



RĪGAS TEHNISKĀ
UNIVERSITĀTE

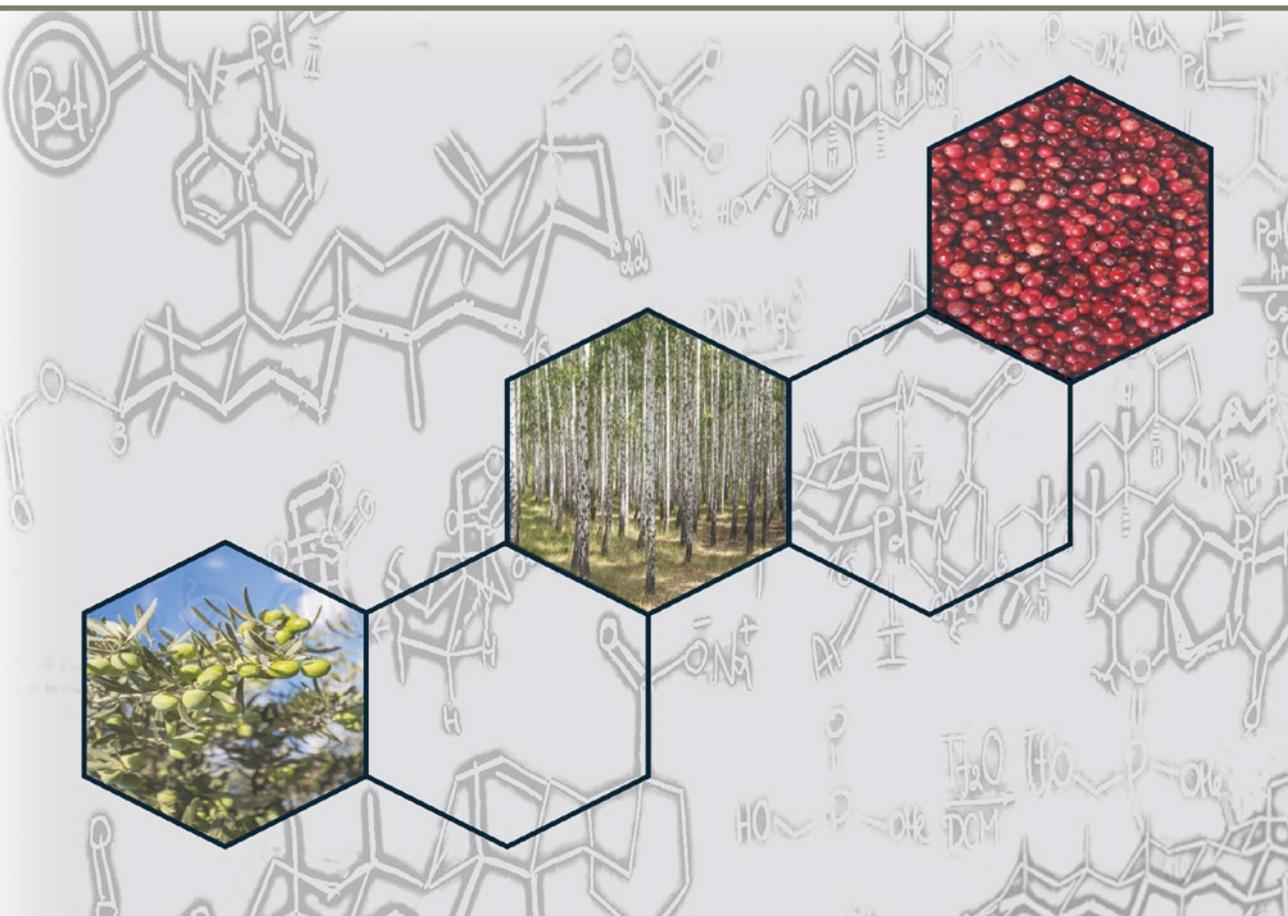
Vladislavs Kroškins

PENTACIKLISKO TRITERPENOĪDU C-H FUNKCIONALIZĒŠANA UN ŪDENĪ ŠĶĪSTOŠU ATVASINĀJUMU SINTĒZE

Promocijas darba kopsavilkums

C-H FUNCTIONALIZATION AND SYNTHESIS OF WATER-SOLUBLE PENTACYCLIC TRITERPENOIDS

Summary of the Doctoral Thesis



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte

Ķīmijas un ķīmijas tehnoloģijas institūts

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Faculty of Natural Sciences and Technology

Institute of Chemistry and Chemical Technology

Vladislavs Kroškins

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorants
Doctoral Student of the study Programme “Chemistry, Materials Science and Engineering”

**PENTACIKLISKO TRITERPENŌĪDU C-H
FUNKCIONALIZĒŠANA UN ŪDENĪ ŠĶĪSTOŠU
ATVASINĀJUMU SINTĒZE**

Promocijas darba kopsavilkums

**C-H FUNCTIONALIZATION AND SYNTHESIS OF
WATER-SOLUBLE PENTACYCLIC
TRITERPENOIDS**

Summary of the Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs / Scientific supervisor

Profesors *Dr. chem.* / Professor Dr. chem.

MĀRIS TURKS

RTU Izdevniecība / RTU Press

Rīga 2025 / Riga 2025

Kroškins, V. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H funkcionalizēšana un ūdenī šķīstošu atvasinājumu sintēze. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2025. – 91 lpp.

Kroškins, V. C-H Functionalization and Synthesis of Water-Soluble Pentacyclic Triterpenoids. Summary of the Doctoral Thesis. Riga: RTU Press, 2025. – 91 p.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-01” 2025. gada 28. augusta lēmumu, protokols Nr. 04030-9.1/71.

Published in accordance with the decision of the Promotion Council “RTU P-01” of 28 August 2025, Minutes No. 04030-9.1/71.

Vāka attēla autors – Vladislavs Kroškins, izmantot attēlus no www.shutterstock.com.
Cover design by Vladislavs Kroškins, using images from www.shutterstock.com.

<https://doi.org/10.7250/9789934372209>
ISBN 978-9934-37-220-9 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2025. gada 13. novembrī Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Laboratorijas vadītājs, vadošais pētnieks *Dr. chem.* Mārtiņš Katkevičs,

Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija

Asociētais profesors *Dr. chem.* Artis Kinēns,

Latvijas Universitāte, Latvija

Profesors *Dr.* Zbigniew Pakulski,

Polijas Zinātņu akadēmijas Organiskās ķīmijas institūts, Polija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Vladislavs Kroškins

(paraksts)

Datums

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienotu zinātnisko publikāciju kopa ar kopsavilkumu latviešu un angļu valodā. Promocijas darbs apkopo trīs oriģinālpublikācijas *SCI* žurnālos, vienu apskatrakstu, vienu patentu un nepublicētus rezultātus.

SATURS/CONTENTS

Lietoto saīsinājumu saraksts	5
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	6
Tēmas aktualitāte	6
Pētījuma mērķi un uzdevumi	9
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti	9
Darba struktūra un apjoms	10
Darba aprobācija un publikācijas	10
GALVENIE PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI.....	13
1. Jonogēno pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu sintēze un pielietojums	13
2. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H funkcionalizēšana.....	22
2.1. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H (het)arilēšana un azetidīnēšana	28
2.2. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H aminēšana.....	35
SECINĀJUMI	42
Pateicības.....	45
LIST OF ABBREVIATIONS	47
GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS	48
Introduction	48
Aims and objectives	51
Structure and volume of the Thesis.....	52
Publications and approbation of the Thesis	52
MAIN RESULTS OF THE THESIS	55
1. Synthesis and application of ionogenic pentacyclic triterpenoid phosphonates	55
2. C-H activation of pentacyclic triterpenoids	64
2.1. C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids	70
2.2. C-H amination of pentacyclic triterpenoids	77
CONCLUSIONS.....	84
ACKNOWLEDGEMENTS	87
IZMANTOTĀ LITERATŪRA/REFERENCES.....	88

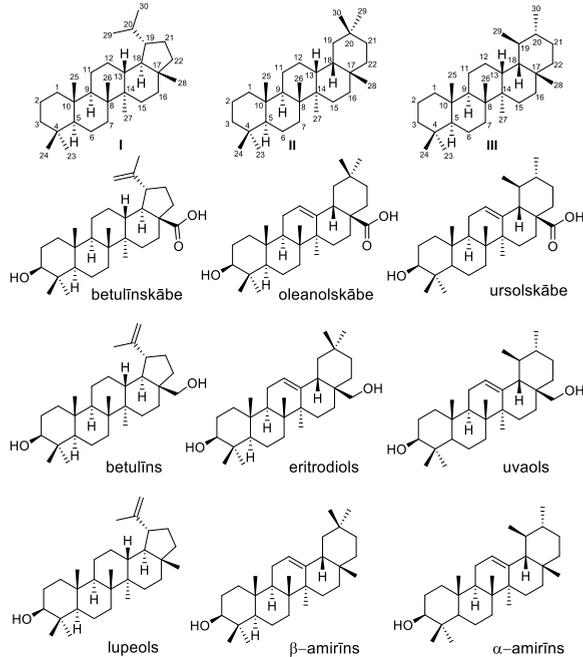
LIETOTO SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

