J = 11.5, 1.9 Hz), 0.54 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 177.7, 144.0, 142.2, 132.7 (2C), 128.8 (2C), 123.1, 119.1, 112.3, 79.4, 65.3, 55.6, 48.0, 47.3, 46.2, 42.1, 41.8, 39.7, 39.2, 38.9, 37.4, 34.2, 33.5, 33.1, 32.9, 31.1, 28.5, 28.0, 27.6, 27.4 (3C), 26.3, 24.1, 18.7, 17.3, 16.0.

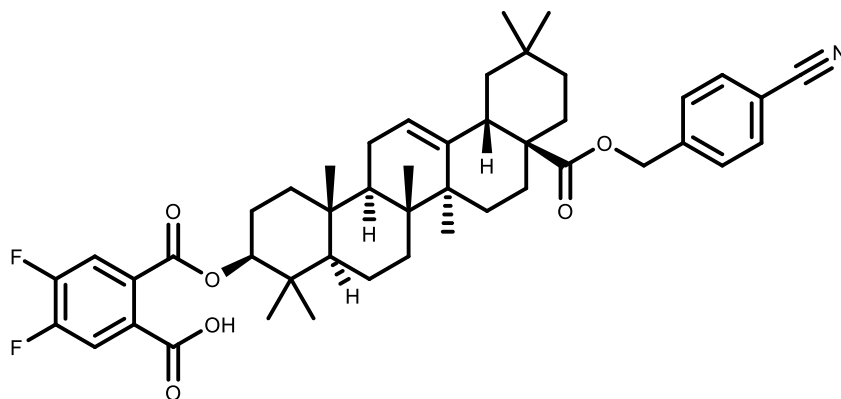
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2980 (w), 2971 (s), 2936 (w), 2903 (w), 1719 (s), 1156 (s), 1121 (w), 817 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z $[C_{38}H_{53}O_3N + Na]^+$

Ber.: 594.3918

Gef.: 594.3918.

2-((((3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aS*,14*aR*,14*bR*)-8*a*-(((4-Cyanobenzyl)oxy)carbonyl)-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-icosahydricen-3-yl)oxy)carbonyl)-4,5-difluorobenzoic acid
(96, BGE-137)



4,5-Difluorophthalsäureanhydrid (257.55 mg, 1.40 mmol, 4.00 Äq) und DMAP (4.27 mg, 0.03 mmol, 0.10 Äq) wurden zu einer Lösung aus dem Nitril **95** (200.00 mg, 0.35 mmol, 1.00 Äq) in 3.5 ml Pyridin gegeben. Die Lösung wurde sieben Tage bei 130°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und dreimal mit je 10.0 ml 1 M HCl und H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20 ml EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (H₂O:MeCN + 0.1% FA 50:50 → 0:100) gereinigt. Das Produkt **96** wurde in einer Ausbeute von 2% (5.60 mg, 0.01 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 14.6 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 7.77 (dd, 1H, J = 10.1, 7.3 Hz), 7.65 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.56 (dd, 1H, J = 9.8, 7.4 Hz), 7.45 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 5.36-5.24 (m, 1H), 5.15 (d, 1H, J = 13.3 Hz), 5.07 (d, 1H, J = 13.3 Hz), 4.76 (dd, 1H, J = 11.8, 4.6 Hz), 2.89 (dd, 1H, J = 14.3, 4.5 Hz), 2.01 (ddd, 1H, J = 13.7, 4.1 Hz), 1.87-1.81 (m, 2H), 1.78-1.62 (m, 4H), 1.61-1.50 (m, 4H), 1.46 (td, 1H, J = 12.8, 4.1 Hz), 1.41-1.31 (m, 3H), 1.31-1.15 (m, 4H), 1.14 (s, 3H), 1.12-1.02 (m, 2H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 6H), 0.90 (s, 3H), 0.87 (m, 1H), 0.55 (s, 3H).

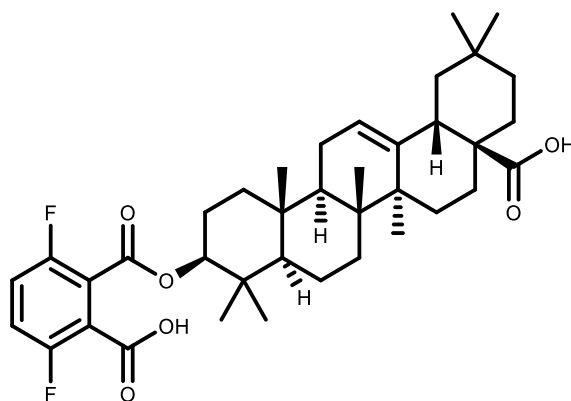
^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] = 177.6, 168.3, 166.3, 144.0, 142.1, 132.7 (2), 128.8 (2C), 122.8 (2C), 120.53 (d, J = 19.8 Hz), 119.3 (d, J = 19.5 Hz), 112.2, 84.4, 65.2, 55.8, 47.9, 47.2, 46.2, 42.1, 41.8, 39.7, 38.5, 38.3, 37.3, 34.2, 33.4, 33.0, 32.8, 31.1, 28.5, 28.0, 26.2, 24.0, 23.8, 23.5, 23.4, 18.5, 17.2, 17.2, 15.7.

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{46}\text{H}_{55}\text{O}_6\text{F}_2\text{N} + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 778.3890

Gef.: 778.3890.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-((2-Carboxy-3,6-difluorobenzoyl)oxy)-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxylic acid (98, BGE-099)



Oleanolsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq), 3,6-Difluorophthalsäureanhydrid (80.6 mg, 0.44 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (2.68 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) wurden in 3.0 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wurde drei Tage bei 100°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und dreimal mit je 10.0 ml 1 M HCl und H_2O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20 ml EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer DC (DCM:MeOH 96:4) gereinigt. Das Produkt **98** wurde in einer Ausbeute von 24% (34.3 mg, 0.05 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 8.1 min (Methode C)

^1H -NMR: ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ [ppm] = 7.54 (dd, 2H, J = 6.5 Hz), 5.69-4.89 (m, 1H), 4.68 (dd, 1H, J = 9.2, 7.2 Hz), 2.75 (dd, 1H, J = 13.9, 4.7 Hz), 1.92 (dt, 1H, J = 13.5, 4.0 Hz), 1.85-1.81 (m, 2H), 1.71-1.56 (m, 7H), 1.53-1.42 (m, 4H), 1.37-1.29 (m, 2H), 1.28-1.22 (m,

1H), 1.16-1.14 (m, 1H), 1.13 (s, 3H), 1.10-1.04 (m, 2H), 1.03-0.98 (m, 1H), 0.92 (s, 3H), 0.88 (s, 6H), 0.81 (s, 3H), 0.74 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 101 MHz) δ [ppm] = 178.5, 163.7, 162.5, 155.7, 154.0, 143.9, 121.8, 121.4, 120.2, 82.8, 54.5, 46.8, 45.7, 45.5, 41.4, 40.8, 40.0, 38.9, 37.4, 37.3, 36.5, 33.3, 32.8, 32.2, 32.1, 27.6, 27.2, 25.6, 23.4, 22.9, 22.6, 17.8, 16.8, 16.6, 15.0.

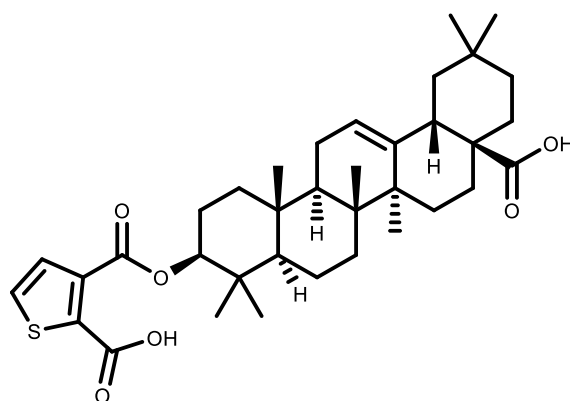
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 2936 (m), 2868 (w), 1724 (s), 1455 (m), 1369 (w), 1236 (s), 1125 (w), 975 (w), 818 (w), 729 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₈H₅₀O₆F₂ + Na]⁺

Ber.: 663.3468

Gef.: 663.3468.

3-((((3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aS*,14*aR*,14*bR*)-8*a*-Carboxy-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-icosahydronicen-3-yl)oxy)carbonyl)thiophene-2-carboxylic acid (99**, BGE-098)**



Oleanolsäure (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq), 2,3-Thiophendicarbonsäureanhydrid (135.0 mg, 0.88 mmol, 4.00 Äq) und DMAP (2.68 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) wurden in 1.5 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wurde fünf Tage bei 100°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und dreimal mit je 10.0 ml 1 M HCl und H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20 ml EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer DC (DCM:MeOH 96:4) gereinigt. Das Produkt **99** wurde in einer Ausbeute von 11% (15.3 mg, 0.03 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 9.3 min (Methode C)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400 MHz) δ [ppm] = 7.82 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 7.24 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz), 5.17 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 4.56 (dd, 1H, *J* = 11.4, 4.9 Hz), 2.75 (dd, 1H, *J* = 14.0, 4.7 Hz), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.87-1.80 (m, 1H), 1.73-1.54 (m, 6H), 1.53-1.42 (m, 4H), 1.41-1.28 (m, 3H), 1.27-1.21 (m, 2H), 1.20-1.13 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.09-0.96 (m, 3H), 0.95-0.91 (m, 4H), 0.89 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.73 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 101 MHz) δ [ppm] = 178.6, 160.8, 143.9, 131.8, 128.6, 121.4, 121.4, 82.1, 54.5, 46.8, 45.7, 45.5, 41.4, 40.8, 40.0, 38.9, 37.6, 36.5, 33.3, 32.8, 32.2, 32.1, 30.4, 29.0, 27.8, 25.6, 23.4, 23.0, 17.8, 16.8, 16.6, 15.0.

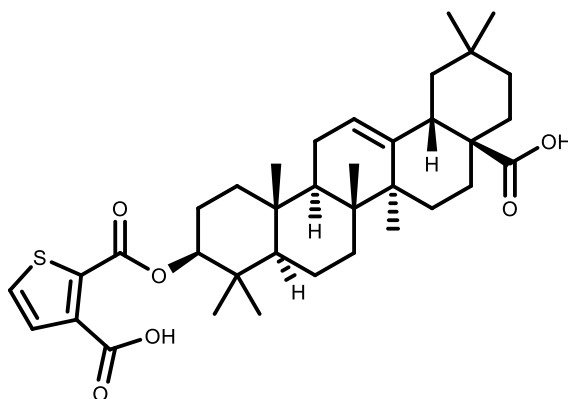
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2948 (m), 2668 (w), 1738 (m), 1688 (m), 1633 (w), 1423 (m), 1270 (s), 1265 (w), 1114 (w), 907 (w), 726 (s), 651 (w).

HRMS (ESI(+)): *m/z* [C₃₆H₅₀O₆S + Na]⁺

Ber.: 633.3220

Gef.: 633.3223.

2-((((3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aS*,14*aR*,14*bR*)-8*a*-Carboxy-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-icosahydronicen-3-yl)oxy)carbonyl)thiophene-3-carboxylic acid (100, BGE-105)



Verbindung **100** wurde als Regioisomer der Verbindung **99** in einer Ausbeute von 18% (24.7 mg, 0.04 mmol) isoliert werden.

HPLC: *t_R* = 9.6 min (Methode C)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400 MHz) δ [ppm] = 7.82 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz), 5.17 (t, 1H, *J* = 3.7 Hz), 4.63 (dd, 1H, *J* = 10.0, 6.4 Hz), 2.80-2.69 (m, 1H), 1.99-1.85 (m, 1H), 1.85-1.78 (m, 1H),

1.73-1.53 (m, 6H), 1.52-1.41 (m, 4H), 1.41-1.29 (m, 3H), 1.25-1.22 (m, 2H), 1.19-1.14 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.08-0.97 (m, 3H), 0.92 (m, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.87 (s, 7H), 0.81 (s, 3H), 0.73 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 101 MHz) δ [ppm] = 178.5, 163.9, 162.1, 143.8, 136.8, 131.1, 128.2, 121.4, 81.7, 54.6, 46.8, 45.7, 45.4, 41.4, 40.8, 40.0, 38.9, 37.4, 36.5, 33.3, 32.8, 32.2, 32.1, 30.4, 29.0, 27.8, 27.2, 25.6, 23.4, 22.0, 17.8, 16.8, 16.6, 15.0.

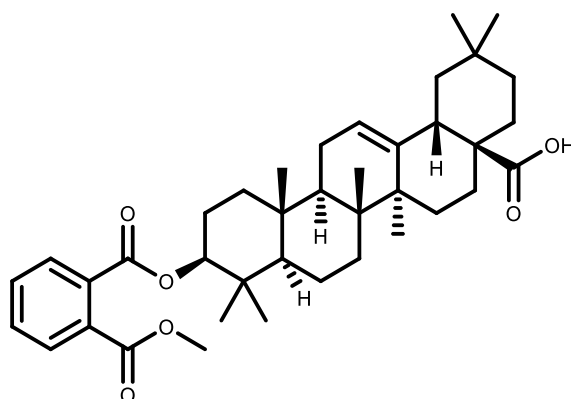
IR: (ATR) ν_{max}/cm⁻¹ 2925 (m), 2851 (w), 2663 (w), 1687 (m), 1649 (m), 1524 (w), 1442 (m), 1293 (s), 1270 (w), 987 (m), 729 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₆H₅₀O₆S + Na]⁺

Ber.: 633.3220

Gef.: 633.3221.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-((2-(Methoxycarbonyl)benzoyl)oxy)-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxylic acid (101, BGE-181)



Schritt 1: 2-(Methoxycarbonyl)benzoesäure (500.0 mg, 2.78 mmol, 1.00 Äq) wurde in DCM (9.0 ml) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden Oxalylchlorid (0.476 ml, 5.55 mmol, 2.00 Äq) sowie zwei Tropfen DMF zugegeben, woraufhin die Reaktionslösung unter einer Argonatmosphäre für 15 Stunden gerührt wurde. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung im zweiten Reaktionsschritt weiterverwendet.

Schritt 2: Das Rohprodukt aus Schritt 1 (547.9 mg, 2.76 mmol, 4.20 Äq) wurde in DCM (5.0 ml) gelöst. Eine Lösung aus Oleanolsäure (300.0 mg, 2.76 mmol, 1.00 Äq) und DMAP (8.0 mg, 0.07 mmol, 0.10 Äq) in Pyridin (5.0 ml) wurde langsam über einen

Tropftrichter zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde Wasser (20.0 ml) zugegeben und die Suspension für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das erhaltene Rohprodukt durch *reversed phase*-Säulenchromatographie (MeOH:H₂O 50% → 95%) gereinigt. Das Endprodukt **101** wurde in einer Ausbeute von 68% (420.5 mg, 0.68 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 14.7 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 7.82-7.78 (m, 1H), 7.75-7.66 (m, 3H), 7.62-7.57 (m, 2H), 7.55-7.50 (m, 2H), 5.33 (t, 1H, J = 3.7 Hz), 4.75 (dd, 1H, J = 11.8, 4.6 Hz), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.85 (dd, 1H, J = 13.6, 4.6 Hz), 2.15-1.99 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 3H), 1.77-1.55 (m, 10H), 1.48-1.25 (m, 6H), 1.16 (s, 3H), 1.14-1.04 (m, 2H), 0.96 (s, 6H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.89-0.86 (m, 1H), 0.79 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 172.3, 168.3, 167.3, 167.1, 163.4, 142.8, 132.5, 132.2, 131.8, 131.4, 130.9, 130.9, 129.4, 129.1, 128.8, 128.8, 123.1, 82.5, 55.5, 52.9, 52.6, 48.4, 47.6, 45.8, 41.8, 41.2, 39.4, 38.2, 38.0, 36.9, 33.7, 32.9, 32.7, 31.3, 30.6, 28.1, 27.7, 25.7, 23.5, 23.5, 23.3, 23.1, 18.2, 17.0, 16.8, 15.5.

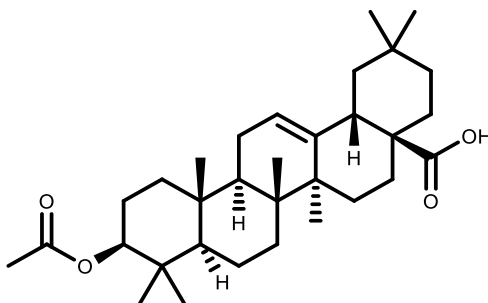
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2947 (m), 1728 (s), 1695 (s), 1599 (w), 1580 (w), 1433 (w), 1278 (s), 1123 (m), 1072 (m), 994 (w), 742 (m), 706 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₉H₅₄O₆ -H]⁺

Ber.: 617.3848

Gef.: 617.3848.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-Acetoxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydricene-4a(2*H*)-carboxylic acid (104**, BGE-151)^[338]**



Triethylamin (0.317 ml, 1.86 mmol, 1.70 Äq) und DMAP (13.4 mg, 0.11 mmol, 0.10 Äq) wurden bei Raumtemperatur zu einer Lösung aus Oleanolsäure (500.0 mg, 1.09 mmol, 1.00 Äq) und Ac₂O (0.23 ml, 2.19 mmol, 2.00 Äq) in Pyridin (6.6 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über einen Zeitraum von 17 Stunden unter kontinuierlichem Rühren bei Raumtemperatur umgesetzt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit DCM (20.0 ml) verdünnt und nacheinander dreimal mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (10.0 ml) sowie erneut mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels *reversed phase*-Säulenchromatographie (Methanol:Wasser 70% → 95% MeOH) gereinigt, wodurch das Produkt **104** in einer Ausbeute von 64% (349.5 mg, 0.70 mmol) erhalten wurde.

HPLC: $t_R = 13.7$ min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 5.28-5.25 (m, 1H), 4.52-4.46 (m, 1H), 2.81 (dd, 1H, $J = 14.0, 4.6$ Hz), 2.04 (s, 3H), 2.02-1.92 (m, 1H), 1.91-1.84 (m, 2H), 1.81-1.65 (m, 2H), 1.65-1.50 (m, 8H), 1.47-1.19 (m, 6H), 1.12 (s, 3H), 1.10-1.00 (m, 2H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.84-0.81 (m, 1H), 0.74 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 184.2, 171.0, 143.6, 122.5, 80.9, 55.3, 47.5, 46.5, 45.8, 41.5, 40.9, 39.2, 38.0, 37.7, 37.0, 33.8, 33.0, 32.5, 30.6, 28.0, 27.6, 25.9, 23.6, 23.5, 23.4, 22.8, 21.3.