Ac	acetil-	HFIP	heksafluor-2-propanols
<i>t</i> -Am	<i>t</i> -amil-	IT	istabas temperatūra
Ar	aril-	LDA	litija diizopropilamīds
Bn	benzil-	Nbe	norbornēns
Boc	<i>t</i> -butoksikarbonil-	NMP	<i>N</i> -metil-2-pirolidons
brsm	balstoties uz atgūto izejvielu	KMR	kodolu magnētiskā rezonanse
BQ	benzohinons	OP	oksidējošā pievienošanās
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -butil-	Pc	ftalocianīns
Cbz	benziloksikarbonil-	PCC	piridīnija hlrohromāts
CMD	saskaņotā metalēšana	PCT	pentacikliskais triterpenoīds
deprotonēšana		pfb	perfluorbutirāts
cod	ciklooktadiēns	PG	aizsarggrupa
Cp	ciklopentadienil-	Ph	fenil-
DCM	dihlormetāns	phe	fenilalanīns
DCE	dihloretāns	PIDA	(diacetoksijod)benzols
DG	virzošā grupa	Piv	pivaloil-
DMAP	4-dimetilaminopiridīns	phen	fenantrolīns
DMSO	dimetilsulfoksīds	Phs	fenilsulfamoil-
DIBAL-H	diizobutilalumīnija hidrīds	PMB	4-metoksibenzil-
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamīds	PPTS	piridīnija p-tollilsulfonāts
EAG	elektronakceptora grupa	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -propil-
EDG	elektrononora grupa	Py	piridīns
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe	RE	reducējošā eliminēšanās
Esp	$\alpha, \alpha, \alpha', \alpha'$ -tetrametil-1,3-	Tf	trifluormetānsulfonil-
benzoldipropionskābe		TFA	trifluoretiķskābe
Eq	ekvivalents	THF	tetrahidrofurāns
h	stunda	TM	pārejas metāls
HAT	ūdeņraža atoma pārnese	TMS	trimetilsilil-
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronija heksafluorfosfāts	Troc	2,2,2-trihloretoksikarbonil-

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Pentacikliskie triterpenoīdi (PCT) ir plaši izplatīta sekundāro metabolītu grupa, kam piemīt plašs bioloģisko īpašību klāsts.^{1, 2, 3, 4} PCT var iedalīt trīs galvenajās klasēs: lupāna tipa terpenoīdi **I** (betulīnskābe, betulīns un lupeols), oleanāna tipa terpenoīdi **II** (oleanolskābe, eritrodiols un β -amirīns) un ursāna tipa terpenoīdi **III** (ursolskābe, uvaols un α -amirīns) (1. att.).⁵



1. attēls. Lupāna **I**, oleanāna **II** un ursāna **III** klašu pentaciklisko triterpenoīdu izplatītākie pārstāvji.

Aptuveni ceturtda daļa no mūsdienu zāļvielām ir dabasvielas vai to pussintētiskie atvasinājumi. Savukārt pretvēža un pretinfekcijas terapijas jomā dabasvielas, dabasvielu atvasinājumi, kā arī dabasvielu mimētiķi un savienojumi ar dabasvielu tipa farmakoforiem kopā aizņem pat vairāk nekā pusi no pēdējos 40 gados radītajām zālēm.⁶ Pazemināts toksicitātes profils normālās⁷ šūnās apvienojumā ar plašu pieejamību dabā un relatīvi vienkāršu izdalīšanas procesu ir veicinājis PCT un to pussintētisko atvasinājumu kā iespējamu zāļvielu izpēti. To vidū daudzsološākie PCT lietojumi ir pretvēža un pretvīrusu zāļu jomās.^{8, 9, 10, 11, 12} Citas PCT un to sintētisko atvasinājumu lietošanas jomas ietver arī antibakteriālu¹³ un pretvēža¹⁴ līdzekļu izstrādi, kā arī pret diabētu¹⁵ un pretiekaisuma¹⁶ zāļu meklējumus.

Papildus medicīniskajiem lietojumiem PCT var veiksmīgi izmantot arī kosmetoloģijā. Kosmētikas nozarē bērza tāss ekstrakts ir atzīts par vērtīgu dabasvielu maisījumu. Plašu betulīnu saturošu produktu klāstu var atrast pazīstamu zīmolu produkcijā gan ādas, gan matu kopšanai. Vairāki pētījumi ir pierādījuši betulīna un tā atvasinājumu spēju dziedēt apdegumus un citas ādas brūces.¹⁷ Turklāt, pateicoties labvēlīgai betulīna ietekmei uz kolagēna ražošanu, betulīns un to saturoši produkti tiek izmantoti gan ikdienas ādas kopšanas krēmos, gan pretcelulīta līdzekļos.^{18, 19}

Pentaciklisko triterpenoīdu unikālie molekulārie karkasi, kam piemīt augsts bioloģiskais potenciāls, rada ievērojamas sintētiskas problēmas. Stabīlā policikliskā arhitektūra un augstā C-H saišu piesātinājuma pakāpe bieži ierobežo dažādu ķīmisko transformāciju lietojumu. Tradicionāli derivatizācijas pētījumi ir balstīti reaģētspējīgās perifērijā esošās funkcionālajās grupās, kas ir spirta un karbonskābes funkcionalitātes pie C(3) un C(28), kā arī betulīna gadījumā dubultsaite C(20)=C(29) un alilpozīcija pie C(30).²⁰ Lai gan iegūtās modifikācijas ir devušas daudzus vērtīgus atvasinājumus, tās izmanto tikai mazu daļu no visa molekulārā karkasa, atstājot lielāko daļu no oglekļa skeleta plašā potenciāla praktiski neizmantotu.

Pēdējās desmitgadēs pārejas metālu katalizētu C-H funkcionalizēšanas metožu attīstība ir pavērusi jaunas iespējas inerti C(sp³)-H saišu tiešai un selektīvai transformācijai.²¹ Šī stratēģija piedāvā iespēju iegūt jaunus atvasinājumus no neaktivētām C(sp³)-H sistēmām, tādējādi nodrošinot efektīvu vēliņo funkcionalizēšanu. Neskatoties uz šo metožu plašo lietojumu citās sarežģītās molekulārās sistēmās, C-H funkcionalizēšanas izmantošanas piemēri triterpenoīdu ķīmijā ir bijuši pārsteidzoši ierobežotā daudzumā. Taču tieši sarežģītās dabasvielas kalpo kā ideāli modeļi, lai demonstrētu sintētisko metodoloģiju vispārīgumu un efektivitāti, pateicoties to strukturālajai daudzveidībai un funkcionālajai sarežģītībai. PCT molekulas var kalpot kā testa platforma, kas ļauj izvērtēt C(sp³)-H funkcionalizēšanas metožu selektivitāti, pielāgojamību un potenciālu lietojumu plašākā bioloģiski nozīmīgu savienojumu klāstā.

Promocijas darbs apkopo pētījumus, kuru mērķis ir paplašināt PCT molekulāro karkasu funkcionalizēšanas iespējas, izmantojot inovatīvas C-H funkcionalizācijas stratēģijas un heteroatomu saturošu funkcionalitāšu stratēģisku ieviešanu PCT struktūrās (2. att.). Darba gaitā ir izstrādātas un optimizētas divas galvenās katalītiskās metodes – palādijs katalizēta C-H arilēšana/azetidīnēšana un rodija katalizēta C-H aminēšana iepriekš neapskatītu pozīciju aktivēšanai triterpenoīdu policikliskajās struktūrās.

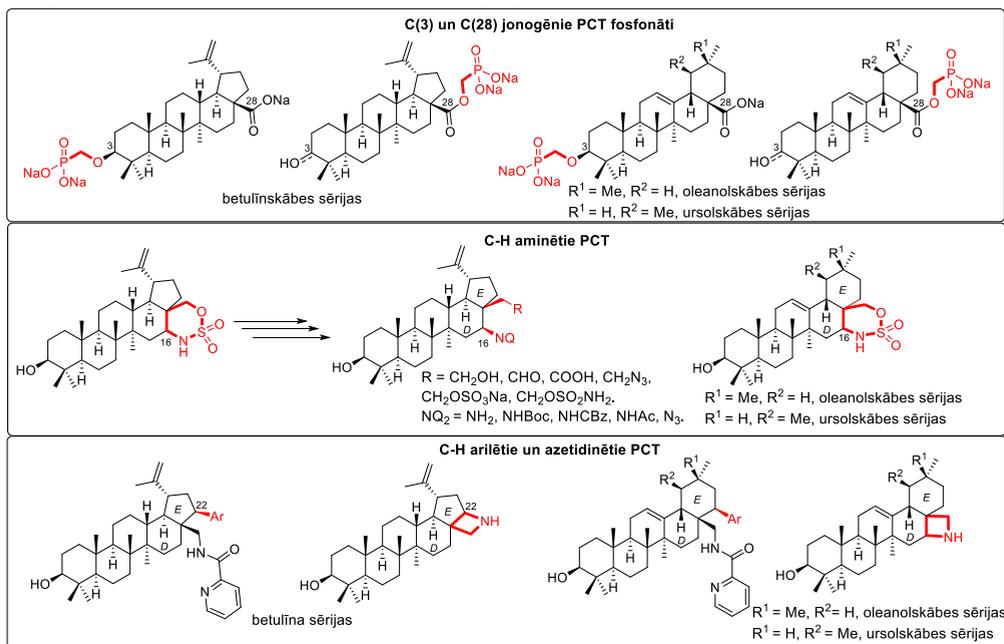
Pirmā izstrādātā pieeja ietver palādijs katalizētu triterpenoīdu pikolīnamīdu C(sp³)-H arilēšanu un azetidīnēšanu. Šeit pikolīnamīda virzošā grupa, kas piesaistīta pie konformacionāli elastīga C(28) linkera, ļāva veikt reģioselektīvu arilēšanu pie C(22). Savukārt reakcijās ar elektrondefīcītiem jodarēniem tika iegūti annelēti pentaciklisko triterpenoīdu-azetidīna analogi. PCT C-H arilēšanas protokols būtiski paplašina PCT ķīmisko daudzveidību un ievieš jaunu slāpekli saturošu atvasinājumu, kuru bioloģisko aktivitāšu profils tiks pētīts nākotnē, klasi.

Otrā izstrādātā pieeja ietver rodija katalizētu betulīna sulfamāta esteru iekšmolekulāru C-H aminēšanu, kas dod triterpenoīdu-1,2,3-oksatiazināna konjugātus ar augstu reģioselektivitāti C(16) pozīcijā. Virzošās grupas ievadīšana pie C(28) dod iespēju piekļūt reaģētspējīgam starpproduktam

pie tuvumā esošās neaktivētās metilēngrupas, ļaujot kontrolēti veidoties jaunai C-N saitei. Iegūtie produkti pēc tam tika pārveidoti par 16-amino- un 16-azidoatvasinājumiem, kas ir unikāli, sintētiski vērtīgi atvasinājumi PCT ķīmijā. Secīgas C-H funkcionalizēšanas iespēja pie betulīna C(22) vēl vairāk izceļ šīs metodes potenciālu PCT molekulārā skeleta dekorēšanai.

Papildus minētajām C-H funkcionalizēšanas stratēģijām tika veikti pētījumi, kas koncentrējās uz PCT šķīdības uzlabošanu, ievadot jonogēnās fosfonātu grupas (2. att.). Ievadot metilēnfosfonātus pie C(3) un/vai C(28), lietojot vienkāršas alkilēšanas stratēģiju, tika sintezēta virkne mono- un bisfosfonātu esteru/ēteru un to nātrija sāļu. Šie savienojumi uzrādīja lielisku šķīdību ūdenī – īpašību, kas parasti nebija novērota dabā sastopamajiem PCT. Lai gan šī darba kontekstā tikai fosfonātu sērijai ir raksturīga šķīdības uzlabošana, tā parāda strukturālo modifikāciju lietderību terpenoīdu zāļvielu problēmu risināšanā.

Rezumējot – promocijas darbs ir veltīts jaunām un efektīvām metodoloģijām PCT karkasa funkcionalizēšanai. Aktivējot ķīmiski inertas pozīcijas, piemēram, C(16)-H un C(22)-H, tiek nodrošināta piekļuve iepriekš nezināmiem strukturāliem motīviem. Izstrādātais sintētisko metožu kopums nākotnē nodrošinās strukturāli jaunus būvblokus triterpenoīdos balstītu farmakoloģiski aktīvu savienojumu un/vai kosmētikas līdzekļu izstrādei, kas nodrošinās arī padziļinātus triterpenoīdu struktūras un aktivitātes attiecību pētījumus.



2. attēls. Promocijas darbā izstrādātās sintētiskās pieejas, kas ļauj veikt pentaciklisko triterpenoīdu (PCT) šķīdību uzlabojošas modifikācijas un selektīvu C-H funkcionalizēšanu.

Pētījuma mērķi un uzdevumi

Promocijas darba mērķi ir:

- sintētisko metožu izstrāde pentaciklisko triterpenoīdu D/E ciklos C-H funkcionalizēto atvasinājumu iegūšanai;
- sintētisko metožu izstrāde jonogēno pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu ar paaugstinātu šķīdību ūdenī ieguvei.

Lai sasniegtu mērķi, tika definēti vairāki uzdevumi.

- Izstrādāt PCT C(28) fosfonātu konjugātu sintēzes metodes, izmantojot estera saiti, un PCT C(3) fosfonātu konjugātu sintēzes, izmantojot ētera saiti, un novērtēt iegūto produktu šķīdību ūdenī.
- Izstrādāt PCT C(sp³)-H arilēšanas un hetarilēšanas metodes terpenoīdu D/E ciklos. Veikt C(sp³)-H deiterēšanas eksperimentus, kā arī izdalīt uz analizēt iespējamās C(sp³)-H arilēšanas reakcijas piemaisījumus, lai izprastu mehānismu un reģioselektivitāti nosakošos aspektus.
- Veikt dažādu C(16) un C(22) PCT-(het)arilatvasinājumu sintēzi, pārbaudot lietojamo arilhalogenīdu klāstu.
- Izstrādāt C(sp³)-H aminēšanas metodi C-N saišu veidošanai betulīna D/E ciklos. Parādīt iegūto aminobetulīna atvasinājumu sintētisko lietojumu, izstrādājot C(sp³)-H aminēšanas produktu tālākas funkcionalizēšanas iespējas.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Promocijas darbā ir izstrādātas sintēzes metodes jaunām pentaciklisko triterpenoīdu pārvērtībām, kas dod vairākas līdz šim nepieejamas savienojumu bibliotēkas. Nozīmīgākie sasniegumi ir šādi.

- Izstrādāts betulīnskābes, oleanolskābes un ursolskābes jauna tipa jonogēno fosfonātu atvasinājumu dizains. Izstrādāta mērogojama, ērta sintēzes procedūra, kas piemērota PCT atvasinājumu ieguvei. Visi jonogēnie PCT fosfonāti uzrāda augstu šķīdību ūdenī līdz pat 26 mg/mL pie pH 8,5. Tie ir hidrolītiski stabili un ar zemu citotoksicitāti pret osteoblastu prekursoru šūnu līniju MC3T3-E1, tādējādi paverot daudzsoļošanas iespējas iegūto savienojumu turpmākai izpētei medicīnas ķīmijas jomā.
- Pirmo reizi izstrādāta sintētiska procedūra pentaciklisko triterpenoīdu reģioselektīvai palādija katalizētai C-H arilēšanai un azetidīnēšanai. Šī metodoloģija uzskatāmi demonstrē pikolinamīda virzošās grupas efektīvu lietojumu PCT selektīvai funkcionalizēšanai. Optimizētie C-H arilēšanas reakcijas apstākļi nodrošina vēlamu C(sp³)-H arilēšanas un heteroarilēšanas produktu iegūšanu ar

C(22)/C(16) selektivitāti no 9 : 1 lupāna (betulīna) rindā līdz pat 19 : 1 oleanāna un ursāna rindās. Savukārt, aizstājot EDG saturošus jodarēnus ar EAG saturošiem jodarēniem, tika panākta C-N saites veidošanās PCT molekulārajā skeletā, iegūstot betulīna atvasinātu annelētu C(22)-azetidīnu un oleanāna atvasinātu annelētu C(16)-azetidīnu.