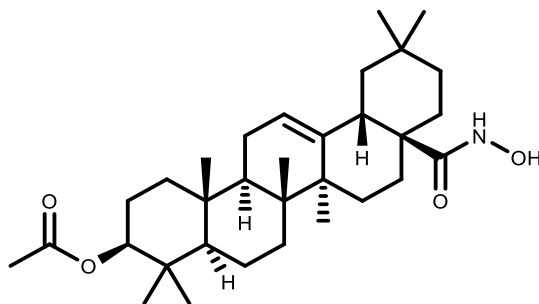
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2926 (s), 1725 (m), 1686 (m), 1462 (w), 1371 (m), 1242 (s), 1159 (w), 1026 (m), 736 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z $[\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4 + \text{Na}]^+$

Ber.: 521.3601

Gef.: 521.3600.

(3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aS*,14*aR*,14*bR*)-8*a*-(Hydroxycarbamoyl)-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-icosahydricen-3-yl acetate (105**, BGE-153)^[259]**



Oxalylchlorid (0.36 ml, 4.20 mmol, 6.00 Äq) wurde bei 0 °C zu einer Lösung aus Verbindung **104** (349.5 mg, 0.70 mmol, 1.00 Äq) in DCM (18.0 ml) gegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für zwei Stunden unter Rühren umgesetzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand in Dichlormethan (22.0 ml) gelöst. Unter Rühren wurden Triethylamin (0.684 ml, 4.91 mmol, 7.00 Äq) sowie Hydroxylammoniumchlorid (379.8 mg, 5.47 mmol, 7.80 Äq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran wurde die Reaktionslösung dreimal mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (10.0 ml), Wasser (10.0 ml) sowie erneut mit ges. NaCl-Lösung (10.0 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde zusätzlich einmal mit DCM (20.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie über Kieselgel (CycHex:EtOAc 4:1) gereinigt. Auf diese Weise wurde das reine Produkt **105** in einer Ausbeute von 37% (131.8 mg, 0.26 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 12.4 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 5.48-5.34 (m, 1H), 4.53-4.42 (dd, 1H, J = 9.6, 6.2 Hz), 2.50-2.41 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.02-1.88 (m,

3H), 1.82-1.71 (m, 2H), 1.64-1.55 (m, 6H), 1.49-1.30 (m, 4H), 1.27-1.17 (m, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.09-0.99 (m, 2H), 0.94 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.86 (s, 6H), 0.85-0.83 (m, 1H), 0.81 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 171.0, 144.8, 123.8, 80.8, 55.2, 47.4, 46.2, 41.9, 40.7, 39.4, 38.2, 37.7, 36.8, 33.9, 32.9, 32.1, 31.9, 30.7, 28.0, 27.2, 25.7, 23.7, 23.6, 23.5, 23.4, 21.3.

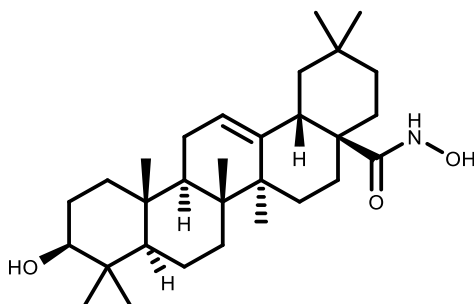
IR: (ATR) ν_{max}/cm⁻¹ 3399 (w), 2940 (s), 1719 (m), 1638 (s), 1463 (m), 1370 (m), 1242 (s), 1159 (w), 1026 (m), 729 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₂H₅₁NO₄ + Na]⁺

Ber.: 536.3710

Gef.: 536.3746.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-*N*,10-Dihydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxamide (106, BGE-155)^[259]



Zu einer Lösung aus KOH (106.3 mg, 1.90 mmol, 9.50 Äq) in MeOH (11.0 ml) wurde das Edukt **105** (102.5 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter kontinuierlichem Rühren zwei Tage lang bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (20.0 ml) gelöst und dreimal mit Wasser (10.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels *reversed phase*-Säulenchromatographie (MeOH:H₂O 70% → 95% MeOH) gereinigt. Das reine Produkt **106** wurde mit einer Ausbeute von 95% (89.1 mg, 0.19 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 10.6 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 5.48-5.38 (m, 1H), 3.26-3.18 (m, 1H), 2.03-1.95 (m, 3H), 1.89-1.84 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H), 1.68-1.37

(m, 11H), 1.33-1.27 (m, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.08-1.04 (m, 1H), 1.03-1.00 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.91-0.88 (m, 1H), 0.86 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz), 0.79 (s, 6H).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 101 MHz) δ [ppm] = 177.2, 140.4, 126.7, 79.0, 55.1, 52.0, 47.5, 46.9, 42.4, 39.5, 39.4, 39.0, 38.7, 38.6, 36.9, 36.6, 32.4, 31.9, 30.6, 29.7, 28.1, 27.7, 24.8, 23.6, 23.3, 22.7, 21.3.

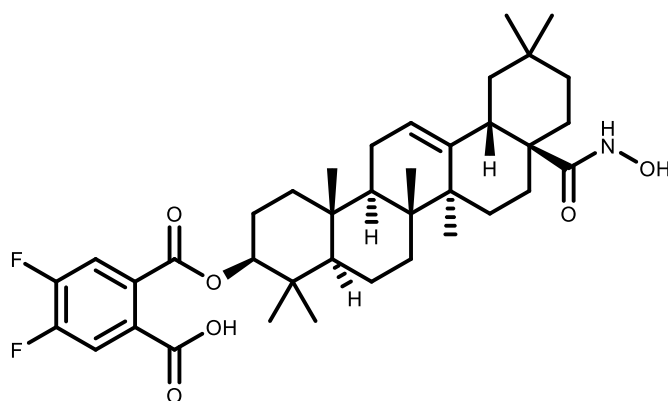
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3379 (w), 2925 (s), 2871 (w), 1725 (s), 1686 (w), 1462 (m), 1385 (w), 1275 (s), 1123 (m), 1028 (w), 749 (s).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_3 - \text{H}$] $^+$

Ber.: 470.3640

Gef.: 470.3641.

4,5-Difluoro-2-((((3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aS*,14*aR*,14*bR*)-8*a*-(hydroxycarbamoyl)-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,6*a*,6*b*,7,8,8*a*,9,10,11,12,12*a*,14,14*a*,14*b*-icosahydricen-3-yl)oxy)carbonyl)benzoic acid (102**, BGE-158)**



Verbindung **106** (69.7 mg (0.15 mmol, 1.00 Äq), 4,5-Difluorophthalsäureanhydrid (54.4 mg, 0.30 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (1.8 mg, 0.01 mmol, 0.10 Äq) wurden in 2.5 ml Pyridin gelöst und drei Tage lang bei 110°C umgesetzt. Die Lösung wurde mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und je dreimal mit 10.0 ml 1 M HCl und 10.0 ml H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20.0 ml EtOAc extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung des Rohprodukts mittels präparativer HPLC (H₂O:MeCN 5% → 95% MeCN) wurde das Produkt **102** in 29% (27.2 mg, 0.04 mmol) Ausbeute isoliert.

HPLC: $t_R = 12.2$ min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 7.70-7.59 (m, 2H), 5.52-5.45 (m, 1H), 4.54 (dd, 1H, *J* = 11.81, 4.66 Hz), 2.46 (dd, 1H, *J* = 13.01, 4.31 Hz), 2.01-1.96 (m, 1H), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.84-1.71 (m, 3H), 1.70-1.53 (m, 6H), 1.52-1.30 (m, 4H), 1.30-1.21 (m, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.15-1.00 (m, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.90-0.84 (m, 7H), 0.80 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 176.9, 169.9, 165.4, 150.7, 144.7, 129.7, 124.2, 119.8, 119.2, 84.1, 55.1, 46.9, 46.0, 45.4, 41.6, 41.1, 39.3, 37.7, 37.7, 36.9, 33.7, 32.8, 32.0, 31.6, 30.60, 28.4, 27.30, 25.6, 23.4, 21.9, 18.2, 17.3, 16.6, 16.0.

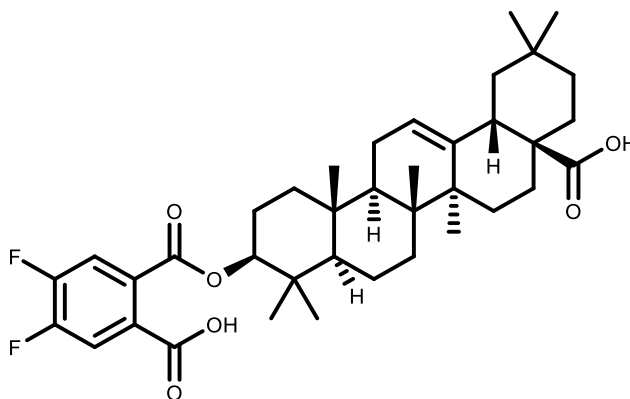
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 3358 (w), 2945 (m), 1723 (m), 1698 (m), 1603 (m), 1442 (m), 1323 (s), 1280 (s), 1182 (s), 1113 (m), 965 (w), 796 (m), 653 (w).

HRMS (ESI(+)): *m/z* [C₃₈H₅₀F₂NO₆ -H]⁻

Ber.: 654.3612

Gef.: 654.3611.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-((2-Carboxy-4,5-difluorobenzoyl)oxy)-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2H)-carboxylic acid (107, BGE-100)



Oleanolsäure (500.0 mg, 1.09 mmol, 1.00 Äq), 4,5-Difluorophthalsäureanhydrid (806.2 mg, 4.38 mmol, 4.00 Äq) und DMAP (2.7 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) wurden in 3.0 ml Pyridin gelöst und über 20 Stunden bei 110 °C umgesetzt. Die Lösung wurde mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und je dreimal mit 10.0 ml 1 M HCl und 10.0 ml H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20.0 ml EtOAc extrahiert, die verein-

ten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (CycHex:EtOAc 4:1) wurde das Produkt **107** in 47% (330.6 mg, 0.52 mmol) Ausbeute isoliert.

HPLC: t_R = 8.8 min (Methode C)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400 MHz) δ [ppm] = 7.85-7.76 (m, 1H), 7.77-7.68 (m, 1H), 5.20-5.14 (m, 1H), 4.66-4.57 (m, 1H), 2.75 (dd, 1H, J = 13.7, 4.6 Hz), 2.02-1.79 (m, 3H), 1.74-1.56 (m, 6H), 1.56-1.39 (m, 5H), 1.37-1.14 (m, 5H), 1.12 (s, 3H), 1.10-0.96 (m, 3H), 0.91 (s, 6H), 0.88 (s, 6H), 0.82 (s, 3H), 0.73 (s, 3H).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 101 MHz) δ [ppm] = 178.6, 166.3, 165.3, 143.9, 121.4, 118.6, 82.4, 54.7, 46.8, 45.7, 45.8, 41.4, 40.8, 37.5, 36.5, 33.3, 32.8, 32.2, 32.1, 30.4, 27.9, 27.2, 25.6, 23.4, 22.9, 22.6, 22.5, 17.8, 16.8, 16.7, 15.0.

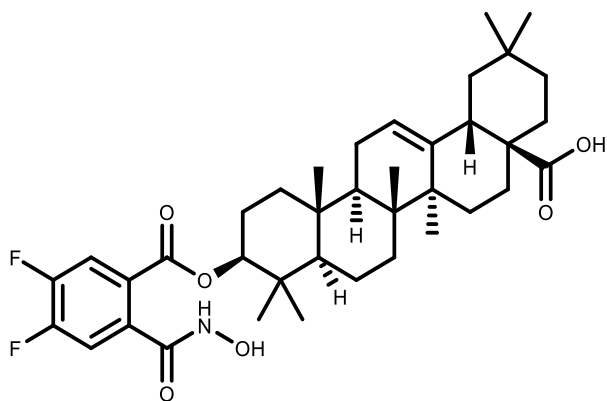
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2945 (m), 1839 (w), 1710 (s), 1604 (w), 1521 (w), 1439 (m), 1389 (w), 1322 (s), 1304 (m), 1184 (s), 1117 (m), 1116 (m), 963 (m), 767 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₈H₅₀O₆F₂ +Na]⁺

Ber.: 663.3468

Gef.: 663.3468.

(4a*S*,6a*S*,6b*R*,8a*R*,10*S*,12a*R*,12b*R*,14b*S*)-10-((4,5-Difluoro-2-(hydroxycarbamoyl)benzoyl)oxy)-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-octadecahydronicene-4a(2*H*)-carboxylic acid
(103, BGE-167)



Oxalylchlorid (1.260 ml, 14.69 mmol, 12.00 Äq) wurde bei 0 °C zu einer Lösung von Verbindung **107** (784.0 mg, 1.22 mmol, 1.00 Äq) in DCM (20.0 ml) gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und unter kontinuierlichem Rühren über einen Zeitraum von zwei Stunden umgesetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand in DCM (35.0 ml) gelöst. Triethylamin (2.39 ml, 17.14 mmol, 14.00 Äq) und Hydroxylammoniumchlorid (1.36 g, 19.58 mmol, 16.00 Äq) wurden zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung dreimal nacheinander mit ges. NaCl-Lösung (20.0 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (20.0 ml), H₂O (20.0 ml) sowie erneut mit ges. NaCl-Lösung (20.0 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (MeCN:H₂O 5% → 95% MeCN) gereinigt. Das gewünschte Produkt **103** wurde mit einer geringen Ausbeute von 2% (17.5 mg, 0.03 mmol) isoliert.

HPLC: t_R = 11.7 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 7.87 (dd, 1H, J = 10.5, 7.6 Hz), 7.36 (dd, 1H, J = 9.4, 7.1 Hz), 5.36-5.20 (m, 1H), 4.74 (dd, 1H, J = 11.8, 4.5 Hz), 2.96-2.80 (m, 1H), 2.12-1.78 (m, 4H), 1.76-1.45 (m, 7H), 1.44-1.29 (m, 2H), 1.28-1.16 (m, 3H), 1.13 (s, 4H), 1.08-1.05 (m, 1H), 1.02 (s, 3H), 1.01-0.92 (m, 7H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (s, 4H), 0.70 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 185.2, 166.4, 164.0, 143.6, 122.8, 85.8, 55.3, 47.2, 46.5, 45.6, 41.2, 41.0, 39.2, 37.9, 37.7, 37.2, 33.6, 33.1, 32.8, 32.0, 30.7, 28.5, 27.6, 26.2, 23.6, 22.3, 23.2, 22.9, 18.2, 17.2, 15.6.

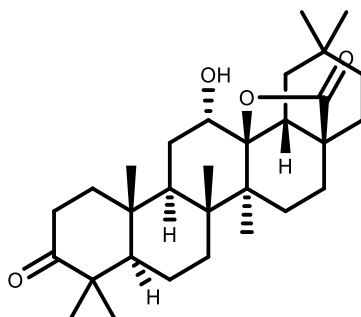
IR: (ATR) ν_{max}/cm⁻¹ 2949 (w), 1689 (w), 1463 (w), 1275 (m), 1267 (m), 1261 (m), 1185 (w), 1133 (w), 1066 (w), 964 (w), 897 (w), 764 (s), 745 (s).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₈H₅₁F₂NO₆ + Na]⁺

Ber.: 678.3577

Gef.: 678.3579.

(4aR,6aR,6bS,8aS,12aR,12bS,13S,14aR,14bR)-13-Hydroxy-4,4,6a,6b,11,11,14b-heptamethyloctadecahydro-3H,9H-12b,8a-(epoxymethano)picene-3,16-dione
(108, BGE-108)^[268]



Eine Lösung aus Oleanolsäure (2.0 g, 4.38 mmol, 1.00 Äq) in DCM (14.3 ml) und MeOH (2.8 ml) wurde auf -50 °C abgekühlt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von drei Stunden Ozon durch die Lösung geleitet. Nach Abschluss der Reaktion wurde das überschüssige Ozon durch das Einleiten von Stickstoffgas entfernt, bis die charakteristische blaue Färbung vollständig verschwunden war. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Die anschließende Umkristallisation aus Isopropanol führte zur Isolierung des gewünschten Produkts **108** in 77% (1.59 g, 3.38 mmol) Ausbeute.

HPLC: t_R = 6.4 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 3.90 (t, 1H, J = 2.9 Hz), 2.48-2.37 (m, 1H), 2.57-2.48 (m, 1H), 2.20-2.09 (m, 2H), 2.08-1.99 (m, 3H), 1.99-1.84 (m, 2H), 1.72 (dd, 1H, J = 13.2, 2.3 Hz), 1.66-1.51 (m, 4H), 1.50-1.43 (m, 3H), 1.42-1.34 (m, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.30-1.24 (m,

3H), 1.19 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.90 (s, 3H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 217.5, 179.7, 90.5, 76.2, 54.8, 51.1, 47.3, 44.7, 43.8, 42.1, 39.5, 39.4, 36.1, 34.1, 33.9, 33.3, 33.2, 31.5, 29.1, 28.0, 27.4, 26.6, 23.8, 21.1, 21.0, 19.0, 18.3, 18.1, 16.2.

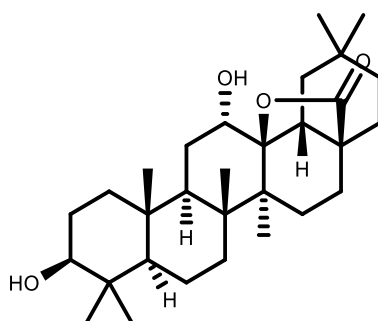
IR: (ATR) ν_{max} /cm⁻¹ 3508 (m), 2948 (s), 2919 (s), 2891 (w), 2868 (w), 1734 (s), 1705 (s), 1626 (m), 1453 (w), 1387 (m), 1256 (m), 1226 (w), 1142 (w), 1068 (m), 909 (w), 717 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₀H₄₈O₄ + Na]⁺

Ber.: 495.3445

Gef.: 495.3444.

(3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aR*,12*bS*,13*S*,14*aR*,14*bR*)-3,13-Dihydroxy-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyloctadecahydro-1*H*,9*H*-12*b*,8*a*-(epoxymethano)picen-16-one (109, BGE-118)^[268]



NaBH₄ (2.14 g, 56.63 mmol, 17.00 Äq) wurde zu einer Lösung aus Verbindung **108** (1.57 g, 3.33 mmol, 1.00 Äq) in einem 1:1-Gemisch aus DCM und MeOH (260.0 ml) bei -78 °C zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei -78 °C wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere drei Tage unter kontinuierlichem Rühren umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Natronlauge (17.0 ml) gestoppt. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan (20.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt **109** wurde in einer Ausbeute von 92% (1.44 g, 3.05 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 5.6 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 3.88 (t, 1H, *J* = 2.9 Hz), 3.22 (dd, 1H, *J* = 11.6, 4.7 Hz), 2.13 (td, 1H, *J* = 13.3, 5.8 Hz), 2.07-1.94 (m, 3H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.72 (dt, 1H, *J* = 13.0, 3.7 Hz), 1.67-1.33 (m, 11H), 1.30 (s, 3H), 1.28-1.21 (m, 2H), 1.17 (m, 1H), 1.14 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.95 (m, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.76-0.73 (m, 1H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 180.0, 90.6, 78.8, 76.4, 55.2, 51.1, 44.7, 44.6, 42.3, 42.1, 39.4, 38.8, 36.4, 34.1, 34.0, 33.3, 31.6, 28.8, 28.0, 28.0, 27.5, 27.2, 23.9, 21.2, 18.6, 18.5, 17.7, 16.3, 15.3.

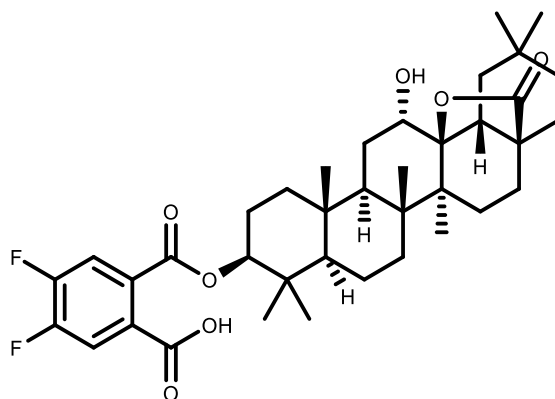
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3555 (w), 2945 (m), 2865 (w), 2599 (w), 1733 (s), 1695 (m), 1469 (w), 1258 (w), 1061 (m), 946 (m), 907 (w), 898 (w).

HRMS (ESI(+)): *m/z* [C₃₀H₄₈O₄ + Na]⁺

Ber.: 495.3445

Gef.: 495.3444.

4,5-Difluoro-2-((((3*S*,4*aR*,6*aR*,6*bS*,8*aS*,12*aR*,12*bS*,13*S*,14*aR*,14*bR*)-13-hydroxy-4,4,6*a*,6*b*,11,11,14*b*-heptamethyl-16-oxooctadecahydro-1*H*,9*H*-12*b*,8*a*-(epoxy-methano)picen-3-yl)oxy)carbonyl)benzoic acid (110, BGE-120)



Verbindung **109** (100.0 mg, 0.22 mmol, 1.00 Äq), 4,5-Difluorophthalsäureanhydrid (80.6 mg, 0.44 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (2.7 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) wurden in 3.0 ml Pyridin gelöst und über drei Tage bei 110 °C umgesetzt. Die Lösung wurde mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und je dreimal mit 10.0 ml 1 M HCl und 10.0 ml H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20.0 ml EtOAc extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Nach der säulenchromatographischen Reinigung (DCM:MeOH 95:5) wurde das Produkt **110** in 28% (40.2 mg, 0.06 mmol) Ausbeute isoliert.

HPLC: $t_R = 8.3$ min (Methode C)

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] = 7.58 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 4.56 (dd, 1H, $J = 11.9, 4.5$ Hz), 3.67 (m, 1H), 2.15 (td, 1H, $J = 13.3, 6.0$ Hz), 2.00-1.87 (m, 3H), 1.85-1.77 (m, 1H), 1.77-1.52 (m, 6H), 1.53-1.43 (m, 3H), 1.38 (m, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.25-1.20 (m, 1H), 1.20-1.14 (m, 1H), 1.13-1.07 (m, 2H), 1.03 (s, 3H), 0.93 (d, 6H, $J = 4.1$ Hz), 0.90-0.87 (m, 1H), 0.86 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.77 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] = 178.9, 167.4, 117.6, 115.7, 90.5, 81.0, 74.2, 54.9, 50.4, 44.0, 43.9, 41.8, 40.1, 38.4, 38.1, 37.6, 36.0, 33.7, 33.5, 33.0, 28.2, 27.9, 27.4, 27.3, 23.8, 22.6, 20.8, 18.3, 18.1, 17.2, 16.5, 16.1.

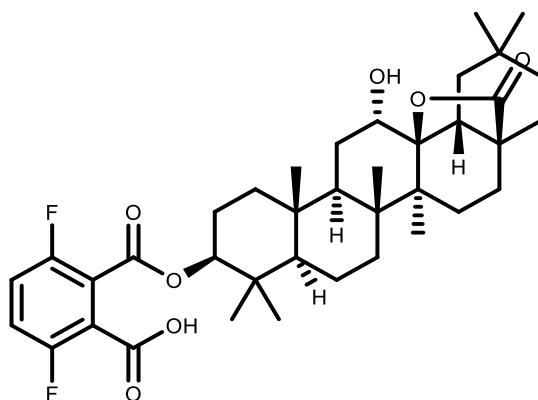
IR: (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2934 (m), 2878 (w), 1760 (m), 1733 (w), 1709 (s), 1475 (m), 1285 (w), 1241(s), 1225 (s), 1143 (w), 1021 (w), 985 (w), 948 (s), 820 (m), 728 (m).

HRMS (ESI(+)): m/z [$\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{F}_2 + \text{Na}$] $^+$

Ber.: 679.3417

Gef.: 679.3417.

3,6-Difluoro-2-((((3S,4aR,6aR,6bS,8aS,12aR,12bS,13S,14aR,14bR)-13-hydroxy-4,4,6a,6b,11,11,14b-heptamethyl-16-oxooctadecahydro-1H,9H-12b,8a-(epoxymethano)picen-3-yl)oxy)carbonyl)benzoic acid (111, BGE-121)



Verbindung **109** (100.0 mg (0.22 mmol, 1.00 Äq), 3,6-Difluorophthalsäureanhydrid (80.6 mg, 0.44 mmol, 2.00 Äq) und DMAP (2.7 mg, 0.02 mmol, 0.10 Äq) wurden in

3.0 ml Pyridin gelöst und über drei Tage bei 110 °C umgesetzt. Die Lösung wurde mit 20.0 ml EtOAc verdünnt und je dreimal mit 10.0 ml 1 M HCl und 10.0 ml H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20.0 ml EtOAc extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (DCM:MeOH 95:5) wurde das Produkt **111** in 23% (33.1 mg, 0.05 mmol) Ausbeute isoliert.

HPLC: t_R = 7.6 min (Methode C)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 7.19 (td, 1H, J = 8.9, 4.0 Hz), 7.18 (td, 1H, J = 8.9, 3.7 Hz), 4.76 (dd, 1H, J = 11.9, 4.6 Hz), 3.86 (s, 1H), 2.27-2.10 (m, 2H), 1.95-1.90 (m, 3H), 1.79-1.53 (m, 6H), 1.52-1.42 (m, 2H), 1.40-1.31 (m, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.19-1.15 (m, 3H), 1.12-1.07 (m, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.01-0.95 (m, 1H), 0.93 (d, 6H, J = 4.6 Hz), 0.90-0.87 (m, 1H), 0.86 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.78 (s, 3H).

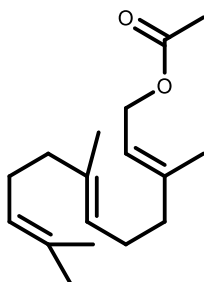
¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 178.8, 90.6, 81.3, 74.2, 54.8, 50.3, 44.0, 43.8, 41.8, 41.6, 38.4, 38.0, 37.5, 36.0, 33.7, 33.4, 33.1, 31.2, 28.2, 27.6, 24.7, 27.3, 23.8, 22.7, 20.7, 18.3, 18.1, 17.2, 16.5, 16.0.

IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3511 (w), 2935 (s), 2878 (m), 1762 (m), 1719 (s), 1615 (w), 1474 (s), 1280(m), 1243 (m), 1225 (m), 1134 (m), 1022 (w), 948 (s), 820 (m), 728 (m), 673 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₃₈H₅₀O₇F₂ +Na]⁺

Ber.: 679.3417

Gef.: 679.3417.

5.4.4 Synthese des bicyclischen Diterpens**(2E,6E)-3,7,11-Trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl acetate (146, BGE-101)**^[325]

Farnesol (2.00 ml, 8.00 mmol, 1.00 Äq) wurde in 3.0 ml Pyridin gelöst und über einen Zeitraum von 15 Minuten mit Ac₂O (3.00 ml, 28.32 mmol, 3.54 Äq) versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Lösung wurde auf 20.0 g Eis gegeben und sechsmal mit 50.0 ml Petrolether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde je zweimal mit 50.0 ml H₂O, 50.0 ml 5% H₂SO₄-Lösung und 50.0 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels *reversed phase*-Säulenchromatographie (H₂O:MeCN + 0.1% FA 25:75) gereinigt und das Produkt **146** in 83% Ausbeute (4.37 g, 16.53 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 12.3 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 600 MHz) δ [ppm] = 5.34 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 5.17-5.05 (m, 2H), 4.58 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 2.16-2.09 (m, 2H), 2.08-2.01 (m, 8H), 1.97 (dd, 1H, J = 9.1, 6.3 Hz), 1.73-1.65 (m, 6H), 1.63-1.55 (m, 6H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 151 MHz) δ [ppm] = 171.0, 142.2, 135.4, 131.2, 124.3, 123.6, 118.2, 61.3, 39.8, 39.5, 31.9, 26.7, 26.1, 23.3, 21.0, 17.6, 16.4.

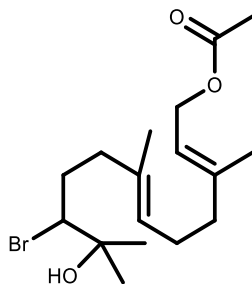
IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2967 (w), 2929 (w), 1737 (s), 1445 (w), 1377 (m), 1367 (w), 1229 (s), 1023 (m), 953 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₁₇H₂₈O₂ + Na]⁺

Ber.: 287.9182

Gef.: 287.9181.

(2E,6E)-10-Bromo-11-hydroxy-3,7,11-trimethyldodeca-2,6-dien-1-yl acetate
(147, BGE-102)^[325]



Farnesylacetat (**146**) (1.72 g, 6.49 mmol, 1.00 Äq) wurde in *t*BuOH (59.00 ml) und H₂O (29.5 ml) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und mit 63.0 ml H₂O bis zum Einstellen einer dauerhaften Trübung aufgefüllt. Durch die Zugabe von 9.0 ml *t*BuOH wurde die Trübung wieder aufgelöst. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und NBS (32.35 g, 13.18 mmol, 1.10 Äq) zu der Lösung gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis sich das gesamte NBS aufgelöst hatte. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt und fünfmal mit 70.0 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels *reversed phase*-Säulenchromatographie (H₂O:MeCN + 0.1% FA 40:60) gereinigt. Das Produkt **147** wurde in einer Ausbeute von 34% (0.80 g, 2.23 mmol) erhalten.

HPLC: t_R = 10.1 min (Methode B)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 5.39-5.29 (m, 1H), 5.21-5.13 (m, 1H), 4.58 (d, 2H, J = 7.0 Hz), 3.97-3.91 (m, 1H), 2.37-2.22 (m, 1H), 2.21-2.07 (m, 4H), 2.07-1.97 (m, 4H), 2.01-1.90 (m, 1H), 1.71-1.68 (m, 3H), 1.60-1.55 (m, 3H), 1.39-1.31 (m, 6H).

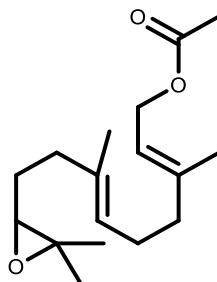
¹³C-NMR: (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 171.6, 142.5, 134.2, 125.6, 118.9, 72.9, 71.1, 61.8, 40.2, 39.8, 32.5, 26.9, 26.6, 23.6, 21.5, 16.9, 16.3.

IR: (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2972 (w), 2929 (w), 1737 (m), 1718 (w), 1445 (w), 1379 (w), 1366 (m), 1230 (s), 1159 (w), 1117 (w), 1022 (m), 954 (w), 909 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₁₇H₂₉O₃Br + Na]⁺

Ber.: 383.1192

Gef.: 383.1191.

(2E,6E)-9-(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)-3,7-dimethylnona-2,6-dien-1-yl acetate**(148, BGE-140)**^[325]

Zu einer Lösung aus Farnesylbromohydrin (**147**) (292.3 mg, 0.81 mmol, 1.00 Äq) in 4.4 ml MeOH wurde K_2CO_3 (335.4 mg, 2.43 mmol, 3.00 Äq) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20.0 ml EtOAc und 10.0 ml ges. NaCl-Lösung gelöst. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 20.0 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 3.00 ml Pyridin gelöst und mit Ac_2O (3.0 ml, 28.32 mmol, 35.00 Äq) versetzt. Die Reaktion wurde über das Wochenende bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Eis gegossen und fünfmal mit 20.0 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je dreimal mit 30.0 ml ges. $NaHCO_3$ -Lösung und 30.0 ml H_2O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels *reversed phase*-Säulenchromatographie (MeOH: H_2O 70% → 100% MeOH) aufgereinigt und ergab das Produkt **148** in 88% (200.1 mg, 0.71 mmol) Ausbeute.

HPLC: t_R = 10.0 min (Methode B)

1H -NMR: ($CDCl_3$, 600 MHz) δ [ppm] = 5.35-5.31 (m, 1H), 5.16-5.12 (m, 1H), 4.58 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 2.69 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 2.20-2.07 (m, 4H), 2.07-2.03 (m, 5H), 1.70 (s, 3H), 1.65-1.55 (m, 5H), 1.30 (s, 3H), 1.25 (s, 3H).

^{13}C -NMR: ($CDCl_3$, 101 MHz) δ [ppm] = 171.4, 142.3, 134.7, 124.4, 118.7, 74.5, 72.1, 64.4, 53.6, 39.9, 31.5, 27.5, 26.5, 24.3, 21.2, 18.9, 16.7.

IR: (ATR) ν_{max}/cm^{-1} 3420 (w), 2970 (m), 2935 (s), 1717 (s), 1450 (w), 1366 (m), 1233 (s), 1121 (w), 1030 (s), 950 (w).

HRMS (ESI(+)): m/z [C₁₇H₂₈O₃ +Na]⁺

Ber.: 303.1931

Gef.: 303.1935.

6. Literaturverzeichnis

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries" *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71, 209-249.
- [2] A. L. Blackford, M. I. Canto, M. Dbouk, R. H. Hruban, B. W. Katona, A. Chak, R. E. Brand, S. Syngal, J. Farrell, F. Kastrinos, E. M. Stoffel, A. Rustgi, A. P. Klein, I. Kamel, E. Fishman, J. He, R. Burkhart, E. J. Shin, A. M. Lennon, M. Goggins, "Pancreatic Cancer Surveillance and Survival of High-Risk Individuals" *JAMA Oncol.* **2024**, 10, 1087-1096.
- [3] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions" *Cancer Discov.* **2022**, 12, 31-46.
- [4] D. Hanahan, R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation" *Cell* **2011**, 144, 646-674.
- [5] D. Hanahan, R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer" *Cell* **2000**, 100, 57-70.
- [6] P. Ehrlich, "Über den jetzigen Stand der Chemotherapie" *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, 47, 17-47.
- [7] V. T. DeVita, E. Chu, "A History of Cancer Chemotherapy" *Cancer Res.* **2008**, 68, 8643-8653.
- [8] R. J. Papac, "Origins of Cancer Therapy" *Yale J. Biol. Med.* **2001**, 74, 391-398.
- [9] P. Diepgen, H. Goerke, "Kurze Übersichtstabelle zur Geschichte der Medizin" *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg, **1960**.
- [10] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, "Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode" *Nature* **1965**, 205, 698-699.
- [11] Z. H. Siddik, "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance" *Oncogene* **2003**, 22, 7265-7279.
- [12] K. Barabas, R. Milner, D. Lurie, C. Adin, "Cisplatin: A Review of Toxicities and Therapeutic Applications" *Vet. Comp. Oncol.* **2008**, 6, 1-18.

- [13] V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, J. M. Pérez, "Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity" *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2007**, 7, 3-18.
- [14] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action" *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 740, 364-378.
- [15] P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, "Diagnosis and Treatment: Drugs Five Years Later: Cisplatin" *Ann. Intern. Med.* **1984**, 100, 704-713.
- [16] A. W. Prestayko, J. C. D'aoust, B F Isseli, S. T. Crooke, "Cisplatin (cis-diammine-dichloroplatinum II)" *Cancer Treat. Rev.* **1979**, 6, 17-39.
- [17] J. Sagar, B. Chaib, K. Sales, M. Winslet, A. Seifalian, "Role of Stem Cells in Cancer Therapy and Cancer Stem Cells: A Review" *Cancer Cell Int.* **2007**, 7, 1-11.
- [18] D. T. Chu, T. T. Nguyen, N. L. B. Tien, D. K. Tran, J. H. Jeong, P. G. Anh, V. Van Thanh, D. T. Truong, T. C. Dinh, "Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications" *Cells* **2020**, 9, 1-19.
- [19] A. G. Minda, F. S. Awel, K. A. Seifudin, M. K. Gezahegne, "Immunotherapy Against Cancer: A Comprehensive Review" *J. Cancer Res. Exp. Oncol.* **2016**, 8, 15-25.
- [20] J. M. Kirkwood, L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski, S. Ferrone, "Immunotherapy of Cancer in 2012" *CA Cancer J. Clin.* **2012**, 62, 309-335.
- [21] H. J. Senn, R. Morant, F. Otto, H. J. Senn, "The Antihormonal Preventive Therapy of Breast Cancer and Prostate Cancer" *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2011**, 5, 117-123.
- [22] K. Parczyk, M. R. Schneider, "The Future of Antihormone Therapy: Innovations Based on an Established Principle" *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, 122, 383-396.
- [23] G. P. Adams, L. M. Weiner, "Monoclonal Antibody Therapy of Cancer" *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1147-1157.
- [24] M. J. Adler, D. S. Dimitrov, "Therapeutic Antibodies Against Cancer" *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2012**, 26, 447-481.