- Izstrādāta jauna katalītiska metode reģioselektīvai C-H aminēšanai betulīna molekulārajā skeletā, izmantojot rodija katalizatoru. Ieteiktais 28-*O*-sulfamāta esteris darbojas kā nitrēna prekursors, kas intramolekulāri ar augstu selektivitāti C(16) pozīcijā virza nitrēna iespīšanās un noved pie annelētas 1,2,3-oksatiazinān-2,2-diona struktūras veidošanās. Izstrādātas arī secīgas funkcionalizēšanas metodes, kas ļauj iegūt tādus savienojumus kā 16-aminobetulīns, 16-azidobetulīns, 16-aminobetulīnskābe un 16-aminobetulonskābe. Papildus tam atrasts, ka 16-aminobetulīna atvasinājumos iespējama atkārtota C-H aminēšana, bet šoreiz ar C(22)-selektivitāti. Tas dod iespēju sintezēt 16,22-diaminobetulīna prekursorus. Iegūtie produkti piedāvā modulāras iespējas tālākai funkcionalizēšanai un jaunu pussintētisko triterpenoīdu kombināto bibliotēku veidošanai ar potenciālu lietojumu medicīnās ķīmijā.

Kopumā ņemot, šajā promocijas darbā ieteiktais savienojumu dizains un to iegūšanai izstrādātās sintēzes metodes nodrošina preparatīvu piekļuvi jauniem strukturāliem motīviem, kas iepriekš pentaciklisko triterpenoīdu ķīmijā nebija pieejami, tādējādi paverot jaunas iespējas PCT atvasinājumu medicīnās ķīmijas pētījumiem.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir sagatavots kā tematiski vienotu zinātnisku publikāciju kopa, kas veltīta jonogēno fosfonātu un C-H funkcionalizēto pentaciklisko triterpenoīdu atvasinājumu sintēzei un to bioloģisko un sintētisko lietojumu izpētei. Promocijas darbs ietver trīs oriģinālpublikācijas *SCI* žurnālos, viena patenta, viena apskatraksta un nepublicētus rezultātus.

Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba galvenie rezultāti publicēti trīs zinātniskajos oriģinālrakstos un vienā patentā. Promocijas darba izstrādes laikā sagatavots viens apskatraksts. Pētījumu rezultāti prezentēti 13 konferencēs.

Zinātniskās publikācijas

- 1) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Lācis, R., Mishnev, A., Turks, M. Site-selective C-H amination of lupane type triterpenoids. *Eur. J. Org. Chem.* **2025**, 2500340.
- 2) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Lācis, R., Kumar, D., Kumpiņš, V., Rjabovs, V., Mishnev, A., Turks, M. Palladium-catalyzed C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids. *ACS Omega.* **2025**, 10, 27992–28019.

- 3) Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Lācis, R., Fedorovska, E., Demir, Ö., Dubņika, A., Loča, D., Turks, M. Synthesis and preliminary cytotoxicity evaluation of water soluble pentacyclic triterpenoid phosphonates. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 28031.
- 4) **Kroškins, V.**, Turks, M. Recent investigations in synthesis of oxathiazinanes by sulfamate estercyclization (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2023**, *59*, 637–639.

Iegūtie patenti

Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Lācis, R., Fedorovska, E., Turks, M. Ūdenī šķīstoši triterpenoīdu fosfonāti un to sintēzes metode. LV15836 B1, 20.03.2025.

Konfernces, kurās prezentēti pētījumu rezultāti

- 1) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Loča, D., Dubņika, A. Water Soluble Phosphonate Derivatives of Pentacyclic Triterpenoids. In *Balticum Organicum Syntheticum 2024: Abstract Book*, Latvia, Riga, 7–10 July, 2024. Riga: 2024, p. 80.
- 2) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Regioselective C-H Amination of Lupane-Type Triterpenoids. In *Balticum Organicum Syntheticum 2024: Abstract Book*, Latvia, Riga, 7–10 July, 2024. Riga: 2024, p. 81.
- 3) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Site Selective C-H Amination of Lupane Type Triterpenoids. In *24th Tetrahedron Symposium: Abstract Book*, France, Montpellier, 18–21 June, 2024. Montpellier, p. 242.
- 4) Kumpiņš, V., **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Site Selective C(sp^3)-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *24th Tetrahedron Symposium: Abstract Book*, France, Montpellier, 18–21 June, 2024. Montpellier, p. 243.
- 5) **Kroškins, V.**, Lācis, R., Lugiņina, J., Turks, M. Palladium-Catalyzed C(sp^3)-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *International Symposium on Synthesis and Catalysis 2023: Abstract Book*, Portugal, Evora, 5–9 September, 2023. Evora: 2023, p. 204.
- 6) **Kroškins, V.**, Lācis, R., Lugiņina, J., Loča, D., Turks, M. Synthesis of Phosphonate Derivatives of Pentacyclic Triterpenoids. In *International Symposium on Synthesis and Catalysis 2023: Abstract Book*, Portugal, Evora, 5–9 September, 2023. Evora: 2023, p. 227.
- 7) **Kroškins, V.** C(sp^3)-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *13th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry: Program and Abstract Book*, Latvia, Riga, 14–15 September, 2023. Riga: 2023, p. 46.
- 8) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. C-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *81st International Scientific Conference of the University of Latvia 2023. Chemistry Section and Section of Institute of Chemical Physics: Book of Abstracts.*, Latvia, Riga, March 17, 2023. Riga: University of Latvia Press, 2023, p. 11.
- 9) Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Lācis, R., Loča, D., Turks, M. Pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu atvasinājumu sintēze. In *Konference "Inovāciju fonds – nozaru pētījumu programma: viedie materiāli, fotonika un biomedicīna"*, Latvia, Riga, November 18, 2023. Riga: 2023, p. 1–2.

- 10) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Rh Catalyzed C-H Amination of Pentacyclic Triterpenoids. In: *Materials Science and Applied Chemistry 2022: Programme and Abstracts*, Latvia, Riga, October 21, 2022. Riga: 2022, p. 5.
- 11) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Jankovičs, K. C-H Activation of Lupane Type Triterpenoids. In: *80th International Scientific Conference of the University of Latvia 2022. Chemistry Section: Book of Abstracts*, Latvia, Riga, February 11, 2023. Riga: University of Latvia Press, 2022, p. 75.
- 12) Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Mishnev, A., Turks, M. Palladium-Catalyzed C-H Activation of Triterpenoids. In: *Balticum Organicum Syntheticum 2022: Program and Abstract Book*, Lithuania, Vilnius, 3–6 July, 2022. Vilnius: 2022, p.115.
- 13) **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. C-H Amination of Pentacyclic Triterpenoids. In: *Balticum Organicum Syntheticum 2022: Program and Abstract Book*, Lithuania, Vilnius, 3–6 July, 2022. Vilnius: 2022, p.115.

GALVENIE PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI

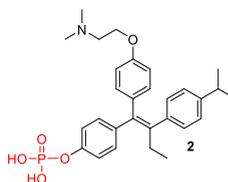
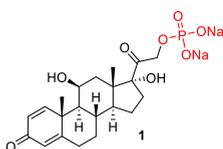
1. Jonogēno pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu sintēze un lietojums

Daudzas dabasvielas uzrāda ievērojamu bioloģisko aktivitāti gan *in vitro* eksperimentos, gan preklīniskajos dzīvnieku modeļos. Tomēr to efektivitāte cilvēku klīniskajos pētījumos bieži vien dod nekonekventus rezultātus. Atšķirīgo rezultātu iemesls starp laboratorijas pētījumiem vai pētījumiem dzīvnieku līmenī un lietojumu uz cilvēkiem ir bieži sastopama dabasvielu ierobežotā biopieejamība, ko savukārt iespaido dabasvielu molekulu paaugstinātā lipofilitāte. Hidrofobitātes un lipofilitātes jēdzieni tiek plaši izmantoti attiecībā uz organisko savienojumu sorbciju no ūdens vides.²² Hidrofobais efekts raksturo nepolāru savienojumu tieksmi pret neūdens vidi ūdens vides vietā. Tomēr absolūta lipofilitātes nomākšana var izraisīt aktīvo farmaceitisko vielu pasīvā transporta pārtraukšanu caur organisma membrānām un pēc zāļu saistīšanās ar receptoriem. Tā rezultātā tradicionālās zāles parasti tiek izstrādātas, koncentrējoties uz labas biopieejamības un vēlamu farmakokinētisko īpašību nodrošināšanu, ko sasniegt vienlaikus ir visnotaļ sarežģīti.²³

Viena no visizplatītākajām stratēģijām fizikāli ķīmisko, biofarmaceutisko vai farmakokinētisko īpašību uzlabošanai savienojumiem ar augstu farmakoloģisko potenciālu ir priekšzāļu izstrāde. Priekšzāles ir farmakoloģiski aktīvo molekulu ķīmiski modificētas formas, kurām jāpārveidojas *in vivo*, lai atbrīvotu aktīvo sākotnējo molekulu. Jāatzīmē, ka priekšzāļu metodi var izmantot, lai palielinātu hidrofobu nepolāru savienojumu šķīdību ūdenī un biopieejamību, ievadot polāras jonogēnas funkcionalitātes, un, pretēji, lai uzlabotu polāru hidrofilu molekulu lipofilitāti un caurlaidību, aizsargājot polārās funkcionalitātes ar nepolārām grupām.²⁴ Tādējādi prednizolona fosfāta esteris **1** ir reprezentatīvs steroīdo zāļu jomas priekšzāļu piemērs ar uzlabotu šķīdību ūdenī (3. att.). Vēl viens piemērs ir miproksifēna fosfāta esteris **2**, kam ir ievērojami uzlabota šķīdība ūdenī, salīdzinot ar nemodificētu miproksifēnu.

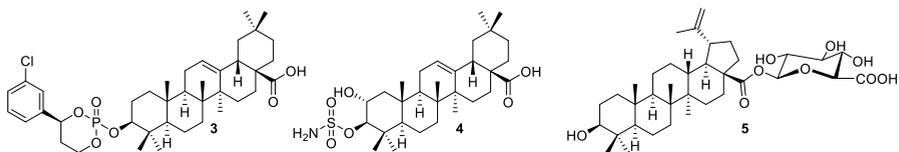
- Biokonversiju veic sārmainā fosfatāze
- Fosfāta šķīdība jāva izstrādāt šķīdīgo zāļu formu

- Biokonversiju veic sārmainā fosfatāze
- Šķīdība ūdenī pie pH 7,4 palielinājās ~1000 reizes



3. attēls. Prednizolona un miproksifēna ūdenī šķīstošās priekšzāles.

Pentaciklisko triterpenoīdu steroīdiem līdzīgo struktūru paaugstinātā lipofilitāte ir bieži sastopams ierobežojums šo savienojumu klašu pārstāvju medicīnas ķīmijas pētījumos un iespējamam tālākam terapeitiskam lietojumam. Lai uzlabotu triterpenoīdu šķīdību ūdenī, ir izstrādātas priekšzāļu stratēģijas. Triterpenoīdu fosfāti un sulfāti, kā arī to aminoskābju, hidrofilu polimēru vai ogļhidrātu konjugāti (4. att.) ir plaši izmantoti, lai uzlabotu šķīdību ūdenī un perorālo biopieejamību.²⁵



4. attēls. Oleanolskābes fosfāta prekursora **3** un ūdenī šķīstošo PCT atvasinājumu **4, 5** piemēri.

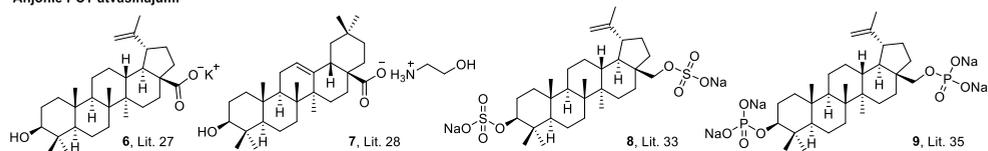
Šķīdību ūdenī var uzlabot, arī ievadot stabilas polāras jonogēnas funkcionalitātes, nodrošinot bioloģiski aktīvo savienojumu sāls formas.²⁶ Ja zāļu viela ir skābe vai bāze, tad to sāļiem parasti ir augstāka šķīdība ūdenī nekā atbilstošajām nejoniizētām formām. Protams, jaunu funkcionālo grupu ieviešana, kā arī jauna pretjona klātbūtne molekulā var ietekmēt modificētā savienojuma saistīšanos ar olbaltumvielām, bioloģisko sadalījumu un metabolismu.

Pašas triterpēnskābes var viegli pārveidot atbilstošos sāļos, veicot vienkāršu neitralizācijas reakciju ar dažādām neorganiskām un organiskām bāzēm. Piemēram, nātrija vai kālija betulinātu **6** var iegūt, apstrādājot betulīnskābi ar NaOH un KOH etanola šķīdumu. Tomēr šo sāļu šķīdības testi deva neskaidrus rezultātus koloīdu veidošanās dēļ koncentrācijās virs 0,02 mg/g.²⁷ Organiskais pretjons, kā tas ir holīna oleanolāta **7** gadījumā, uzrāda vislabāko šķīdību (81,7 μg/mL) kuņģa sulai pietuvinātā vidē (NaCl un nātrija dodecilsulfāta ūdens šķīdums, kura pH ar HCl šķīdumu ir noregulēts līdz 1,2).²⁸

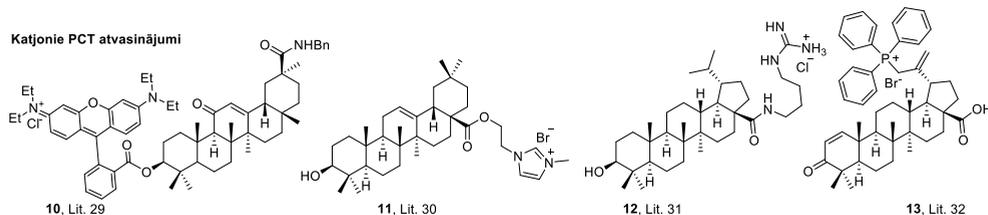
Pēdējās desmitgades laikā, veicot dažādas funkcionālo grupu pārvērtības PCT struktūrā pie C(3), C(28) un dubultsaitē, ir sintezēti daudzi katjonie PCT atvasinājumi (5. att.). Izmantojot dažāda veida saites, pentaciklisko triterpenoīdu karkasi ir atvasināti ar atšķirīgus pretjonus saturošiem amonija **10**²⁹, imidazolija **11**³⁰ un guanidīnija **12**³¹ fragmentiem. Analogiski dažādiem bioloģiskiem mērķiem ir iegūti C(28), C(30) un C(2) PCT trifenilfosfonija sāļi.³² Diemžēl ziņojumu par šo katjono PCT konjugātu šķīdības datiem nav.

Līdz šim zināmie pussintētiskie PCT anjonie atvasinājumi (5. att.) galvenokārt ietver sulfātu un fosfātu atvasinājumus, ko var iegūt, sulfatējot^{33, 34} vai fosforilējot^{35, 36, 37} C(3)-OH vai/un C(28)-OH grupas. Monofosforilēto un difosforilēto PCT molekulu izmainītais telpiskais izkārtojums un elektroniskā vide piešķir daudzveidīgas bioloģiskās īpašības, ko apliecināja vairāki pētījumi. Tomēr visaptveroši dati par šo savienojumu šķīdību ūdenī vēl nav publicēti.

Anjonie PCT atvasinājumi

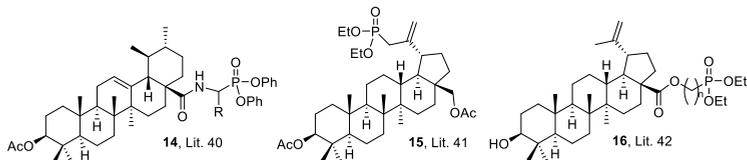


Katjonie PCT atvasinājumi



5. attēls. Iepriekš publicēto jonogēno PCT atvasinājumu piemēri.

Fosfātu grupas aizstāšana ar izostērisko fosfonātu grupu var ievērojami samazināt fosfātiem raksturīgo zemo hidrolītisko stabilitāti. Šī pieeja ir pierādījusi fosfonātu atvasinājumu nozīmi kā stabilu bioloģiski aktīvu savienojumu klasi, kas vislielāko lietojumu līdz šim ir radusi nukleotīdu atvasinājumu kā pretvīrusu zāļu vidū.^{38,39} Ir publicēti arī daži piemēri par fosfonātu atvasinājumiem PCT ķīmijā. Fosfonāta daļas ievadīšana triterpenoīda karkasā līdz šim ir veikta ar amīda **14**⁴⁰ saiti vai C-C **15**⁴¹ saiti (6. att.). Pirms promocijās darbā atspoguļoto pētījumu sākšanas bija aprakstīts tikai viens piemērs par PCT fosfonātu atvasinājumu **16**,⁴² kurā fosfonāta grupa ir saistīta ar estersaiti pie C(28) (6. att.). Tomēr sintētiskās metodes par PCT fosfonātu pārveidošanu fosfonskābēs vai to sāļos, kā arī šādi iegūtu fosfonātu sāļu šķīdības dati nav pieejami.