- [25] C. Sawyers, "Targeted cancer therapy" *Nature* **2004**, 432, 294-297.
- [26] S. K. Grant, "Therapeutic Protein Kinase Inhibitors" *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 1163-1177.
- [27] E. H. Fischer, E. G. Krebs, "Relationship of Structure to Function of Muscle Phosphorylase." *Fed. Proc.* **1966**, 25, 1511-1520.
- [28] A. M. Edelman, D. K. Blumenthal, E. G. Krebs, "Protein Serine/Threonine Kinases" *Ann. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 567-613.
- [29] E. G. Krebs, "The Enzymology of Control by Phosphorylation" *Enzyme* **1986**, 16, 3-20.
- [30] N. Kresge, R. D. Simoni, R. L. Hill, "The Process of Reversible Phosphorylation: the Work of Edmond H. Fischer." *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, e1.
- [31] A. McCluskey, A. T. R. Sim, J. A. Sakoff, "Serine-Threonine Protein Phosphatase Inhibitors: Development of Potential Therapeutic Strategies" *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1151-1175.
- [32] M. Mormando, R. Lauretta, G. Puliani, M. Bianchini, M. E. Spoltore, M. Appetecchia, "Treatment Outcomes and Toxicities of Multiple Tyrosin Kinase Inhibitors for Metastatic Medullary Thyroid Cancer: A Case Series" *Biomedicines* **2024**, 12, 1-13.
- [33] C. Saura, D. Roda, S. Roselló, M. Oliveira, T. Macarulla, J. A. Pérez-Fidalgo, R. Morales-Barrera, J. M. Sanchis-García, L. Musib, N. Budha, J. Zhu, M. Nannini, W. Y. Chan, S. M. Sanabria Bohórquez, R. D. Meng, K. Lin, Y. Yan, P. Patel, J. Baselga, J. Tabernero, A. Cervantes, "A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors" *Cancer Discov.* **2017**, 7, 102-113.
- [34] P. A. Kober, "The Preparation of Arsphenamine (Salvarsan)" *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, 41, 442-451.
- [35] W. P. Brade, K. Herdrich, M. Varini, "Ifosfamide-Pharmacology, Safety and Therapeutic Potential" *Cancer Treat. Rev.* **1985**, 12, 1-47.

- [36] R. S. Herbst, M. Fukuoka, J. Baselga, "Gefitinib - a Novel Targeted Approach to Treating Cancer" *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 956-965.
- [37] M. Shirley, "Capivasertib: First Approval" *Drugs* **2024**, 84, 337-346.
- [38] K. Lyseng-Williamson, B. Jarvis, "Imatinib" *Drugs* **2001**, 61, 1765-1774.
- [39] I. Buggia, F. Locatelli, M. B. Regazzi, M. Zecca, "Busulfan" *Ann. Pharmacother.* **1994**, 28, 1055-1062.
- [40] W. Beck, H. Bissinger, M. Girnth-Weller, B. Purucker, G. Thiel, H. Zippel, H. Seidenberger, B. Wappes, H. Schönenberger, "Antitumor-Aktive Cis-Platin(II)-Komplexe mit α -Aminosäureestern und Peptidestern. Struktur von cis-Dichlorobis(glycylglycin-ethylester)platin(II)" *Chem. Ber.* **1982**, 115, 2256-2270.
- [41] N. Perurena, L. Situ, K. Cichowski, "Combinatorial Strategies to Target RAS-Driven Cancers" *Nat. Rev. Cancer* **2024**, 24, 316-337.
- [42] D. Kessler, D. Gerlach, N. Kraut, D. B. McConnell, "Targeting Son of Sevenless 1: The Pacemaker of KRas" *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, 62, 109-118.
- [43] M. Zuberi, I. Khan, J. P. O'Bryan, "Inhibition of Ras: Proven and Potential Vulnerabilities" *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, 48, 1831-1841.
- [44] R. C. Hillig, B. Sautier, J. Schroeder, D. Moosmayer, A. Hilpmann, C. M. Stegmann, N. D. Werbeck, H. Briem, U. Boemer, J. Weiske, V. Badock, J. Mastouri, K. Petersen, G. Siemeister, J. D. Kahmann, D. Wegener, N. Böhnke, K. Eis, K. Graham, L. Wortmann, F. Von Nussbaum, B. Bader, "Discovery of Potent SOS1 Inhibitors that Block RAS Activation via Disruption of the RAS-SOS1 Interaction" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, 116, 2551-2560.
- [45] J. R. Molina, A. A. Adjei, "The Ras/Raf/MAPK Pathway" *J. Thorac. Oncol.* **2006**, 1, 7-9.
- [46] A. G. Gilman, "G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals" *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 615-649.
- [47] S. Etienne-Manneville, A. Hall, "Rho GTPases in Cell Biology" *Nature* **2002**, 420, 629-635.

- [48] Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, "Small GTP-Binding Proteins" *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 153-208.
- [49] P. A. Konstantinopoulos, M. V. Karamouzis, A. G. Papavassiliou, "Post-Translational Modifications and Regulation of the Ras Superfamily of GTPases as Anticancer Targets" *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 541-555.
- [50] E. Manser, "Meeting Review Small GTPases Take the Stage Binding State, and Thus Activity, of Most Small GTPases" *Dev. Cell* **2002**, *3*, 323-328.
- [51] F. D. Tsai, M. S. Lopes, M. Zhou, H. Court, O. Ponce, J. J. Fiordalisi, J. J. Gierut, A. D. Cox, K. M. Haigis, M. R. Philips, "K-Ras4A Splice Variant is Widely Expressed in Cancer and Uses a Hybrid Membrane-Targeting Motif" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2015**, *112*, 779-784.
- [52] D. Bar-Sagi, "A Ras by Any Other Name" *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 1441-1443.
- [53] E. Castellano, E. Santos, "Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but so Different" *Genes Cancer* **2011**, *2*, 216-231.
- [54] M. Jaumot, J. Yan, J. Clyde-Smith, J. Sluimer, J. F. Hancock, "The Linker Domain of the Ha-Ras Hypervariable Region Regulates Interactions with Exchange Factors, Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase" *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 272-278.
- [55] B. M. Willumsen, A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge, D. R. Lowy, "The p21 Ras C-Terminus is Required for Transformation and Membrane Association" *Nature* **1984**, *310*, 583-586.
- [56] J. M. L. Ostrem, K. M. Shokat, "Direct Small-Molecule Inhibitors of KRas: From Structural Insights to Mechanism-Based Design" *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 771-785.
- [57] M. Franz, B. Mörchen, C. Degenhart, D. Gülden, O. Shkura, D. Wolters, U. Koch, B. Klebl, R. Stoll, I. Helfrich, J. Scherkenbeck, "Sequence-Selective Covalent CaaX-Box Receptors Prevent Farnesylation of Oncogenic Ras Proteins and Impact MAPK/PI3 K Signaling" *ChemMedChem* **2021**, *16*, 2504-2514.

- [58] J. P. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, "A Polybasic Domain or Palmitoylation Is Required in Addition to the CAAX Motif to Localize p21ras to the Plasma Membrane" *Cell* **1990**, *63*, 133-139.
- [59] J. F. Hancock, K. Cadwallader, H. Paterson, C. J. Marshall, "A CAAX or a CAAL Motif and a Second Signal are Sufficient for Plasma Membrane Targeting of Ras Proteins." *EMBO J.* **1991**, *10*, 4033-4039.
- [60] P. M. D ppe, T. Tran Thi Phuong, J. Autzen, M. Sch pel, K. T. Yip, R. Stoll, J. Scherkenbeck, "Sequence-Selective Molecular Recognition of the C-Terminal CaaX-Boxes of Rheb and Related Ras-Proteins by Synthetic Receptors" *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1755-1763.
- [61] T. Rudack, F. Xia, J. Schlitter, C. K tting, K. Gerwert, "Ras and GTPase-Activating Protein (GAP) Drive GTP Into a Precatalytic State as Revealed by Combining FTIR and Biomolecular Simulations" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2012**, *109*, 15295-15300.
- [62] K. Gerwert, D. Mann, C. K tting, "Common Mechanisms of Catalysis in Small and Heterotrimeric GTPases and their Respective GAPs" *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 523-533.
- [63] D. Mann, C. Teuber, S. A. Tennigkeit, G. Schr ter, K. Gerwert, C. K tting, E. F. Pai, "Mechanism of the Intrinsic Arginine Finger in Heterotrimeric G Proteins" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2016**, *113*, E8041-E8050.
- [64] S. Dharmaiah, T. H. Tran, S. Messing, C. Agamasu, W. K. Gillette, W. Yan, T. Waybright, P. Alexander, D. Esposito, D. V. Nissley, F. McCormick, A. G. Stephen, D. K. Simanshu, "Structures of N-Terminally Processed KRas Provide Insight Into the Role of N-Acetylation" *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10512.
- [65] Z. Hu, J. Marti, "Discovering and Targeting Dynamic Drugging Pockets of Oncogenic Proteins: The Role of Magnesium in Conformational Changes of the G12D Mutated Kirsten Rat Sarcoma-Guanosine Diphosphate Complex" *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13865.

- [66] D. N. Shalaeva, D. A. Cherepanov, M. Y. Galperin, A. V. Golovin, A. Y. Mulkidjanian, "Evolution of Cation Binding in the Active Sites of P-Loop Nucleoside Triphosphatases in Relation to the Basic Catalytic Mechanism" *Elife* **2018**, 7:e37373, 1-35.
- [67] I. R. Vetter, A. Wittinghofer, "The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions" *Science*. **2001**, 294, 1299-1304.
- [68] B. E. Hall, S. S. Yang, P. A. Boriack-Sjodin, J. Kuriyan, D. Bar-Sagi, "Structure-Based Mutagenesis Reveals Distinct Functions for Ras Switch 1 and Switch 2 in Sos-Catalyzed Guanine Nucleotide Exchange" *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 27629-27637.
- [69] M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, "Dynamic Properties of the Ras Switch I Region and its Importance for Binding to Effectors" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2001**, 98, 4944-4949.
- [70] J. John, R. Sohmen, J. Feuerstein, R. Linke, A. Wittinghofer, R. S. Goody, "Kinetics of Interaction of Nucleotides with Nucleotide-Free H-ras p21" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1990**, 29, 3680-3687.
- [71] M. V Milburn, L. Tong, A. M. Devos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, S. Kim, M. V Milburn, L. Tong, A. M. deVos, S. Kim are, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, "Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenic ras Proteins" *Science* **1990**, 247, 939-945.
- [72] E. F. Pai, W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, A. Wittinghofer, "Structure of the Guanine-Nucleotide-Binding Domain of the Ha-Ras Oncogene Product p21 in the Triphosphate Conformation" *Nature* **1989**, 341, 209-214.
- [73] T. S. Freedman, H. Sonderrmann, G. D. Friedland, T. Kortemme, D. Bar-Sagi, S. Marqusee, J. Kuriyan, "A Ras-Induced Conformational Switch in the Ras Activator Son of Sevenless" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2006**, 103, 16692-16697.
- [74] S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, R. A. Weinberg, "Association of Sos Ras Exchange Protein with Grb2 is Implicated in Tyrosin Kinase Signal Transduction and Transformation" *Nature* **1993**, 363, 45-51.

- [75] L. Iversen, H.-L. Tu, W.-C. Lin, S. M. Christensen, S. M. Abel, J. Iwig, H.-J. Wu, J. Gureasko, C. Rhodes, R. S. Petit, S. D. Hansen, P. Thill, C.-H. Yu, D. Stamou, A. K. Chakraborty, J. Kuriyan, J. T. Groves, "Ras Activation by SOS: Allosteric Regulation by Altered Fluctuation Dynamics" *Science* **2014**, *345*, 50-54.
- [76] A. Mor, M. R. Philips, "Compartmentalized Ras/MAPK Signaling" *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 771-800.
- [77] P. Bandaru, Y. Kondo, J. Kuriyan, "The Interdependent Activation of Son-of-Sevenless and Ras" *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2019**, *9*, a031534.
- [78] H. M. Hoang, H. G. Umutesi, J. Heo, "Allosteric Autoactivation of SOS and its Kinetic Mechanism" *Small GTPases* **2021**, *12*, 44-59.
- [79] H. Sondermann, S. M. Soisson, S. Boykevisch, S.-S. Yang, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "Structural Analysis of Autoinhibition in the Ras Activator Son of Sevenless" *Cell* **2004**, *119*, 393-405.
- [80] S. M. Margarit, H. Sondermann, B. E. Hall, B. Nagar, A. Hoelz, M. Pirruccello, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "Structural Evidence for Feedback Activation by Ras·GTP of the Ras-Specific Nucleotide Exchange Factor SOS" *Cell* **2003**, *112*, 685-695.
- [81] J. Gureasko, O. Kuchment, D. L. Makino, H. Sondermann, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "Role of the Histone Domain in the Autoinhibition and Activation of the Ras Activator Son of Sevenless" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 3430-3435.
- [82] K. K. Yadav, D. Bar-Sagi, "Allosteric Gating of Son of Sevenless Activity by the Histone Domain" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 3436-3440.
- [83] J. A. Parker, A. Y. Volmar, S. Pavlopoulos, C. Mattos, "K-Ras Populates Conformational States Differently from Its Isoform H-Ras and Oncogenic Mutant K-RasG12D" *Structure* **2018**, *26*, 810-820.
- [84] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmü, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, "The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and its Loss in Oncogenic Ras Mutants" *Science* **1977**, *277*, 333-338.

- [85] Z. Moghadamchargari, M. Shirzadeh, C. Liu, S. Schrecke, C. Packianathan, D. H. Russell, M. Zhao, A. Laganowsky, "Molecular Assemblies of the Catalytic Domain of SOS with KRas and Oncogenic Mutants" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2021**, *118*, e2022403118.
- [86] P. Ann Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "The Structural Basis of the Activation of Ras by Sos2" *Nature* **1998**, *394*, 337-343.
- [87] J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, "GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins" *Cell* **2007**, *129*, 865-877.
- [88] A. Henning, R. Markwart, M. A. Esparza-Franco, G. Ladds, I. Rubio, "Ras Activation Revisited: Role of GEF and GAP Systems" *Biol. Chem.* **2015**, *396*, 831-848.
- [89] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, "Kinetic Analysis by Fluorescence of the Interaction between Ras and the Catalytic Domain of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cdc25" *Biochem.* **1998**, *37*, 7420-7430.
- [90] M. R. Ahmadian, P. Stege, K. Scheffzek, A. Wittinghofer, "Confirmation of the Arginine-Finger Hypothesis for the GAP-Stimulated GTP-Hydrolysis Reaction of Ras" *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 686-689.
- [91] C. Kötting, A. Kallenbach, Y. Suveyzdis, A. Wittinghofer, K. Gerwert, "The GAP Arginine Finger Movement Into the Catalytic Site of Ras Increases the Activation Entropy" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2008**, *105*, 6260-6265.
- [92] C. Allin, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, K. Gerwert, "Monitoring the GAP Catalyzed H-Ras GTPase Reaction at Atomic Resolution in Real Time" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2001**, *98*, 7754-7759.
- [93] B. Antonny, P. Chardin, M. Roux, M. Chabre, "GTP Hydrolysis Mechanisms in Ras p21 and in the Ras-GAP Complex Studied by Fluorescence Measurements on Tryptophan Mutants" *Biochem.* **1991**, *30*, 8287-8295.
- [94] J. Downward, "Targeting Ras Signalling Pathways in Cancer Therapy" *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11-22.

- [95] D. K. Simanshu, D. V. Nissley, F. McCormick, "Ras Proteins and their Regulators in Human Disease" *Cell* **2017**, 170, 17-33.
- [96] M. Drosten, A. Dhawahir, E. Y. M. Sum, J. Urosevic, C. G. Lechuga, L. M. Esteban, E. Castellano, C. Guerra, E. Santos, M. Barbacid, "Genetic Analysis of Ras Signaling Pathways in Cell Proliferation, Migration and Survival" *EMBO J.* **2010**, 29, 1091-1104.
- [97] M. Malumbres, M. Barbacid, "Ras Oncogenes: The First 30 Years" *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 459-465.
- [98] J. Avruch, A. Khokhlatchev, J. M. Kyriakis, Z. Luol, G. Tziviont, D. Vavvas, X.-F. Zhang, "Ras Activation of the Raf Kinase: Tyrosine Kinase Recruitment of the MAP Kinase Cascade" *Recent Prog. Horm. Res.* **2001**, 56, 127-155.
- [99] J. Boonstra, P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij, P. van Bergen en Henegouwen, "The Epidermal Growth Factor." *Cell Biol. Int.* **1995**, 19, 413-430.
- [100] Z. Du, C. M. Lovly, "Mechanisms of Receptor Tyrosine Kinase Activation in Cancer" *Mol. Cancer* **2018**, 17:58, 1-13.
- [101] E. J. Lowenstein, R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, J. Schlessinger, "The SH2 and SH3 Domain-Containing Protein GRB2 Links Receptor Tyrosine Kinases to Ras Signaling" *Cell* **1992**, 70, 431-442.
- [102] W. Li, R. Nishimura, A. Kashishian, A. G. Batzer, W. J. Kim, J. A. Cooper, J. Schlessinger, "A New Function for a Phosphotyrosine Phosphatase: Linking Grb2-SOS to a Receptor Tyrosine Kinase." *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 509-517.
- [103] N. Li, A. Batzer, R. Daly, E. Skolnik, P. Chardint, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger, "Guanine-Nucleotide-Releasing Factor hSos1 Binds to Grb2 and Links Receptor Tyrosine Kinases to HRas Signalling" *Nature* **1993**, 363, 85-88.
- [104] M. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wadet, T. Pawson, D. Bowtell, "The SH2 and SH3 Domains of Mammalian Grb2 Couple the EGF Receptor to the HRas Activator mSos 1" *Nature* **1993**, 363, 83-85.

- [105] A. M. Cheng, T. M. Saxton, R. Sakai, S. Kulkarni, G. Mbamalu, W. Vogel, C. G. Tortorice, R. D. Cardiff, J. C. Cross, W. J. Muller, T. Pawson, S. L. Research, "Mammalian Grb2 Regulates Multiple Steps in Embryonic Development and Malignant Transformation" *Cell* **1998**, 95, 793-803.
- [106] R. Marais, Y. Light, H. F. Paterson, C. J. Marshall, "Ras Recruits Raf-1 to the Plasma Membrane for Activation by Tyrosine Phosphorylation." *EMBO J.* **1995**, 14, 3136-3145.
- [107] J. R. Fabian, I. O. Daar, D. K. Morrison, "Critical Tyrosine Residues Regulate the Enzymatic and Biological Activity of Raf-1 Kinase" *Mol. Cell. Biol.* **1993**, 13, 7170-7179.
- [108] J. M. Kyriakis, H. App, X.-F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, J. Avruch, "Raf-1 Activates MAP Kinase-Kinase" *Nature* **1992**, 358, 417-421.
- [109] A. M. Gardner, R. R. Vaillancourt, C. A. Lange-Carter, G. L. Johnson, "MEK-1 Phosphorylation by MEK Kinase, Raf, and Mitogen-activated Protein Kinase: Analysis of Phosphopeptides and Regulation of Activity" *Mol. Biol. Cell* **1994**, 5, 193-201.
- [110] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, W. Kolch, "Suppression of Raf-1 Kinase Activity and MAP Kinase Signalling by RKIP" *Nature* **1999**, 401, 173-177.
- [111] C. M. Crews, R. L. Erikson, "Purification of a Murine Protein-Tyrosine/Threonine Kinase that Phosphorylates and Activates the Erk-1 Gene Product: Relationship to the Fission Yeast Byr1 Gene Product (Phorbol Ester-Activated Threonine/Tyrosine Kinase)" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **1992**, 89, 8205-8209.
- [112] A. Brunet, D. le Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, J. Pouyssegur, "Nuclear Translocation of p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinase is Required for Growth Factor-Induced Gene Expression and Cell Cycle Entry" *EMBO J.* **1999**, 18, 664-674.
- [113] C. Peyssonnaud, A. Eychène, "The Raf/MEK/ERK Pathway: New Concepts of Activation" *Biol. Cell* **2001**, 93, 53-62.

- [114] Y. He, M. M. Sun, G. G. Zhang, J. Yang, K. S. Chen, W. W. Xu, B. Li, "Targeting PI3K/Akt Signal Transduction for Cancer Therapy" *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, 6:425, 1-17.
- [115] B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, G. B. Mills, "Exploiting the PI3K/Akt Pathway for Cancer Drug Discovery" *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 998-1004.
- [116] B. A. Hemmings, D. F. Restuccia, "PI3K-PKB/Akt pathway" *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, 4, 1-4.
- [117] D. R. Alessi, S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. J. Gaffney, C. B. Reese, P. Cohen, "Characterization of a 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase which Phosphorylates and Activates Protein Kinase B" *Curr. Biol.* **1997**, 7, 261-269.
- [118] B. D. Manning, L. C. Cantley, "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream" *Cell* **2007**, 129, 1261-1274.
- [119] A. Fernández-Medarde, J. De Las Rivas, E. Santos, "40 years of RAS – a Historic Overview" *Genes* **2021**, 12, 681.
- [120] J. J. Harvey, "An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice" *Nature* **1964**, 204, 1104-1105.
- [121] R. W. Ellis, D. Defeo, T. Y. Shih, M. A. Gonda, H. A. Young, N. Tsuchida, D. R. Lowy, E. M. Scolnick, "The p21 Src Genes of Harvey and Kirsten Sarcoma Viruses Originate from Divergent Members of a Family of Normal Vertebrate Genes" *Nature* **1981**, 292, 506-511.
- [122] S. R. Punekar, V. Velcheti, B. G. Neel, K. K. Wong, "The Current State of the Art and Future Trends in RAS-Targeted Cancer Therapies" *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2022**, 19, 637-655.
- [123] S. M. Sweeney, E. Cerami, A. Baras, T. J. Pugh, N. Schultz, T. Stricker, J. Lindsay, C. Del Vecchio Fitz, P. Kumari, C. Micheel, K. Shaw, J. Gao, N. Moore, T. Stricker, C. Kandoth, B. Reardon, E. Lepisto, S. Gardos, K. Dang, J. Guinney, L. Omberg, T. Yu, B. Gross, Z. Heins, D. Hyman, B. Rollins, C. Sawyers, D. Solit, D. Schrag, V. Velculescu, F. Andre, P. Bedard, M. Levy, G. Meijer, B. Rollins, K. Shaw, "AACR

- Project Genie: Powering Precision Medicine Through an International Consortium" *Cancer Discov.* **2017**, 7, 818-831.
- [124] R. Nussinov, H. Jang, "Direct K-Ras Inhibitors to Treat Cancers: Progress, New Insights, and Approaches to Treat Resistance" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2024**, 64, 231-255.
- [125] S. A. Forbes, D. Beare, H. Boutselakis, S. Bamford, N. Bindal, J. Tate, C. G. Cole, S. Ward, E. Dawson, L. Ponting, R. Stefancsik, B. Harsha, C. Y. Kok, M. Jia, H. Jubb, Z. Sondka, S. Thompson, T. De, P. J. Campbell, "COSMIC: Somatic Cancer Genetics at High-Resolution" *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, D777-D783.
- [126] R. Serna-Blasco, M. Sanz-Álvarez, Ó. Aguilera, J. García-Foncillas, "Targeting the RAS-Dependent Chemoresistance: The Warburg Connection" *Semin. Cancer Biol.* **2019**, 54, 80-90.
- [127] M. J. Duffy, J. Crown, "Drugging 'Undruggable' Genes for Cancer Treatment: Are we Making Progress?" *Int. J. Cancer* **2021**, 148, 8-17.
- [128] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, "K-Ras(G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and Effector Interactions" *Nature* **2013**, 503, 548-551.
- [129] I. Khan, J. M. Rhett, J. P. O'Bryan, "Therapeutic Targeting of RAS: New Hope for Drugging the 'Undruggable'" *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, 1867, 118570.
- [130] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, "An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms" *Science* **2003**, 307, 1746-1752.
- [131] L. Yang, W. Liu, H. Mei, Y. Zhang, X. Yu, Y. Xu, H. Li, J. Huang, Z. Zhao, "Synthesis and Biological Evaluation of Pentanedioic Acid Derivatives as Farnesyltransferase Inhibitors" *MedChemComm* **2015**, 6, 671-676.

- [132] W. R. Judd, P. M. Slattum, K. C. Hoang, L. Bhoite, L. Valppu, G. Alberts, B. Brown, B. Roth, K. Ostanin, L. Huang, D. Wettstein, B. Richards, J. A. Willardsen, "Discovery and SAR of Methylated Tetrahydropyranyl Derivatives as Inhibitors of Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase (ICMT)" *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5031-5047.
- [133] X. Chen, H. Yao, M. Kashif, G. Revêchon, M. Eriksson, J. Hu, T. Wang, Y. Liu, E. Tüksammel, S. Strömlad, I. M. Ahearn, M. R. Philips, C. Wiel, M. X. Ibrahim, M. O. Bergo, "A Small-Molecule Icmt Inhibitor Delays Senescence of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells" *Elife* **2021**, *10*, 1-10.
- [134] F. A. Siddiqui, C. Alam, P. Rosenqvist, M. Ora, A. Sabt, G. B. Manoharan, L. Bindu, S. Okutachi, M. Catillon, T. Taylor, O. M. Abdelhafez, H. Lönnberg, A. G. Stephen, A. C. Papageorgiou, P. Virta, D. Abankwa, "PDE6D Inhibitors with a New Design Principle Selectively Block K-Ras Activity" *ACS Omega* **2020**, *5*, 832-842.
- [135] P. Kaya, E. Schaffner-Reckinger, G. babu Manoharan, V. Vukic, A. Kiriazis, M. Ledda, M. Burgos Renedo, K. Pavic, A. Gaigneaux, E. Glaab, D. K. Abankwa, "An Improved PDE6D Inhibitor Combines with Sildenafil to Inhibit KRAS Mutant Cancer Cell Growth" *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 8569-8584.
- [136] A. B. Coley, A. Ward, A. B. Keeton, X. Chen, Y. Maxuitenko, A. Prakash, F. Li, J. B. Foote, D. J. Buchsbaum, G. A. Piazza, "Pan-RAS inhibitors: Hitting Multiple RAS Isozymes with One Stone" *Adv. Cancer Res.* **2022**, *153*, 131-168.
- [137] M. E. Welsch, A. Kaplan, J. M. Chambers, M. E. Stokes, P. H. Bos, A. Zask, Y. Zhang, M. Sanchez-Martin, M. A. Badgley, C. S. Huang, T. H. Tran, H. Akkiraju, L. M. Brown, R. Nandakumar, S. Cremers, W. S. Yang, L. Tong, K. P. Olive, A. Ferrando, B. R. Stockwell, "Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors" *Cell* **2017**, *168*, 878-889.
- [138] D. Kim, L. Herdeis, D. Rudolph, Y. Zhao, J. Böttcher, A. Vides, C. I. Ayala-Santos, Y. Pourfarjam, A. Cuevas-Navarro, J. Y. Xue, A. Mantoulidis, J. Bröker, T. Wunberg, O. Schaaf, J. Popow, B. Wolkerstorfer, K. G. Kropatsch, R. Qu, E. de Stanchina, B. Sang, C. Li, D. B. McConnell, N. Kraut, P. Lito, "Pan-KRAS Inhibitor Disables Oncogenic Signalling and Tumour Growth" *Nature* **2023**, *619*, 160-166.

- [139] J. B. Foote, T. E. Mattox, A. B. Keeton, X. Chen, F. Smith, K. L. Berry, T. Holmes, J. Wang, C.-H. Huang, A. B. Ward, A. K. Mitra, V. Ramirez-Alcantara, C. Hardy, K. G. Fleten, K. Flatmark, K. J. Yoon, S. Sarvesh, G. P. Nagaraju, D. S. R. Bandi, Y. Y. Maxuitenko, J. Valiyaveetil, J. L. Carstens, D. J. Buchsbaum, J. Yang, G. Zhou, E. Nurmemmedov, I. Babic, V. Gaponenko, H. Abdelkarim, M. R. Boyd, G. S. Gorman, U. Manne, S. Bae, B. F. El-Rayes, G. A. Piazza, "A Novel Pan-RAS Inhibitor with a Unique Mechanism of Action Blocks Tumor Growth in Mouse Models of GI Cancer" *Cancer Res.* **2025**, *85*, 956-972.
- [140] M. Molina-Arcas, J. Downward, "Exploiting the Therapeutic Implications of KRAS Inhibition on Tumor Immunity" *Cancer Cell* **2024**, *42*, 338-357.
- [141] Y. Rathore, J. Shukla, T. Lakhanpal, I. Laroiya, A. Deep, R. Kumar, H. Singh, A. Bal, G. Singh, K. Thakur, B. R. Mittal, "Investigation of KRas G12C Inhibitor JAB-21822 as a Single Agent and in Combination with SHP2 Inhibitor JAB-3312 in Preclinical Cancer Model" *Ann. Oncol.* **2022**, *33*, S1441.
- [142] J. Li, J. Zhao, B. Cao, J. Fang, X. Li, M. Wang, Y. Ba, X. Li, Z. Li, Z. Liu, Y. Wang, Y. Cheng, C. Bai, L. Shen, "A Phase I/II Study of First-in-Human Trial of JAB-21822 (KRAS G12C Inhibitor) in Advanced Solid Tumors" *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, 3089.
- [143] J. Canon, K. Rex, A. Y. Saiki, C. Mohr, K. Cooke, D. Bagal, K. Gaida, T. Holt, C. G. Knutson, N. Koppada, B. A. Lanman, J. Werner, A. S. Rapaport, T. San Miguel, R. Ortiz, T. Osgood, J. R. Sun, X. Zhu, J. D. McCarter, L. P. Volak, B. E. Houk, M. G. Fakih, B. H. O'Neil, T. J. Price, G. S. Falchook, J. Desai, J. Kuo, R. Govindan, D. S. Hong, W. Ouyang, H. Henary, T. Arvedson, V. J. Cee, J. R. Lipford, "The Clinical KRAS(G12C) Inhibitor AMG 510 Drives Anti-Tumour Immunity" *Nature* **2019**, *575*, 217-223.
- [144] S. Dhillon, "Adagrasib: First Approval" *Drugs* **2023**, *83*, 275-285.
- [145] A. Sacher, P. LoRusso, M. R. Patel, W. H. Miller Jr., E. Garralda, M. D. Forster, A. Santoro, A. Falcon, T. W. Kim, L. Paz-Ares, S. Bowyer, M. de Miguel, S.-W. Han, M. G. Krebs, J.-S. Lee, M. L. Cheng, K. M. E. Arbour, Y. Choi, Z. Shi, S. Mandlekar, M. T. Lin, S. Royer-Joo, J. Chang, N. V. Dharia, J. L. Schutzmann, J. Desai, "Single-

- Agent Divarasib (GDC-6036) in Solid Tumors with a KRAS G12C Mutation” *N. Engl. J. Med.* **2023**, *389*, 710-721.
- [146] M. J. Nokin, A. Mira, E. Patrucco, B. Ricciuti, S. Cousin, I. Soubeyran, S. San José, S. Peirone, L. Caizzi, S. Vietti Michelina, A. Bourdon, X. Wang, D. Alvarez-Villanueva, M. Martínez-Iniesta, A. Vidal, T. Rodrigues, C. García-Macías, M. M. Awad, E. Nadal, A. Villanueva, A. Italiano, M. Cereda, D. Santamaría, C. Ambrogio, “RAS-ON Inhibition Overcomes Clinical Resistance to KRAS G12C-OFF Covalent Blockade” *Nat. Comm.* **2024**, *15*, 1-18.
- [147] K. H. Wrighton, “Remodeling Cyclophilin A to Target KRas” *Nat. Cancer* **2023**, *4*, 1641.
- [148] J. Luo, “KRAS Mutation in Pancreatic Cancer” *Semin. Oncol.* **2021**, *48*, 10-18.
- [149] S. Sogabe, Y. Kamada, M. Miwa, A. Niida, T. Sameshima, M. Kamaura, K. Yonemori, S. Sasaki, J. I. Sakamoto, K. Sakamoto, “Crystal Structure of a Human K-Ras G12D Mutant in Complex with GDP and the Cyclic Inhibitory Peptide KRpep-2d” *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 732-736.
- [150] K. Sakamoto, T. Masutani, T. Hirokawa, “Generation of KS-58 as the First K-Ras(G12D)-Inhibitory Peptide Presenting Anti-Cancer Activity In Vivo” *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21671.
- [151] Y. Tang, X. Pu, X. Yuan, Z. Pang, F. Li, X. Wang, “Targeting KRASG12D Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential” *Cancer Gene Ther.* **2024**, *31*, 961-969.
- [152] Y. Zhou, Y. Zou, M. Yang, S. Mei, X. Liu, H. Han, C. D. Zhang, M. M. Niu, “Highly Potent, Selective, Biostable, and Cell-Permeable Cyclic D-Peptide for Dual-Targeting Therapy of Lung Cancer” *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 7117-7128.
- [153] Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, “Discovery of Small Molecules that Bind to K-Ras and Inhibit Sos-Mediated Activation” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140-6143.
- [154] D. Kessler, M. Gmachl, A. Mantoulidis, L. J. Martin, A. Zoephel, M. Mayer, A. Gollner, D. Covini, S. Fischer, T. Gerstberger, T. Gmaschitz, C. Goodwin, P. Greb, D.