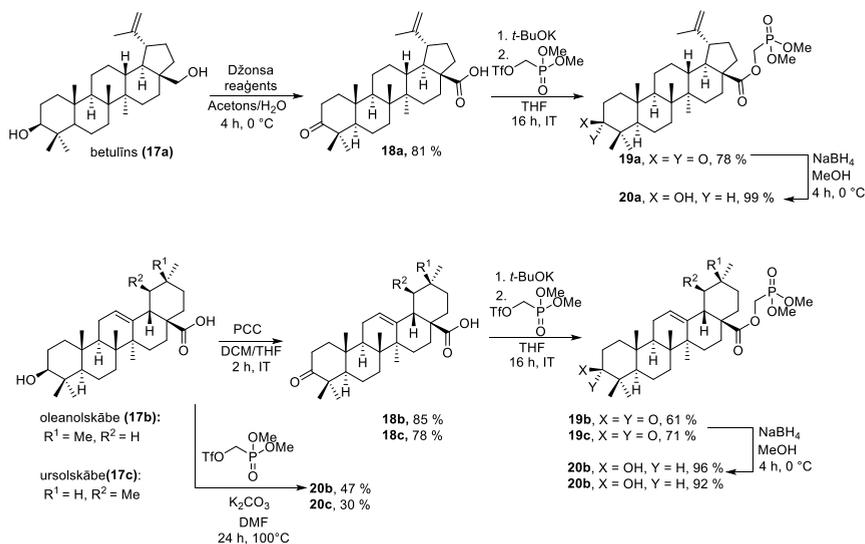


6. attēls. Iepriekš publicētie PCT fosfonātu konjugāti.

Promocijas darbā ir izstrādāti jaunu pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu atvasinājumu ar vispārīgo struktūru C(17)-COO-CH₂-P, C(3)-O-CH₂-P un C(3/28)-O-CH₂-P dizains un sintēzes metode. Tajā fosfonāta fragmenta ievadīšanai, izmantojot estera vai ētera saiti, ir izvēlēts vienkāršākais iespējamais -CH₂- tiltiņš. Jāuzsver, ka iepriekš publicētie triterpenoīdu C(28) esteri uzrāda augstu stabilitāti skābā un bāziskā vidē.⁴³ Savukārt izstrādātā metode dod iespēju viegli iegūt šādus no triterpenoīdiem atvasinātus fosfonātu esterus. Tos ir arī viegli pārvērst sāls formā, un tiem piemīt uzlabota šķīdība ūdenī. Sākotnēji tika mēģināts ievadīt vēlamo fosfonāta fragmentu, veicot 3-okso-PCT karbonskābju esterifikācijas reakciju ar dimetil(hidroksimetil)fosfonātu, taču netika atrasti pietiekami efektīvi reakcijas apstākļi. Problēma tika atrisināta, attālinot reakcijas centru par vienu atomu no C(17) kvaternārā centra, tādējādi pārvarot triterpenoīdu skeleta stēriskos

traucējumus. Šim nolūkam tika nolemts pāriet no nukleofila reakcijas ar aktivētu karbonskābes funkciju uz karboksilāta alkilēšanas reakciju ar elektrofilu komponenti.

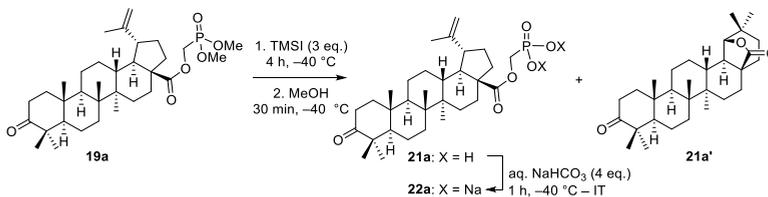
t-BuOK bija piemērots 3-oksotriterpēnskābju **18a-c** veiksmīgai deprotonēšanai, un pēc sekojošas alkilēšanas ar (dimetoksifosforil)metiltrifluormetānsulfonātu bezūdens THF vidē ar labu iznākumu tika iegūti vēlamie esteri **19a-c** (1. shēma). Izmantotais triflāts ir viegli iegūstams no iepriekš minētā spirta.⁴⁴ Līdzīga pieeja, izmantojot (dimetoksifosforil)metiltrifluormetānsulfonātu kombinācijā ar 3-hidroksitriterpēnskābēm **17b,c**, nodrošināja savienojumus **20b,c** (process **17b,c** → **20b,c**, 2. shēma), bet ar zemākiem iznākumiem blakusproduktu veidošanās dēļ. Lai uzlabotu ķīmisko selektivitāti starp mērķa C(17)-COOH un nevēlamo C(3)-OH alkilēšanu transformācijā **17b,c** → **20b,c**, tika izmantots K₂CO₃ kā vājāka bāze. Šādos apstākļos tika novērota arī nevēlama transesterifikācija starp C(17)-COOH un alkilēšanas reaģenta fosforskābes metilestera daļu, veidojot C(17)-COOMe blakusproduktu kopā ar TfOCH₂P(O)(OH)(OMe). PCT fosfonātu **19a-c** diastereoselektīvā C(3) reducēšana tika atzīta par optimālāku, nodrošinot selektīvākas transformācijas un piekļuvi C(3)-OH fosfonātu atvasinājumiem **20a-20c**.



1. shēma. PCT fosfonātu **19a-c** un **20a-c** sintēze.

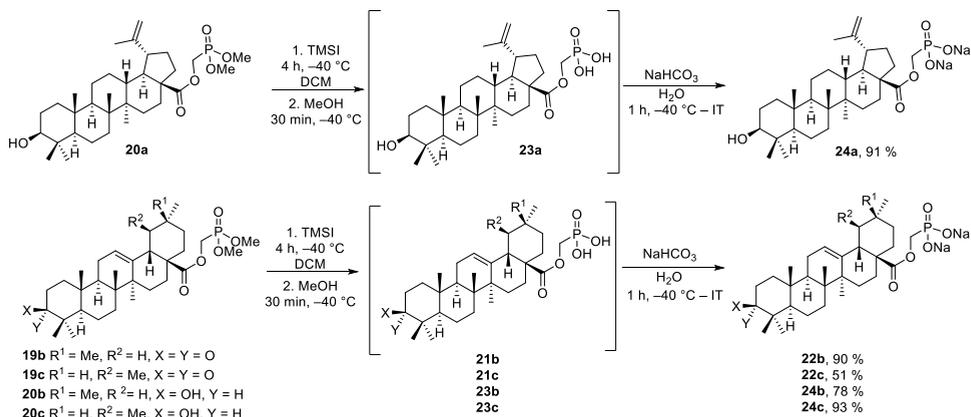
Tālāk pētījām iegūto fosfonātu **19a-c** un **20a-c** transformāciju par nātrija fosfonātiem **22a-c** un **24a-c**, izmantojot demetilēšanu trimetilsililjodīda (TMSI) klātienē, kam sekoja izveidoto fosforskābju **21a-c** un **23a-c** pārveidošana atbilstošajos nātrija sāļos. Kā modeļvielu lietojot betulonskābes fosfonātu **19a**, tika atklāts, ka demetilēšanai nepieciešamā temperatūra ir -40 °C (2. shēma). Augstākā temperatūrā tika novērota iepriekš izveidotās estersaites šķelšanās un betulonskābes dubultsaites katjonā pārgrupēšanās.⁴⁵ Tika atklāts, ka starpprodukta O-TMS-

fosfonātu metanolīze un sekojoša HI neutralizācija kopā ar fosfonskābes dinātrija sāls veidošanos, pievienojot nātrija bikarbonāta ūdens šķīdumu, arī ir jāveic pazeminātā temperatūrā.



2. shēma. Savienojuma **19a** demetilēšana.

Izstrādātie demetilēšanas apstākļi tika veiksmīgi izmantoti visām pārējām savienojumu sērijām, kas sastāv no betulīnskābes atvasinājuma **20a** ar brīvu C(3)-OH grupu, no 3-oksooleanolskābes un ursolskābes atvasinātiem fosfonātiem **20b,c** un to atbilstošajiem C(3)-OH atvasinājumiem **21b,c**, iegūstot mērķa produktus **22a-c** un **24a-c** ar labiem līdz izciliem iznākumiem (2., 3. shēma).

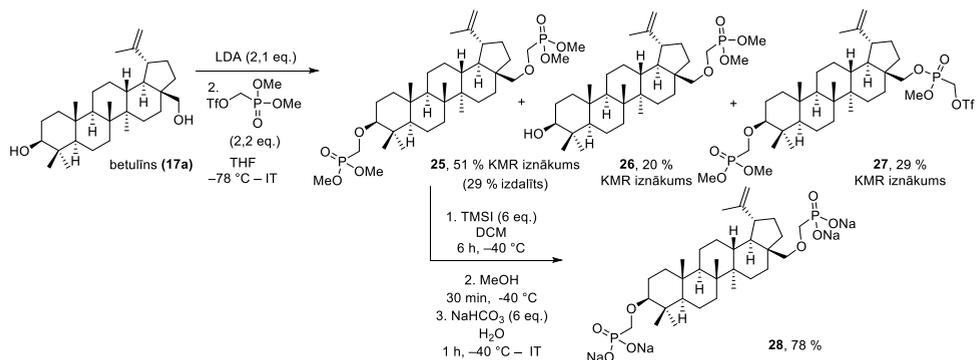


3. shēma. No triterpēnskābēm atvasinātu nātrija fosfonātu **22b,c** un **24a-c** sintēze.