- Häring, W. Hela, J. Hoffmann, J. Karolyi-Oezguer, P. Knesl, S. Kornigg, M. Koegl, R. Kousek, L. Lamarre, F. Moser, S. Munico-Martinez, C. Peinsipp, J. Phan, J. Rinnenthal, J. Sai, C. Salamon, Y. Scherbantin, K. Schipany, R. Schnitzer, A. Schrenk, B. Sharps, G. Sizler, Q. Sun, A. Waterson, B. Wolkerstorfer, M. Zeeb, M. Pearson, S. W. Fesik, D. B. McConnell, "Drugging an Undruggable Pocket on KRAS" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 15823-15829.
- [155] L. Wallon, I. Khan, K. W. Teng, A. Koide, M. Zuberi, J. Li, G. Ketavarapu, N. J. Traaseth, J. P. O'bryan, S. Koide, "Inhibition of RAS-Driven Signaling and Tumorigenesis with a Pan-RAS Monobody Targeting the Switch I/II pocket" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2022**, *119*, e2204481119.
- [156] T. H. Tran, P. Alexander, S. Dharmaiah, C. Agamasu, D. V Nissley, F. McCormick, D. Esposito, D. K. Simanshu, A. G. Stephen, T. E. Balias, "The Small Molecule BI-2852 Induces a Nonfunctional Dimer of KRAS" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2020**, *117*, 3363-3364.
- [157] M. Schöpel, K. F. G. Jockers, P. M. Düppe, J. Autzen, V. N. Potheraveedu, S. Ince, K. T. Yip, R. Heumann, C. Herrmann, J. Scherkenbeck, R. Stoll, "Bisphenol a Binds to Ras Proteins and Competes with Guanine Nucleotide Exchange: Implications for GTPase-Selective Antagonists" *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9664-9672.
- [158] S. Jeuken, O. Shkura, M. Roeger, V. Brickau, A. Choidas, C. Degenhart, D. Gülden, B. Klebl, U. Koch, R. Stoll, J. Scherkenbeck, "Synthesis, Biological Evaluation and Binding Mode of a New Class of Oncogenic K-Ras4b Inhibitors" *ChemMedChem* **2022**, *17*, e202200392.
- [159] A. Cruz-Migoni, P. Canning, C. E. Quevedo, C. J. R. Bataille, N. Bery, A. Miller, A. J. Russell, S. E. V. Phillips, S. B. Carr, T. H. Rabbitts, "Structure-Based Development of New RAS-Effector Inhibitors from a Combination of Active and Inactive RAS-Binding Compounds" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 2545-2550.
- [160] C. E. Quevedo, A. Cruz-Migoni, N. Bery, A. Miller, T. Tanaka, D. Petch, C. J. R. Bataille, L. Y. W. Lee, P. S. Fallon, H. Tulmin, M. T. Ehebauer, N. Fernandez-Fuentes, A. J. Russell, S. B. Carr, S. E. V. Phillips, T. H. Rabbitts, "Small Molecule Inhibitors

- of RAS-Effector Protein Interactions Derived using an Intracellular Antibody Fragment" *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3169.
- [161] X. Wang, S. Allen, J. F. Blake, V. Bowcut, D. M. Briere, A. Calinisan, J. R. Dahlke, J. B. Fell, J. P. Fischer, R. J. Gunn, J. Hallin, J. Laguer, J. D. Lawson, J. Medwid, B. Newhouse, P. Nguyen, J. M. O'Leary, P. Olson, S. Pajk, L. Rahbaek, M. Rodriguez, C. R. Smith, T. P. Tang, N. C. Thomas, D. Vanderpool, G. P. Vigers, J. G. Christensen, M. A. Marx, "Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor" *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 3123-3133.
- [162] F. Liang, Z. Kang, X. Sun, J. Chen, X. Duan, H. He, J. Cheng, "Inhibition Mechanism of MRTX1133 on KRASG12D: A Molecular Dynamics Simulation and Markov State Model study." *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2023**, *37*, 157-166.
- [163] J. Hallin, V. Bowcut, A. Calinisan, D. M. Briere, L. Hargis, L. D. Engstrom, J. Laguer, J. Medwid, D. Vanderpool, E. Lifset, D. Trinh, N. Hoffman, X. Wang, J. David Lawson, R. J. Gunn, C. R. Smith, N. C. Thomas, M. Martinson, A. Bergstrom, F. Sullivan, K. Bouhana, S. Winski, L. He, J. Fernandez-Banet, A. Pavlicek, J. R. Haling, L. Rahbaek, M. A. Marx, P. Olson, J. G. Christensen, "Anti-Tumor Efficacy of a Potent and Selective Non-Covalent KRASG12D Inhibitor" *Nat. Med.* **2022**, *28*, 2171-2182.
- [164] K. C. M. Gulay, X. Zhang, V. Pantazopoulou, J. Patel, E. Esparza, D. S. P. Babu, S. Ogawa, J. Weitz, I. Ng, E. S. Mose, M. Pu, D. D. Engle, A. M. Lowy, H. Tiriack, "Dual Inhibition of KRASG12D and Pan-ERBB Is Synergistic in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma" *Cancer Res.* **2023**, *83*, 3001-3012.
- [165] M. H. Hofmann, M. Gmachl, J. Ramharter, F. Savarese, D. Gerlach, J. R. Marszalek, M. P. Sanderson, D. Kessler, F. Trapani, H. Arnhof, K. Rumpel, D. A. Botesteanu, P. Ettmayer, T. Gerstberger, C. Kofink, T. Wunberg, A. Zoephel, S. C. Fu, J. L. Teh, J. Böttcher, N. Pototschnig, F. Schachinger, K. Schipany, S. Lieb, C. P. Vellano, J. C. O'connell, R. L. Mendes, J. Moll, M. Petronczki, T. P. Heffernan, M. Pearson, D. B. McConnell, N. Kraut, "Bi-3406, a Potent and Selective SOS1-KRas Interaction Inhibitor, is Effective in KRas-Driven Cancers through Combined MEK Inhibition" *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 142-157.

- [166] J. Wu, X. Li, C. Wu, Y. Wang, J. Zhang, "Current Advances and Development Strategies of Targeting Son of Sevenless 1 (SOS1) in Drug Discovery" *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, 268, 116282.
- [167] J. M. Ketcham, J. Haling, S. Khare, V. Bowcut, D. M. Briere, A. C. Burns, R. J. Gunn, A. Ivetac, J. Kuehler, S. Kulyk, J. Laguer, J. D. Lawson, K. Moya, N. Nguyen, L. Rahbaek, B. Saechao, C. R. Smith, N. Sudhakar, N. C. Thomas, L. Vegar, D. Vanderpool, X. Wang, L. Yan, P. Olson, J. G. Christensen, M. A. Marx, "Design and Discovery of MRTX0902, a Potent, Selective, Brain-Penetrant, and Orally Bioavailable Inhibitor of the SOS1:KRAS Protein-Protein Interaction" *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 9678-9690.
- [168] M. M. Awad, S. Liu, I. I. Rybkin, K. C. Arbour, J. Dilly, V. W. Zhu, M. L. Johnson, R. S. Heist, T. Patil, G. J. Riely, J. O. Jacobson, X. Yang, N. S. Persky, D. E. Root, K. E. Lowder, H. Feng, S. S. Zhang, K. M. Haigis, Y. P. Hung, L. M. Sholl, B. M. Wolpin, J. Wiese, J. Christiansen, J. Lee, A. B. Schrock, L. P. Lim, K. Garg, M. Li, L. D. Engstrom, L. Waters, J. D. Lawson, P. Olson, P. Lito, S.-H. I. Ou, J. G. Christensen, P. A. Jänne, A. J. Aguirre, "Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibition in Cancer" *N. Engl. J. Med.* **2021**, 384, 2382-2393.
- [169] B. Sun, L. Wu, Y. Wu, C. Zhang, L. Qin, M. Hayashi, M. Kudo, M. Gao, T. Liu, "Therapeutic Potential of Centella Asiatica and Its Triterpenes: A Review" *Front. Pharmacol.* **2020**, 11, 568032.
- [170] J. L. C. Sousa, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, A. M. S. Silva, "Recent Developments in the Functionalization of Betulinic Acid and its Natural Analogues: A Route to New Bioactive Compounds" *Molecules* **2019**, 24, 1-35.
- [171] A. R. Jassbi, S. Zare, O. Firuzi, J. Xiao, "Bioactive Phytochemicals from Shoots and Roots of Salvia Species" *Phytochem. Rev.* **2016**, 15, 829-867.
- [172] P. Li, A. Liu, Y. Li, B. Yuan, W. Xiao, Z. Liu, S. Zhang, H. Lin, "Development and Validation of an Analytical Method Based on HPLC-ELSD for the Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid, Carnosol, Carnosic acid, Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Rosemary" *Molecules* **2019**, 24, 1.

- [173] S. Jäger, H. Trojan, T. Kopp, M. N. Laszczyk, A. Scheffler, "Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-potent Plant Extracts" *Molecules* **2009**, *14*, 2016-2031.
- [174] R. A. Hill, J. D. Connolly, "Triterpenoids" *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 1294-1329.
- [175] R.-j. Chen, X.-y. Guo, B.-h. Cheng, Y.-q. Gong, B.-y. Ying, M.-x. Lin, "Saikosaponin a Inhibits Cigarette Smoke-Induced Oxidant Stress and Inflammatory Responses by Activation of Nrf2" *Inflamm.* **2018**, *41*, 1297-1303.
- [176] W. H. Park, S. Kang, Y. Piao, C. J. Pak, M. S. Oh, J. Kim, M. S. Kang, Y. K. Pak, "Ethanol Extract of Bupleurum Falcatum and Saikosaponins Inhibit Neuroinflammation via Inhibition of NF- κ B" *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *174*, 37-44.
- [177] Y. Li, J. Wang, L. Li, W. Song, M. Li, X. Hua, Y. Wang, J. Yuan, Z. Xue, "Natural Products of Pentacyclic Triterpenoids: From Discovery to Heterologous Biosynthesis" *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *40*, 1303-1353.
- [178] B. Liu, Y. Liu, G. Yang, Z. Xu, J. Chen, "Ursolic Acid Induces Neural Regeneration after Sciatic Nerve Injury" *Neural Regen. Res.* **2013**, *8*, 2510-2519.
- [179] R. Martín, C. Cordova, J. A. San Román, B. Gutierrez, V. Cachofeiro, M. L. Nieto, "Oleanolic Acid Modulates the Immune-Inflammatory Response in Mice with Experimental Autoimmune Myocarditis and Protects from Cardiac Injury. Therapeutic Implications for the Human Disease" *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *72*, 250-262.
- [180] H. Zhang, Y. Song, Z. Zhang, "Glycyrrhizin Administration Ameliorates Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis in Mice" *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *72*, 250-262.
- [181] M. Yu, L. Si, Y. Wang, Y. Wu, F. Yu, P. Jiao, Y. Shi, H. Wang, S. Xiao, G. Fu, K. Tian, Y. Wang, Z. Guo, X. Ye, L. Zhang, D. Zhou, "Discovery of Pentacyclic Triterpenoids as Potential Entry Inhibitors of Influenza Viruses" *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10058-10071.
- [182] J. Popović-Djordjević, C. Quispe, R. Giordo, A. Kostić, J. S. Katanić Stanković, P. V. Tsouh Fokou, K. Carbone, M. Martorell, M. Kumar, G. Pintus, J. Sharifi-Rad, A. O.

- Docea, D. Calina, "Natural Products and Synthetic Analogues Against HIV: A Perspective to Develop New Potential Anti-HIV Drugs" *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 233, 114217.
- [183] S. Xiao, Z. Tian, Y. Wang, L. Si, L. Zhang, D. Zhou, "Recent Progress in the Antiviral Activity and Mechanism Study of Pentacyclic Triterpenoids and their Derivatives" *Med. Res. Rev.* **2018**, 38, 951-976.
- [184] Z. Xu, D. Lu, J. Yuan, M. Ren, R. Ma, Q. Xie, Y. Li, J. Li, J. Wang, "Storax, A Promising Botanical Medicine for Treating Cardio-Cerebrovascular Diseases: A Review" *Front. Pharmacol.* **2021**, 12, 785598.
- [185] S. B. Liang, W. Bin Hou, R. X. Zheng, C. H. Liang, L. J. Yan, H. N. Wang, H. J. Cao, M. Han, N. Robinson, J. P. Liu, "Compound glycyrrhizin injection for improving liver function in children with acute icteric hepatitis: A systematic review and meta-analysis" *Integr. Med. Res.* **2022**, 11, 100772.
- [186] I. N. Abu Bakar, M. F. Ibrahim, M. Hakiman, S. Abd-Aziz, S. Prasongsuk, L. C. Yen Tin, M. A. Jenol, "Characterization of Asiaticoside Concentration, Total Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Different Varieties of Centella Asiatica (L.) and Essential Oil Extraction using Hydro-Distillation with Enzyme Assisted" *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, 44, 102474.
- [187] A. N. Shikov, G. I. Djachuk, D. V. Sergeev, O. N. Pozharitskaya, E. V. Esaulenko, V. M. Kosman, V. G. Makarov, "Birch Bark Extract as Therapy for Chronic Hepatitis C – A Pilot Study" *Phytomedicine* **2011**, 18, 807-810.
- [188] H. M. Al-kuraishy, A. I. Al-Gareeb, G. El-Saber Batiha, "The Possible Role of Ursolic Acid in Covid-19: A Real Game Changer" *Clin. Nutr. ESPEN* **2022**, 47, 414-417.
- [189] B. Bednarczyk-Cwynar, A. Lésków, I. Szczuka, L. Zaprutko, D. Diakowska, "The Effect of Oleanolic Acid and Its Four New Semisynthetic Derivatives on Human MeWo and A375 Melanoma Cell Lines" *Pharm.* **2023**, 16, 746.

- [190] W.-L. Liao, Y.-F. Liu, T.-H. Ying, J.-C. Shieh, Y.-T. Hung, H.-J. Lee, C.-Y. Shen, C.-W. Cheng, "Inhibitory Effects of Ursolic Acid on the Stemness and Progression of Human Breast Cancer Cells by Modulating Argonaute-2" *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 366.
- [191] M. K. Shanmugam, X. Dai, A. P. Kumar, B. K. H. Tan, G. Sethi, A. Bishayee, "Ursolic Acid in Cancer Prevention and Treatment: Molecular Targets, Pharmacokinetics and Clinical Studies" *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1679-1587.
- [192] W.-b. Mo, C.-h. Su, J.-y. Huang, J. Liu, Z.-f. Chen, K.-g. Cheng, "Synthesis of Acyl Oleanolic Acid-Uracil Conjugates and their Anti-Tumor Activity" *Chem. Cent. J.* **2016**, *10*:69.
- [193] Ch.-M. Liu, J.-Y. Huang, L.-X. Sheng, X.-A. Wen, K.-G. Cheng, "Synthesis and Anti-tumor Activity of Fluorouracil – Oleanolic Acid/Ursolic Acid/Glycyrrhetinic Acid Conjugates" *MedChemComm* **2019**, *10*, 1370.
- [194] E. Bebenek, M. Jastrzebska, M. Kadela-Tomanek, E. Chrobak, B. Orzechowska, K. Zwoliska, M. Latocha, A. Mertas, Z. Czuba, S. Boryczka, "Novel Triazole Hybrids of Betulin – Synthesis and Biological Activity Profile" *Molecules* **2017**, *22*, 1876.
- [195] W. Wang, L. Lei, Z. Liu, H. Wang, Q. Meng, "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Nitrogen Heterocycle-Containing Ursolic Acid Analogs as Antitumor Agents" *Molecules* **2019**, *24*, 877.
- [196] E. Bebenek, Z. Rzepka, J. M. Hermanowicz, E. Chrobak, A. Surazynski, A. Beberok, D. Wrzesniok, "Synthesis, Pharmacokinetic Profile, Anticancer Activity and Toxicity of the New Amides of Betulonic Acid — In Silico and In Vitro Study" *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 4517.
- [197] W. Li, H. Zhang, M. Nie, W. Wang, Z. Liu, C. Chen, H. Chen, R. Liu, Z. Baloch, K. Ma, "A Novel Synthetic Ursolic Acid Derivative Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines" *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 2323-2329.
- [198] L. Černá, U. Bildziukevich, L. Rárová, J. Trylčová, D. Šaman, J. Weber, P. Lovecká, Z. Wimmer, "Oxime Derivatives of Betulonic Acid and Platanic Acid as Novel Cytotoxic or AntiViral Agents" *React. Chem. Eng.* **2024**, *9*, 1087-1095.

- [199] W. Y. Wang, W. Y. Wu, A. L. Li, Q. S. Liu, Y. Sun, W. Gu, "Synthesis, Anticancer Evaluation and Mechanism Studies of Novel Indolequinone Derivatives of Ursolic Acid" *Bioorg. Chem.* **2021**, *109*, 104705.
- [200] Ş. Halil, M. Berre, Ş. Rabia Büşra, K. Halil Burak, H. Ebru, "Synthesis of Oleanolic Acid Hydrazide-Hydrazone Hybrid Derivatives and Investigation of their Cytotoxic Effects on A549 Human Lung Cancer Cells" *Results Chem.* **2022**, *4*, 100317.
- [201] A. Lombrea, C. G. Watz, L. Bora, C. A. Dehelean, Z. Diaconeasa, S. Dinu, M. Turks, J. Luginina, U. Peipins, C. Danciu, "Enhanced Cytotoxicity and Antimelanoma Activity of Novel Semisynthetic Derivatives of Betulinic Acid with Indole Conjugation" *Plants* **2023**, *13*, 36.
- [202] S. Friedrich, I. Serbian, S. Hoenke, R. K. Wolfram, R. Csuk, "Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Malachite Green Derived Oleanolic and Ursolic Acid Piperazineamides" *Med. Chem. Res.* **2020**, *29*, 926-933.
- [203] X. Yin, R. Hu, Y. Zhou, W. Zhu, Y. Zhou, "Cytotoxic 13,28 Epoxy Bridged Oleanane-Type Triterpenoid Saponins from the Roots of *Ardisia crispa*" *Molecules* **2022**, *27*, 1061.
- [204] Z. Qian, X. Wang, Z. Song, H. Zhang, S. Zhou, J. Zhao, H. Wang, "A Phase I Trial to Evaluate the Multiple-Dose Safety and Antitumor Activity of Ursolic Acid Liposomes in Subjects with Advanced Solid Tumors" *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 809714.
- [205] R. W. Brown, J. H. M. Henderson, "The Mass Production and Distribution of HeLa Cells at Tuskegee Institute, 1953-1955" *J. Hist. Med. Allied Sci.* **1983**, *38*, 416-431.
- [206] L. F. F. Crell, "Über eine neue, fast benzoeartige, Substanz der Birken; von Hr'n Lowitz" *Chem. Ann. Freunde Nat., Arzneygelahrtheit Haushalt. Manufakturen* **1788**, *1*, 312-316.
- [207] P. Šíman, A. Filipová, A. Tichá, M. Niang, A. Bezrouk, R. Havelek, "Effective Method of Purification of Betulin from Birch Bark: The Importance of its Purity for Scientific and Medicinal Use" *PLoS One* **2016**, *11*, e0154933.

- [208] S. A. Kuznetsova, B. N. Kuznetsov, G. P. Skvortsova, N. Y. Vasilieva, E. S. Skurydina, G. S. Kalacheva, "Development of the Method of Obtaining Betulin Diacetate and Dipropionate from Birch Bark" *Chem. Sustain. Dev.* **2010**, *18*, 265-272.
- [209] M. M. O'connell, M. D. Bentley, C. S. Campbell, B. J. W. Cole, "Betulin and Lupeol in Bark from Four White-Barked Birches" *Phytochem.* **1988**, *27*, 2175-2176.
- [210] N. Botanicae, H. Agrobotanici, L. Holonec, F. Ranga, D. Crainic, A. Truța, C. Socaciu, "Evaluation of Betulin and Betulinic Acid Content in Birch Bark from Different Forestry Areas of Western Carpathians" *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Na.* **2012**, *40*, 99-105.
- [211] L. F. Tietze, H. Heinzen, P. Moyna, M. Rischer, H. Neunaber, "Synthesis of [13C]- and [2H]Betulin for Biological Transformations" *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *1991*, 1245-1249.
- [212] Y. Liang, M. Zhu, T. Xu, W. Ding, M. Chen, Y. Wang, J. Zheng, "A Novel Betulinic Acid Analogue_ Synthesis, Solubility, Antitumor Activity and Pharmacokinetic Study in Rats" *Molecules* **2023**, *28*, 5715.
- [213] M. N. Gorbunova, G. F. Krainova, I. A. Tolmacheva, V. V. Grishko, "New Polymeric Derivatives of Betulin" *Russ. J. Appl. Chem.* **2012**, *85*, 1137-1141.
- [214] D. Niewolik, K. Krukiewicz, B. Bednarczyk-Cwynar, P. Ruszkowski, K. Jaszcz, "Novel Polymeric Derivatives of Betulin with Anticancer Activity" *RSC Adv.* **2019**, *9*, 20892-20900.
- [215] D. Thibeault, C. Gauthier, J. Legault, J. Bouchard, P. Dufour, A. Pichette, "Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Cytotoxic Germanicane- and Lupane-Type 3 β -O-Monodesmosidic Saponins Starting from Betulin" *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
- [216] Y. Yasin, M. Basri, F. Ahmad, A. B. Salleh, "Response Surface Methodology as a Tool to Study the Lipase-Catalyzed Synthesis of Betulinic Acid Ester" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 694-698.