Iegūtie produkti **22a-c** un **24a-c** uzrādīja augstu hidrolītisko stabilitāti, un karboksilāta estera saites šķelšanās netika novērota pat pēc karsēšanas divos dažādos bāziskos apstākļos: (1) 60 °C temperatūrā 1,5 M NaOH/MeOH šķīdumā 6 stundas; (2) 100 °C temperatūrā 4 ekvivalentu NaOH klātbūtnē H₂O 24 stundas. Iegūtajiem jonogēnajiem PCT atvasinājumiem piemīt augsta šķīdība ūdenī, ko var labi parādīt, reģistrējot to ¹H KMR spektrus D₂O vidē.

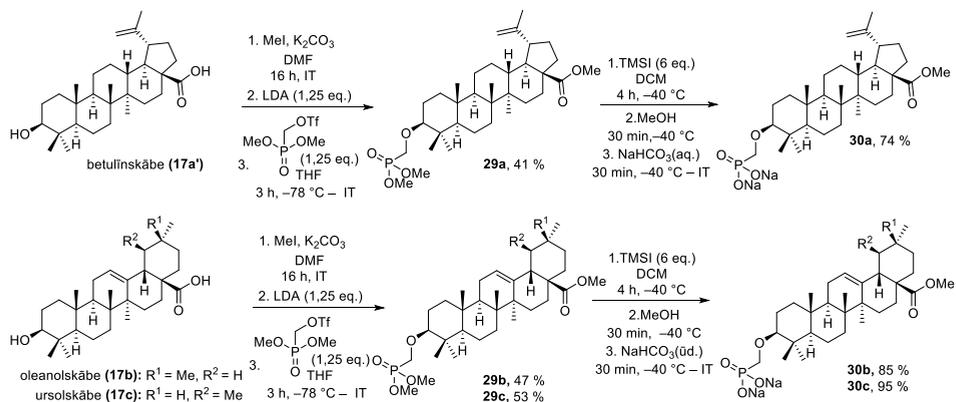
Tālāk tika pētīta fosfonāta funkcionalitātes ievadīšana PCT, izmantojot ētera saiti. Sākot ar betulīnu, visizplatītāko dabisko PCT-3,28-diolu, tika pārbaudīta abu hidroksilgrupu alkilēšanas iespējamība vienlaikus. Tādu spēcīgu bāzu kā NaH, *t*-BuOK, *n*-BuLi un MeMgBr izmantošana kombinācijā ar iepriekš lietoto (dimetoksifosforil)metiltriflātu vai tozilātu izrādījās neefektīva.

Visbeidzot tika atklāts, ka, apvienojot triflāta alkilēšanas reagentu (2,2 eq.) un no LDA (2,1 eq.) iegūto betulīna litija dialkoksīdu, var iegūt mērķa produktu **25** ar 29 % iznākumu (4. shēma). Kopā ar vēlamo produktu **25**, tika izdalīts C(28)-O-monoalkilēšanas produkts **26** un C(28)-O-fosfonilēšanas produkts **27** attiecībā **25** : **26** : **27** 51 : 20 : 29 (KMR). Blakusprodukta **27** veidošanās rodas no alkoksīda uzbrukuma fosfora centram divu konkurējošu elektrofilu reakcijas centru klātbūtnes dēļ (dimetoksifosforil)metiltrifluormetānsulfonātā. Iegūtais tetrametilbisfosfonāts **25** tika veiksmīgi pārveidots par tetranātrija sāli **28** (78 %), izmantojot iepriekš izstrādātos demetilēšanas apstākļus.



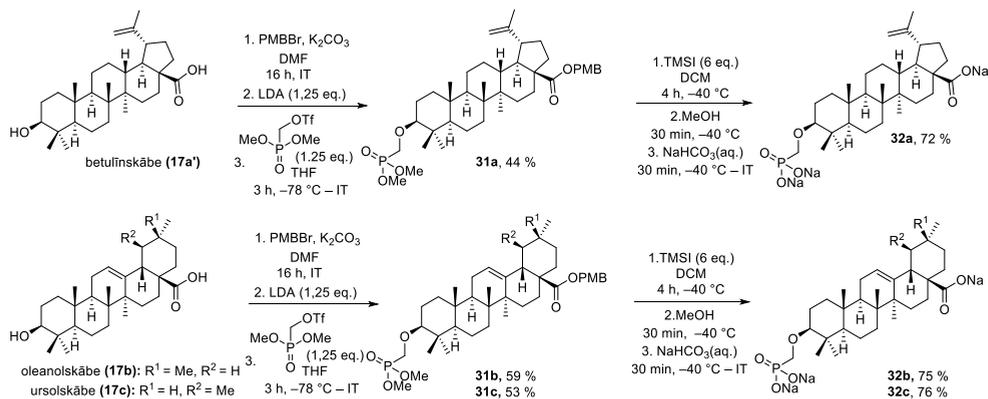
4. shēma. Bis-fosfonāta **28** sintēze.

Pēc tam tika sintezēti monofosfonātu PCT atvasinājumi pie C(3). Šim nolūkam betulīnskābes (**17a'**), oleanolskābes (**17b**) un ursolskābes (**17c**) karbonskābes funkcijas tika aizsargātas kā metilesteri. Iepriekš izstrādātās LDA/triflāta kombinācijas lietošana deva pieeju vēlamajiem C(3)-ēteriem ar vidējiem iznākumiem (5. shēma). Papildus mērķa produktiem pēc reakcijas tika novērota arī izejvielu klātbūtne un alkilējošā reaģenta degradācija.



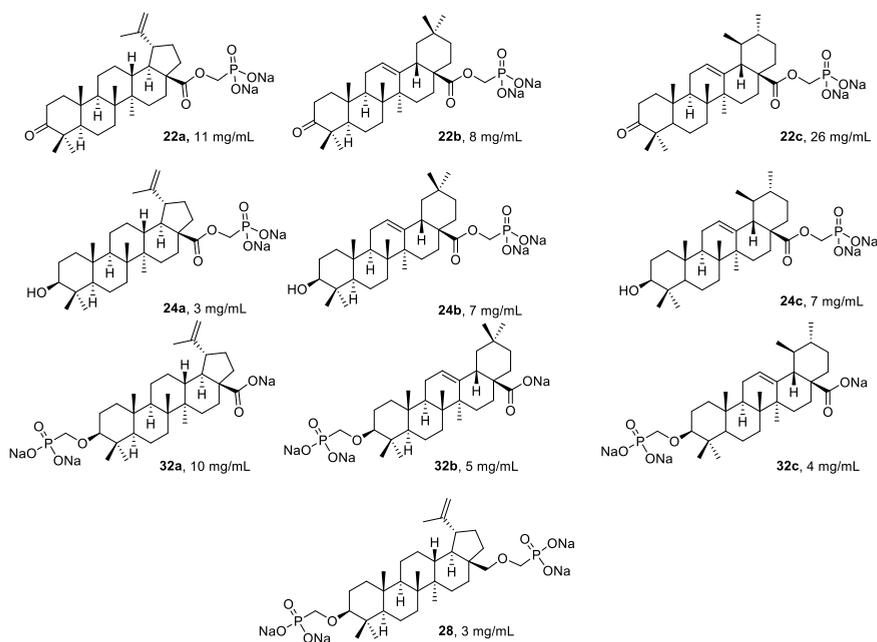
5. shēma. Metil aizsargātu PCT fosfonātu atvasinājumu **29a-c** sintēze un demetilēšana.

Tika sagaidīts, ka iepriekš izstrādātie TMSI apstākļi nodrošinās gan fosfonātu demetilēšanu, gan C(28) karbonskābes metilestera demetilēšanu, iegūstot vēlamos trinātrija sāļus. Tomēr C(28) metilesteri **29a-c** uzrādīja paaugstinātu stabilitāti, veidojot produktus **30a-c** (5. shēma). Alternatīvu apstākļu pārbaude metilesteru **29a-c** šķelšanai, piemēram, 6M KOH/EtOH attecē, LiI/DMF/DMSO attecē, izrādījās neefektīva. Tāpēc tika nolemts mainīt metilgrupu uz vieglāk nošķelamo 4-metoksibenzilgrupu. Šoreiz C(28)O-PMB aizsargāto C(3) ēteru **31a-c** apstrāde ar TMSI, sekojoša metanolīze un neitralizācija ar NaHCO₃ deva mērķa PCT jonogēnos atvasinājumus **32a-c** ar labiem iznākumiem (6. shēma).



6. shēma. PMB aizsargātu PCT fosfonātu atvasinājumu **31a-c** sintēze un demetilēšana.