- [217] M. de L. e Silva, J. P. David, L. C. R. C. Silva, R. A. F. Santos, J. M. David, L. S. Lima, P. S. Reis, R. Fontana, "Bioactive Oleanane, Lupane and Ursane Triterpene Acid Derivatives" *Molecules* **2012**, *17*, 12197-12205.
- [218] J. Sichaem, T. Aree, K. Lugsanangarm, S. Tip-Pyang, "Identification of Highly Potent α -Glucosidase Inhibitory and Antioxidant Constituents from Zizyphus Rurugosa Bark: Enzyme Kinetic and Molecular Docking Studies with Active Metabolites" *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1436-1441.
- [219] B. Krasniqi, A. Stevaert, B. Van Loy, T. Nguyen, J. Thomas, J. Vandeput, D. Jochmans, V. Thiel, R. Dijkman, W. Dehaen, A. Voet, L. Naesens, "Betulonic Acid Derivatives Interfering with Human Coronavirus 229E Replication via the nsp15 Endoribonuclease" *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 5632-5644.
- [220] N. Melnikova, I. Burlova, T. Kiseleva, I. Klabukova, M. Gulenova, A. Kislitsin, V. Vasin, B. Tanaseichuk, "A Practical Synthesis of Betulonic Acid Using Selective Oxidation of Betulin on Aluminium Solid Support" *Molecules* **2012**, *17*, 11849-11863.
- [221] T. Guo, Y. Gao, Z. Li, J. Liu, K. Guo, "Cyclopropenium-Activated DMSO for Swern-Type Oxidation" *Synlett.* **2019**, *30*, 329-332.
- [222] K. Omura, D. Swern, "Oxidation of Alcohols by 'Activated' Dimethyl Sulfoxide. A Preparative, Steric and Mechanistic Study" *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660.
- [223] J. D. Lou, W. X. Lou, "Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds with a New Potassium Permanganate Adsorbed on Kieselguhr Reagent" *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 3697-3699.
- [224] L. F. Fieser, S. Rajagopalan, "Selective Oxidation of Cholic Acid with N-Bromosuccinimide." *Contrib. Chem. Lab. Harv. Univ.* **1949**, *71*, 3935-3938.
- [225] S. O Nwaukwa, P. M. Keehn, "The Oxidation of Alcohols and Ethers Using Calcium Hypochlorite" *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 35-38.
- [226] R. Wang, A. Stevaert, T. N. Truong, Q. Li, B. Krasniqi, B. Van Loy, A. Voet, L. Naesens, W. Dehaen, "Exploration of 1,2,3-Triazolo Fused Triterpenoids as Inhibitors

- of Human Coronavirus 229E Targeting the Viral nsp15 Protein” *Arch. Pharm.* **2024**, 357, e2300442.
- [227] Y. Schmidt, J. K. Lam, H. V. Pham, K. N. Houk, C. D. Vanderwal, “Studies on the Himbert Intramolecular Arene/Allene Diels-Alder Cycloaddition. Mechanistic Studies and Expansion of Scope to All-Carbon Tethers” *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 7339-7348.
- [228] S. Xiao, Q. Wang, L. Si, Y. Shi, H. Wang, F. Yu, Y. Zhang, Y. Li, Y. Zheng, C. Zhang, C. Wang, L. Zhang, D. Zhou, “Synthesis and Anti-HCV Entry Activity Studies of β -Cyclodextrin-Pentacyclic Triterpene Conjugates” *ChemMedChem* **2014**, 9, 1060-1070.
- [229] F. Soler, C. Le Poujade, M. Evers, J.-C. Carry, Y. Hénin, A. Bousseau, T. Huet, R. Pauwels, E. De Clercq, J.-F. Mayaux, J.-B. Le Pecq, N. Dereu, “Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Specific Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry” *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1069-1083.
- [230] D. S. H. L. Kim, J. M. Pezzuto, E. Pisha, “Synthesis of Betulinic Acid Derivatives with Activity Against Human Melanoma” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1707-1714.
- [231] M. Urban, J. Sarek, J. Klinot, G. Korinkova, M. Hajduch, “Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity” *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1100-1105.
- [232] S. G. Van Ornum, R. M. Champeau, R. Pariza, “Ozonolysis Applications in Drug Synthesis” *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2990-3001.
- [233] H. Keul, K. Griesbaum, “Ozonolysis of Olefins Containing Monochloro Substituted Double Bonds” *Can. J. Chem.* **1980**, 58, 2049-2054.
- [234] M. Kahnt, L. Heller, P. Grabandt, A. Al-Harrasi, R. Csuk, “Platanic Acid: A New Scaffold for the Synthesis of Cytotoxic Agents” *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 259-265.
- [235] M. Yoshikawa, T. Morikawa, H. Oominami, H. Matsuda, “Absolute Stereostructures of Olibanumols A, B, C, H, I, and J from Olibanum, Gum-Resin of *Boswellia*

- carterii, and Inhibitors of Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Activated Mouse Peritoneal Macrophages" *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 957-964.
- [236] N. G. Komissarova, A. V. Orlov, O. V. Shitikova, "Synthesis of O-Vinyl Ethers of Pentacyclic Triterpene Alcohols and Lupane-Type Oximes" *Chem. Nat. Compd.* **2020**, *56*, 481-486.
- [237] C. Genet, A. Strehle, C. Schmidt, G. Boudjelal, A. Lobstein, K. Schoonjans, M. Souchet, J. Auwerx, R. Saladin, A. Wagner, "Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, a Novel and Selective TGR5 Agonist, and its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes" *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 178-190.
- [238] N. Iwasawa, T. Kato, K. Narasaka, "A Convenient Method for Dihydroxylation of Olefins by the Combined Use of Osmium Tetroxide and Dihydroxyphenylborane" *Chem. Lett.* **1988**, *17*, 1721-1724.
- [239] D. V. Deubel, G. Frenking, "[3+2] Versus [2+2] Addition of Metal Oxides Across C=C Bonds. Reconciliation of Experiment and Theory" *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 645-651.
- [240] A. M. Kiefer, J. A. Giles, P. A. Shapley, "Synthesis, Structure, and Reactivity of Organometallic Osmium(VI) Hydroxo Compounds" *Organometallics* **2007**, *26*, 1881-1887.
- [241] H. W. Roesky, S. Singh, K. K. M. Yusuff, J. A. Maguire, N. S. Hosmane, "Organometallic Hydroxides of Transition Elements" *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3813-3843.
- [242] J. M. Fraile, J. A. Mayoral, L. Salvatella, "Theoretical Study on the BF₃-Catalyzed Meinwald Rearrangement Reaction" *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5993-5999.
- [243] S. Niwayame, H. Noguchi, M. Ohno, S. Kobayashi, "On the Mechanism of the Meinwald Rearrangement of Electron Deficient Systems" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6656-68.
- [244] B. R. Travis, R. S. Narayan, B. Borhan, "Osmium Tetroxide-Promoted Catalytic Oxidative Cleavage of Olefins: An Organometallic Ozonolysis" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3824-3825.

- [245] S. R. Hart, D. C. Whitehead, B. R. Travis, B. Borhan, "Catalytic Oxidative Cleavage of Olefins Promoted by Osmium Tetroxide and Hydrogen Peroxide" *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 4741-4744.
- [246] M. H. Alamdari, M. Helliwell, M. M. Baradarani, J. A. Joule, "Synthesis of some Cyclooctane-Based Pyrazines and Quinoxalines. Part 2" *Arkivoc* **2008**, 14, 166-179.
- [247] B. P. Pradhan, P. Ghosh, S. Chakraborty, A. Patra, "Oxidation of Triterpenoids: Part X – Oxidation of Lupenyl Acetate and Methylacetylbetulenate with Selenium Dioxide and Hydrogen Peroxide in t-Butanol" *Indian J. Chem.* **1991**, 30, 549-553.
- [248] M. Sate, K. Kawakami, T. Suzuki, H. Morisawa, S. Nishimura, C. Kaneko, "Cycloaditions in Syntheses. XXXVI. 6*Hydroxy-1,2-Dihydrocyclobutan [a] Naphthalene-2-Carboxylic Acid: A New Synthone for A,B-Ring Aromatized Steroids" *Steroids* **1989**, 53, 739-750.
- [249] Y. Liu, L. Li, J. Xie, Q. Zhou, "Divergent Asymmetric Total Synthesis of Mulinane Diterpenoids" *Angew. Chem.* **2017**, 129, 12882-12885.
- [250] A. Amblès, L. Grasset, G. Dupas, J.-C. Jacquesy, "Ester- and Ether Bond Cleavage in Immature Kerogens" *Org. Geochem.* **1996**, 24, 681-690.
- [251] Y. J. You, Y. Kim, N. H. Nam, B. Z. Ahn, "Synthesis and Cytotoxic Activity of A-Ring Modified Betulinic Acid Derivatives" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3137-3140.
- [252] A. Y. Spivak, E. R. Shakurova, D. A. Nedopekina, R. R. Khalitova, L. M. Khalilov, V. N. Odinokov, Y. P. Bel'skii, A. N. Ivanova, N. V. Bel'skaya, M. G. Danilets, A. A. Ligacheva, "Novel Lupane Triterpenoids Containing Allyl Substituents in Ring A: Synthesis and In Vitro Study of Antiinflammatory and Cytotoxic Properties" *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2011**, 60, 680-687.
- [253] P. Camps, X. Pujol, R. A. Rossi, S. Vázquez, "Synthesis of Several 8-Halopentacyclo[6.4.0.0 2,10 .0 3,7 .0 4,9]Dodecane Derivatives" *Synthesis* **1999**, 854-858.
- [254] Z. Liu, J. J. Swidorski, B. Nowicka-Sans, B. Terry, T. Protack, Z. Lin, H. Samanta, S. Zhang, Z. Li, D. D. Parker, S. Rahematpura, S. Jenkins, B. R. Beno, M. Krystal, N. A.

- Meanwell, I. B. Dicker, A. Regueiro-Ren, "C-3 Benzoic Acid Derivatives of C-3 Deoxybetulinic Acid and Deoxybetulin as HIV-1 Maturation Inhibitors" *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1757-1770.
- [255] P. R. Bandi, R. R. Kura, D. K. Gazula Levi, P. R. Adulla, V. Mukkera, "Novel C28-Analogues with C3-Modifications of Triterpene Derivatives as HIV Inhibitors" **2017**, WO 2017/025901 A1.
- [256] J. Baell, M. Congreve, P. Leeson, C. Abad-Zapatero, "Ask the Experts: Past, Present and Future of the Rule of Five." *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 745-752.
- [257] M. Kvasnica, J. Sarek, E. Klinotova, P. Dzubak, M. Hajduch, "Synthesis of Phthalates of Betulinic Acid and Betulin with Cytotoxic Activity" *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3447-3454.
- [258] J. Wiemann, L. Heller, R. Csuk, "Targeting Cancer Cells with Oleanolic and Ursolic Acid Derived Hydroxamates" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 907-909.
- [259] A. Minassi, F. Rogati, C. Cruz, M. E. Prados, N. Galera, C. Jinéñez, G. Appendino, M. L. Bellido, M. A. Calzado, D. Caprioglio, E. Muñoz, "Triterpenoid Hydroxamates as HIF Prolyl Hydrolase Inhibitors" *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 2235-2243.
- [260] V. A. Budevich, S. V. Voitekhovich, A. V. Zuraev, V. E. Matulis, V. E. Matulis, A. S. Lyakhov, L. S. Ivashkevich, O. A. Ivashkevich, "Mesoionic Tetrazolium-5-Aminides: Synthesis, Molecular and Crystal Structures, UV-Vis Spectra, and DFT Calculations" *J. Org. Chem.* **2021**, *17*, 385-395.
- [261] P. A. Wieczorkiewicz, T. M. Krygowski, H. Szatyłowicz, "Substituent Effects and Electron Delocalization in Five-Membered N-Heterocycles" *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2024**, *26*, 19398-19410.
- [262] M. Esmaeilzadeh Khabazi, A. Najafi Chermahini, "DFT Study on Corrosion Inhibition by Tetrazole Derivatives: Investigation of the Substitution Effect" *ACS Omega* **2023**, *8*, 9978-9994.
- [263] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, "A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters" *Chem. Rev.* **1991**, *971*, 165-195.

- [264] E. Scapin, P. R. S. Salbego, C. R. Bender, A. R. Meyer, A. B. Pagliari, T. Orlando, G. C. Zimmer, C. P. Frizzo, H. G. Bonacorso, N. Zanatta, M. A. P. Martins, "Synthesis, Effect of Substituents on the Regiochemistry and Equilibrium Studies of Tetrazolo[1, 5-a]Pyrimidine/2-Azidopyrimidines" *J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 2396-2407.
- [265] A. Mahmood, A. Irfan, "First Principles Investigations of Geometric, Electronic and Optical Properties of 5-Aminotetrazole Derivatives" *J. Comput. Electron.* **2013**, *12*, 437-447.
- [266] Z.-X. Chen, H.-M. Xiao, B.-H. Gao, "Theoretical Study on Tetrazole and its Derivatives (3) MP2 and Thermodynamic Calculations of Amino Derivatives of Tetrazole" *Chin. J. Chem.* **1999**, *17*, 114-124.
- [267] Q. Tang, Y. Liu, T. Li, X. Yang, G. Zheng, H. Chen, L. Jia, J. Shao, "A Novel Co-Drug of Aspirin and Ursolic Acid Interrupts Adhesion, Invasion and Migration of Cancer Cells to Vascular Endothelium via Regulating EMT and EGFR-Mediated Signaling Pathways: Multiple Targets for Cancer Metastasis Prevention and Treatment" *Oncotarget* **2016**, *7*, 73114-73129.
- [268] T. Konoike, K. Takahashi, Y. Araki, I. Horibe, "Practical Partial Synthesis of Myricic Acid A, an Endothelin Receptor Antagonist, from Oleanolic Acid" *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 960-966.
- [269] M. Watanabe, N. Harada, "An Unexpected Selective Formation of a δ -Lactone in the Ozonolysis of a Santonin Derivative: Neighboring Participation of a Methoxycarbonyl Group" *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7372-7374.
- [270] S. K. Rakovsky, M. P. Anachkov, V. I. Iliev, A. E. Eliyas, "Ozone Degradation of Alcohols, Ketones, Ethers and Hydroxybenzenes: Determination of Pathways and Kinetic Parameters" *J. Adv. Oxid. Technol* **2013**, *16*, 31-51.
- [271] S. Rakovsky, M. Anachkov, M. Belitskii, G. Zaikov, "Kinetics and Mechanism of the Ozone Reaction with Alcohols, Ketones, Ethers and Hydroxybenzenes" *Chem. Technol.* **2016**, *10*, 531-551.

- [272] E. Niki, Y. Yamamoto, T. Saito, K. Nagano, S. Yokoi, Y. Kamiya, "Ozonization of Organic Compounds. VII. Carboxylic Acids, Alcohols, and Carbonyl Compounds" *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 223-228.
- [273] S. Miyazaki, Y. Suhara, "Preparation of Carboxylic Acids from Hydroxy Compounds by Oxidation with Ozone" *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1978**, *55*, 536-538.
- [274] K. C. Yuvraj, A. Singh, S. Datta, R. Das, P. R. Saxena, S. Chapagain, T. J. Nitz, C. Wild, R. Gaur, "C-28 Linker Length Modulates the Activity of Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitors" *Virol. J.* **2025**, *22*:20.
- [275] J. Wei, A. M. Hui, "The Paradigm Shift in Treatment from Covid-19 to Oncology with mRNA Vaccines" *Cancer Treat. Rev.* **2022**, *107*, 1-15.
- [276] E. Oláh, "Learning from Cancer to Address COVID-19" *Biol. Futur.* **2023**, *74*, 29-43.
- [277] J. C. Hunter, A. Manandhar, M. A. Carrasco, D. Gurbani, S. Gondi, K. D. Westover, "Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations" *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 1325-1335.
- [278] E. Lilly, S. Markossian, A. Grossman, H. Baskir, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, K. Brimacombe, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, S. Grotegut, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, M. Lal-Nag, Z. Li, J. R. Manro, J. McGee, A. Norvil, M. Pearson, T. Riss, P. Saradjian, G. Sitta Sittampalam, M. A. Tarselli, O. Joseph Trask, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, Menghang Xia, X. Xu, „Assay Guidance Manual“ *Nat. Cent. Adv. Transl. Sci.*, **2013**.
- [279] D. Kessler, A. Gollner, M. Gmachl, A. Mantoulidis, L. J. Martin, A. Zoephel, M. Mayer, D. Covini, S. Fischer, T. Gerstberger, T. Gmaschitz, C. Goodwin, P. Greb, D. Häring, W. Hela, J. Hoffmann, J. Karolyi-Oezguer, P. Knesl, S. Kornigg, M. Koegl, R. Kousek, L. Lamarre, F. Moser, S. Munico-Martinez, C. Peinsipp, J. Phan, J. Rinnenthal, J. Sai, C. Salamon, Y. Scherbantin, K. Schipany, R. Schnitzer, A. Schrenk, B. Sharps, G. Sizler, Q. Sun, A. Waterson, B. Wolkerstorfer, M. Zeeb, M. Pearson, S. W. Fesik, D. B. McConnell, "Reply to Tran et al.: Dimeric KRAS Protein-Protein Interaction Stabilizers" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2020**, *117*, 3365-3367.

- [280] F. Canyelles i Font, K. Żukowski, M. A. Khan, D. Kwiatek, J. L. Kolanowski, “Interference of Metal Ions on the Bioluminescent Signal of Firefly, Renilla, and Nano-Luc Luciferases in High-Throughput Screening Assays” *Front. Chem.* **2024**, *12*, 1436389.
- [281] A. Braeuning, S. Vetter, “The Nuclear Factor κ B Inhibitor (E)-2-Fluoro-4'-Methoxystilbene Inhibits Firefly Luciferase” *Biosci. Rep.* **2012**, *32*, 531-537.
- [282] W. Liu, S. Li, Z. Qu, Y. Luo, R. Chen, S. Wei, X. Yang, Q. Wang, “Betulinic Acid Induces Autophagy-Mediated Apoptosis through Suppression of the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Inhibits Hepatocellular Carcinoma” *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 6952-6964.
- [283] R. Majeed, A. Hamid, P. L. Sangwan, P. K. Chinthakindi, S. Koul, S. Rayees, G. Singh, D. M. Mondhe, M. J. Mintoo, S. K. Singh, S. K. Rath, A. K. Saxena, “Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway by a Novel Naphthol Derivative of Betulinic Acid Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Cancer Cells of Different Origin” *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1459.
- [284] M. Holderfield, B. J. Lee, J. Jiang, A. Tomlinson, K. J. Seamon, A. Mira, E. Patrucco, G. Goodhart, J. Dilly, Y. Gindin, N. Dinglasan, Y. Wang, L. P. Lai, S. Cai, L. Jiang, N. Nasholm, N. Shifrin, C. Blaj, H. Shah, J. W. Evans, N. Montazer, O. Lai, J. Shi, E. Ahler, E. Quintana, S. Chang, A. Salvador, A. Marquez, J. Cregg, Y. Liu, A. Milin, A. Chen, T. B. Ziv, D. Parsons, J. E. Knox, J. E. Klomp, J. Roth, M. Rees, M. Ronan, A. Cuevas-Navarro, F. Hu, P. Lito, D. Santamaria, A. J. Aguirre, A. M. Waters, C. J. Der, C. Ambrogio, Z. Wang, A. L. Gill, E. S. Koltun, J. A. M. Smith, D. Wildes, M. Singh, “Concurrent Inhibition of Oncogenic and Wild-Type RAS-GTP for Cancer Therapy” *Nature* **2024**, *629*, 919-926.
- [285] G. E. Benary, F. Kilgenstein, S. Koller, J. Scherkenbeck, “Monophthalates of Betulinic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes Inhibit Efficiently the SOS-Mediated Nucleotide Exchange and Impact PI3K/AKT Signaling in Oncogenic K-RAS4B Proteins” *RSC Adv.* **2025**, *15*, 883-895.
- [286] J. D. Vasta, D. M. Peacock, Q. Zheng, J. A. Walker, Z. Zhang, C. A. Zimprich, M. R. Thomas, M. T. Beck, B. F. Binkowski, C. R. Corona, M. B. Robers, K. M. Shokat,

- “KRAS is Vulnerable to Reversible Switch-II Pocket Engagement in Cells” *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*, 596-604.
- [287] Promega Corporation, “*NanoBRET[®] TE Intracellular RAS Assay*” Madison, WI, USA, **2024**.
- [288] J. J. G. Winter, M. Anderson, K. Blades, C. Brassington, A. L. Breeze, C. Chresta, K. Embrey, G. Fairley, P. Faulder, M. R. V. Finlay, J. G. Kettle, T. Nowak, R. Overman, S. J. Patel, P. Perkins, L. Spadola, J. Tart, J. A. Tucker, G. Wrigley, “Small Molecule Binding Sites on the Ras:SOS Complex can be Exploited for Inhibition of Ras Activation” *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2265-2274.
- [289] M. C. Burns, Q. Sun, R. N. Daniels, D. Camper, J. P. Kennedy, J. Phan, E. T. Olejniczak, T. Lee, A. G. Waterson, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, “Approach for Targeting Ras with Small Molecules that Activate SOS-Mediated Nucleotide Exchange” *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2014**, *111*, 3401-3406.
- [290] Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, “Discovery of Small Molecules that Bind to K-Ras and Inhibit Sos-Mediated Activation” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140-6143.
- [291] T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang, G. Fang, “Small-Molecule Ligands Bind to a Distinct Pocket in Ras and Inhibit SOS-Mediated Nucleotide Exchange Activity.” *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2012**, *109*, 5299-5304.
- [292] R. C. Hillig, B. Sautier, J. Schroeder, D. Moosmayer, A. Hilpmann, C. M. Stegmann, N. D. Werbeck, H. Briem, U. Boemer, J. Weiske, V. Badock, J. Mastouri, K. Petersen, G. Siemeister, J. D. Kahmann, D. Wegener, N. Böhnke, K. Eis, K. Graham, L. Wortmann, F. Von Nussbaum, B. Bader, “Discovery of potent SOS1 inhibitors that block RAS activation via disruption of the RAS–SOS1 interaction” *PNAS* **2019**, *116*, 2551–2560.

- [293] Z. Sarica, O. Kurkcuoglu, F. A. Sungur, "In Silico Identification of Putative Allosteric Pockets and Inhibitors for the KRASG13D-SOS1 Complex in Cancer Therapy" *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 3293.
- [294] J. Li-Hui, L. An-Chang, M. Zong-E, C. Yun-Feng, "Magnetostuctural Correlation Study of a Novel Strong Antiferromagnetic Dimer Copper(II) Coordination Complex with Mono-Methyl Phthalate" *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2011**, *27*, 1595-1599.
- [295] S. Parthasarathy, S. Ambujavalli, "Thermodynamics of Ionic Interactions in Aqueous Solutions-IV. Stability of Magnesium Phthalate" *Electrochim. Acta* **1975**, *20*, 611-614.
- [296] D. Zhan, X. Zhou, Y. Zhang, J. Hong, K. Zhang, "Rheology Phase Reaction Synthesis and Thermal Decomposition of Magnesium Phthalate Dihydrate" *Thermochim. Acta* **2005**, *428*, 47-50.
- [297] W. L. Driessen, P. L. A. Everstijn, "Dimethyl Phthalate, a Neutral Bidentate Oxygen-Donor Ligand to Divalent Metal Ions" *Z. Naturforsch.* **1977**, *32b*, 1284-1286.
- [298] H. Matsuda, "Synthesis of Polymers by Using Divalent Metal Salts of Mono(hydroxyethyl)phthalate: Metal-Containing Unsaturated Polyesters" *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **1975**, *9*, 397-414.
- [299] B. M. Kariuki, W. Jones, "The Solid State Chemistry and Polymorphism of Aquomagnesium Hydrogen Phthalates" *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A, Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1992**, *211*, 233-255.
- [300] S. Alvarez, "A Cartography of the van der Waals Territories" *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 8617-8636.
- [301] P. B. Foreman, A. B. Lees, P. K. Rol, "Repulsive Potentials for the Interaction of Oxygen Atoms with the Noble Gases and Atmospheric Molecules" *Chem. Phys.* **1976**, *12*, 213-224.
- [302] M. Mantina, A. C. Chamberlin, R. Valero, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, "Consistent van der Waals Radii for the Whole Main Group" *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 5806-5812.

- [303] P. Ann Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "The Structural Basis of the Activation of Ras by Sos" *Nature* **1998**, *394*, 337-343.
- [304] G. Buhrman, G. Holzapfel, S. Fetics, C. Mattos, "Allosteric Modulation of Ras Positions Q61 for a Direct Role in Catalysis" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2010**, *107*, 4931-4936.
- [305] S. Corbalan-Garcia, S. M. Margarit, D. Galron, S.-S. Yang, D. Bar-Sagi, "Regulation of Sos Activity by Intramolecular Interactions" *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 880-886.
- [306] J.-H. Kim, M. Shirouzu, T. Kataoka, D. Bowtell, S. Yokoyama, "Activation of Ras and its Downstream Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases by the CDC25 Homology Domain of Mouse Son-of-Sevenless 1 (mSos1)" *Oncogene* **1998**, *16*, 2597-2607.
- [307] X. Qian, W. C. Vass, A. G. Papageorge, P. H. Anborgh, D. R. Lowy, "N Terminus of Sos1 Ras Exchange Factor: Critical Roles for the Dbl and Pleckstrin Homology Domains" *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 771-778.
- [308] H. Sondermann, B. Nagar, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "Computational Docking and Solution X-Ray Scattering Predict a Membrane-Interacting Role for the Histone Domain of the Ras Activator Son of Sevenless" *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.* **2005**, *102*, 16632-16637.
- [309] J. Gureasko, W. J. Galush, S. Boykevisch, H. Sondermann, D. Bar-Sagi, J. T. Groves, J. Kuriyan, "Membrane-Dependent Signal Integration by the Ras Activator Son of Sevenless" *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 452-461.
- [310] E. S. Leshchiner, A. Parkhitko, G. H. Bird, J. Luccarelli, J. A. Bellairs, S. Escudero, K. Opoku-Nsiah, M. Godes, N. Perrimon, L. D. Walensky, "Direct inhibition of oncogenic KRAS by hydrocarbon-stapled SOS1 helices" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 1761-1766.
- [311] D. K. Menyhárd, G. Pálffy, Z. Orgován, I. Vida, G. M. Keserű, A. Perczel, "Structural Impact of GTP Binding on Downstream KRAS Signaling" *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 9272-9289.

- [312] J. Chen, J. Wang, W. Yang, L. Zhao, J. Zhao, G. Hu, “Molecular Mechanism of Phosphorylation-Mediated Impacts on the Conformation Dynamics of GTP-Bound KRAS Probed by GaMD Trajectory-Based Deep Learning” *Molecules* **2024**, *29*, 2317.
- [313] T. Gebregiworgis, Y. Kano, J. St-Germain, N. Radulovich, M. L. Udaskin, A. Menten, R. Huang, B. P. K. Poon, W. He, I. Valencia-Sama, C. M. Robinson, M. Huestis, J. Miao, J. J. Yeh, Z. Y. Zhang, M. S. Irwin, J. E. Lee, M. S. Tsao, B. Raught, C. B. Marshall, M. Ohh, M. Ikura, “The Q61H Mutation Decouples KRAS from Upstream Regulation and Renders Cancer Cells Resistant to SHP2 Inhibitors” *Nat. Commun.* **2021**, *12*:6274.
- [314] K. Bhadhadhara, V. Jani, S. Koulgi, U. Sonavane, R. Joshi, “Studying Early Structural Changes in SOS1 Mediated KRAS Activation Mechanism” *Curr. Res. Struct. Biol.* **2024**, *7*, 100115.
- [315] U. Vo, N. Vajpai, L. Flavell, R. Bobby, A. L. Breeze, K. J. Embrey, A. P. Golovanov, “Monitoring Ras Interactions with the Nucleotide Exchange Factor Son of Sevenless (Sos) Using Site-Specific NMR Reporter Signals and Intrinsic Fluorescence” *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 1703-1718.
- [316] B. Fischer, T. Uchański, A. Sheryazdanova, S. Gonzalez, A. N. Volkov, E. Brosens, T. Zögg, V. Kalichuk, S. Ballet, W. Versées, A. A. Sablina, E. Pardon, A. Wohlkönig, J. Steyaert, “Allosteric Nanobodies to Study the Interactions Between SOS1 and RAS” *Nat. Commun.* **2024**, *15*:6214.
- [317] M. P. Pollastri, “Overview on the Rule of Five” *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2010**, *Chapter 9*, 9.12.1-9.12.8.
- [318] Z. Zhao, Y. Yuan, S. Li, X. Wang, X. Yang, “Natural Compounds from Herbs and Nutraceuticals as Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors in Alzheimer’s Disease Treatment” *CNS Neurosci. Ther.* **2024**, *30*, e14885.
- [319] C. Tapia-Rojas, A. Schüller, C. B. Lindsay, R. C. Ureta, C. Mejías-Reyes, J. Hancke, F. Melo, N. C. Inestrosa, “Andrographolide Activates the Canonical Wnt Signalling Pathway by a Mechanism that Implicates the non-ATP Competitive Inhibition of GSK-3 β : Autoregulation of GSK-3 β In Vivo” *Biochem. J.* **2015**, *466*, 415-430.

- [320] J. Wang, X. Fei Tan, V. Sang Nguyen, P. Yang, J. Zhou, M. Gao, Z. Li, T. Kwang Lim, Y. He, C. Sun Ong, Y. Lay, J. Zhang, G. Zhu, S.-L. Lai, D. Ghosh, Y. Keung Mok, H.-M. Shen, Q. Lin, "A Quantitative Chemical Proteomics Approach to Profile the Specific Cellular Targets of Andrographolide, a Promising Anticancer Agent That Suppresses Tumor Metastasis" *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 876-886.
- [321] K. Sa-Ngiamsumtorn, A. Suksatu, Y. Pewkliang, P. Thongsri, P. Kanjanasirirat, S. Manopwisedjaroen, S. Charoensutthivarakul, P. Wongtrakoongate, S. Pitiporn, J. Chaopreecha, S. Kongsomros, K. Jearawuttanakul, W. Wannalo, P. Khemawoot, S. Chutipongtanate, S. Borwornpinyo, A. Thitithanyanont, S. Hongeng, "Anti-SARS-CoV-2 Activity of Andrographis Paniculata Extract and its Major Component Andrographolide in Human Lung Epithelial Cells and Cytotoxicity Evaluation in Major Organ Cell Representatives" *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1261-1270.
- [322] M. T. W. Cheung, R. Ramalingam, K. K. K. Lau, M. W. L. Chiang, S. K. Chiu, H. Y. Cheung, Y. W. Lam, "Cell Type-Dependent Effects of Andrographolide on Human Cancer Cell Lines" *Life Sci.* **2012**, *91*, 751-760.
- [323] Y. Sharifuddin, E. M. Parry, J. M. Parry, "The Genotoxicity and Cytotoxicity Assessments of Andrographolide In Vitro" *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 1393-1398.
- [324] J. Li, H. Y. Cheung, Z. Zhang, G. K. L. Chan, W. F. Fong, "Andrographolide Induces Cell Cycle Arrest at G2/M Phase and Cell Death in HepG2 Cells via Alteration of Reactive Oxygen Species" *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 31-44.
- [325] R. P. Hanzlik, "Selective Epoxidation of Terminal Double Bonds: 10,11-Epoxyfarnesyl Acetate" *Org. Synth.* **1977**, *56*, 112.
- [326] J. Justicia, A. Rosales, E. Bañuel, J. L. Oller-López, M. Valdivia, A. Haïdour, J. E. Oltra, A. F. Barrero, D. J. Cárdenas, J. M. Cuerva, "Titanocene-Catalyzed Cascade Cyclization of Epoxypolyprenes: Straightforward Synthesis of Terpenoids by Free-Radical Chemistry" *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1778-1788.
- [327] M. P. Polovinka, D. V Korchagina, Y. V Gatilov, I. Yu Bagrianskaya, V. A. Barkhash, V. V Shcherbukhin, N. S. Zefirov ND Zelinsky, V. B. Perutskii, N. D. Ungur, F. Vlad, "Cyclization and Rearrangements of Farnesol and Nerolidol Stereoisomers in Superacids" *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1509-1517.

- [328] G. Vidari, S. Beszant, J. El Merabet, M. Bovolenta, G. Zanoni, "FeCl₃ and ZrCl₄ Regiochemically Controlled Biomimetic-Like Cyclizations of Simple Isoprenoid Epoxylefins" *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2687-2690.
- [329] T.-I. Hsu, Y.-J. Chen, C.-Y. Hung, Y.-C. Wang, S.-J. Lin, W.-C. Su, M.-D. Lai, S.-Y. Kim, Q. Wang, K. Qian, M. Goto, Y. Zhao, Y. Kashiwada, K.-H. Lee, W.-C. Chang, J.-J. Hung, "A Novel Derivative of Betulinic Acid, SYK023, Suppresses Lung Cancer Growth and Malignancy" *Oncotarget* **2015**, 6, 13671-13687.
- [330] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist" *Organometallics* **2010**, 29, 2176-2179.
- [331] M. N. Gorbunova, G. F. Krainova, I. A. Tolmacheva, V. V. Grishko, "New Polymeric Derivatives of Betulin" *Russ. J. Appl. Chem.* **2012**, 85, 1137-1141.
- [332] M. Kahnt, L. Fischer, A. Al-Harrasi, R. Csuk, "Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents" *Molecules* **2018**, 23, 1-19.
- [333] K. M. Debatin, S. Fulda, M. Wiessler, M. Los, W. Mier, "Betulinic Acid and Derivatives Thereof Useful for the Treatment of Neuroectodermal Tumors" **1998**, WO 00/24762.
- [334] A. Regueiro-Ren, Z. Liu, Y. Chen, N. Sin, S. Y. Sit, J. J. Swidorski, J. Chen, B. L. Venables, J. Zhu, B. Nowicka-Sans, T. Protack, Z. Lin, B. Terry, H. Samanta, S. Zhang, Z. Li, B. R. Beno, X. S. Huang, S. Rahematpura, D. D. Parker, R. Haskell, S. Jenkins, K. S. Santone, M. I. Cockett, M. Krystal, N. A. Meanwell, U. Hanumegowda, I. B. Dicker, "Discovery of BMS-955176, a Second Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Broad Spectrum Antiviral Activity" *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 568-572.
- [335] X. Y. Wang, S. Y. Zhang, J. Li, H. N. Liu, X. Xie, F. J. Nan, "Highly Lipophilic 3-Epi-Betulinic Acid Derivatives as Potent and Selective TGR5 Agonists with Improved Cellular Efficacy" *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, 35, 1463-1472.

- [336] A. S. Leal, R. Wang, J. A. R. Salvador, Y. Jing, "Semisynthetic Ursolic Acid Fluoro-lactone Derivatives Inhibit Growth with Induction of p21waf1 and Induce Apoptosis with Upregulation of NOXA and Downregulation of c-FLIP in Cancer Cells" *ChemMedChem* **2012**, 7, 1635-1646.
- [337] S. M. Kim, I. H. Jeong, M. S. Yim, M. K. Chae, H. N. Kim, D. K. Kim, C. M. Kang, Y. S. Choe, C. Lee, E. K. Ryu, "Characterization of Oleanolic Acid Derivative for Colon Cancer Targeting with Positron Emission Tomography" *J. Drug Target.* **2014**, 22, 191-199.
- [338] N. Kratena, M. Kaiser, K. Naumov, M. Waxmann, P. Gaertner, "Bioinspired Synthesis of Alstoscholarinoids A and B" *J. Am. Chem. Soc. Au* **2025**, 5, 1076-1082.