Visiem iegūtajiem jonogēnajiem PCT nātrija fosfonātiem tika veikti šķīdības testi ūdenī (7. att.). Precīzai šķīdības aprēķināšanai tika izmantota kvantitatīvā ¹H-KMR pieeja D₂O vidē, izmantojot kālija hidrogēntalātu kā ārējo standartu. Fosfonātu bāziskās formas⁴⁶ tika nodrošinātas, uzmanīgi pievienojot NaOD, kvantitatīvās noteikšanas laikā uzturot pH 8,0–8,5, kas ir par 2–3 vienībām augstāks nekā fosfonskābes disāls pKa.⁴⁷ Kā paredzams, jaunizveidotajiem PCT fosfonātiem **22a-c**, **24a-c**, **32a-c** un **28** piemīt lieliska šķīdība ūdenī diapazonā no 3 mg/mL līdz 26 mg/mL (pH 8,0,8,5) (7. att.). Tā ir vismaz par divām kārtām augstāka nekā līdz šim publicētie dabisko triterpēnskābju šķīdības dati. Piemēram, oleanolskābes un betulinskābes šķīdība ūdenī neitrālā pH ir < 0,1 μg/mL, un to var palielināt līdz 42,1 μg/mL betulinskābei un 99,5 μg/mL oleanolskābei pie pH 11,8.²² Arī dabiskajai ursolskābei ir līdzīgi zema šķīdība ūdenī,²⁰ ko var zināmā mērā palielināt ar dažādām modernām zāļu piegādes sistēmām.^{18,19} Fosfonskābes ir stiprākas skābes un vieglāk jonizējamas nekā karbonskābes. Šī īpašība palīdz palielināt šķīdību ūdenī, kā to pierāda šeit aprakstītie savienojumi.



7. attēls. PCT fosfonātu šķīdība deiterētā ūdenī (D₂O) pie pH 8,0 – 8,5.

Iegūto savienojumu citotoksiskā aktivitāte dažādās koncentrācijās (10–50 μM) tika noteikta cilvēka osteosarkomas šūnu līnijās MG-63 (ATCC, CRL-1427) un peles preosteoblastu šūnu līnijās MC3T3-E1 (ATCC, CRL-2593) sadarbībā ar *Dr. sc. ing.* A. Dubņiku un profesori D. Loču (RTU Biomateriālu un bioinženierijas institūts). Kā standartvielas citotoksicitātes testos tika lietotas arī dabiski sastopamās betulīnskābe (**17c'**), oleanolskābe (**17b**) un ursolskābe (**17c**), kā arī to 3-oksoanalogi **18a-c** un doksorubicīns. Tika konstatēts, ka izstrādātie ūdenī šķīstošie PCT fosfonātu atvasinājumi un dabiskās triterpēnskābes, tostarp to 3-oksoanalogi, neuzrāda toksicitāti MC3T3-E1 šūnās. Kā interesants izņēmums jāmin koncentrācijas atkarīga MC3T3-E1 šūnu dzīvotspējas samazināšanās oleanonskābes klātbūtnē ($0,49 \pm 0,12$ relatīvā vielmaiņas aktivitāte pie 50 μM **18b**). Mazākā mērā ursonskābe ietekmēja MC3T3-E1 šūnu vielmaiņas aktivitāti ($0,72 \pm 0,09$ relatīvā vielmaiņas aktivitāte pie 50 μM **18c**). Tomēr MG-63 šūnu līnija uzrādīja nedaudz zemāku vielmaiņas aktivitāti oleanonskābes fosfonāta **24b** klātbūtnē ($0,73 \pm 0,05$ relatīvā vielmaiņas aktivitāte pie 50 μM **24b**) nekā oleanolskābes klātbūtnē ($1,03 \pm 0,18$ **18b** gadījumā). Interesanti atzīmēt, ka ursolskābe (**17c**) un ursonskābe (**18c**) šūnu dzīvotspējas testos uzrādīja citotoksisku iedarbību pret MG-63 šūnu līniju (attiecīgi $0,28 \pm 0,04$ un $0,67 \pm 0,04$ relatīvā vielmaiņas aktivitāte pie 50 μM **17c** un **18c**).

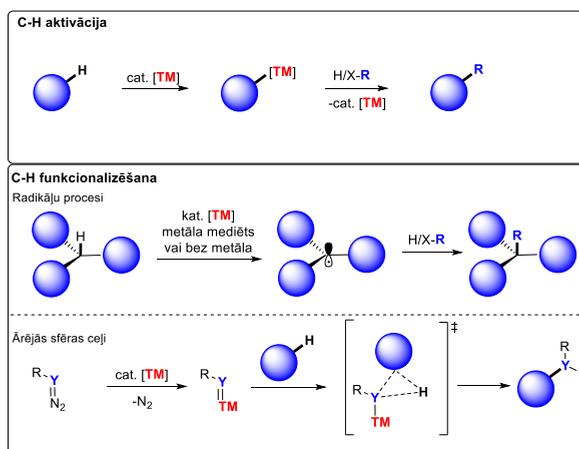
Kopsummā var secināt, ka ir iespējams izveidot pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu atvasinājumus, kur fosfonāta fragmenti ir saistīti pie triterpēna karkasa ar ētera vai estera tipa funkcionālajām grupām un ar īsāko iespējamo metilēntilpiņu. Fosfonāta demetilēšana ar TMSI tika

optimizēta, lai izvairītos no skābes izraisītām pārgrupēšanās blakusrekcijām. Iegūti ir gan ar estera saiti saistīti dinātrija fosfonāti no betulīnskābes, oleanolskābes un ursolskābes, ieskaitot to 3-oksoformas, gan ar ētera saiti saistīti fosfonskābju un terpēnkarbonskābju trinātrija sāļi. Sāļiem konstatēta augsta šķīdība ūdenī (3–26 mg/mL pie pH 8,0–8,5), kas noteikta ar kvantitatīvo KMR. To augstā šķīdība pieļauj pat savienojumu KMR raksturošanu D₂O šķīdumos. Sākotnējie citotoksicitātes testi liecina par zemu toksiskumu normālām šūnām, kas paver iespējas pētījumiem to izmantošanai pretvīrusu, pretmikrobu, antidiabētiskās un pretiekaisuma terapijās.

Par šiem pētījumiem plašāk var lasīt publikācijā Lugiņina, J., Kroškins, V., Lācis, R., Fedorovska, E.; Demir, Ö., Dubnika, A., Loca, D., Turks, M. Synthesis and preliminary cytotoxicity evaluation of water soluble pentacyclic triterpenoid phosphonates. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 28031; (1. pielikums) patentā Lugiņina, J., Kroškins, V., Lācis, R., Fedorovska, E., Turks, M. Ūdenī šķīstoši triterpenoīdu fosfonāti un to sintēzes metode. LV15836 B1, 20.03.2025. (2. pielikums); kā arī 3. pielikumā par PCT 3-O-metilfosfonātu sintēzi.

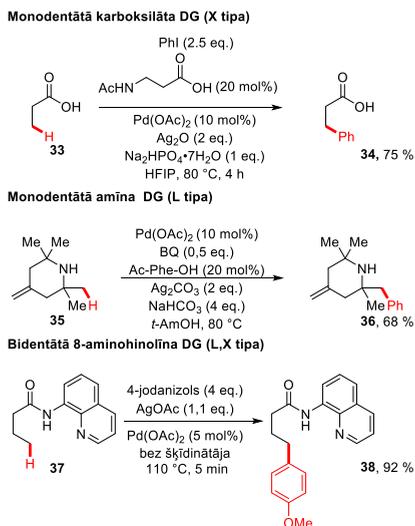
2. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H funkcionalizēšana

Pārejas metālu katalītisko metožu attīstība ir radījusi virkni sasniegumu sintētiskajā organiskajā ķīmijā, ļaujot konstruēt arvien sarežģītākus savienojumus.²¹ Pārejas metālu katalizēta C-H aktivācija, kas ietver iekšējās sfēras C-H saites šķelšanu, lai radītu oglekļa-metāla saiti, piedāvā ilgtspējīgu un ekonomisku pieeju organiskajā sintēzē. Termini C-H aktivācija un C-H funkcionalizēšana bieži tiek lietoti līdzvērtīgi, taču zināma atšķirība slēpjas mehānismā.⁴⁸ C-H aktivācija ietver mehānisma soļus, kuros C-H saite tiek šķelta, veidojot tiešu saiti starp oglekli un metālu (7. shēma). Turpretī C-H funkcionalizēšana ir plašāks termins, kas neprasa C-M saites veidošanos un ietver gan iekšējās sfēras, gan ārējās sfēras mehānismus. Ārējās sfēras C-H funkcionalizēšana parasti notiek, izmantojot radikāļu starpniecību, ūdeņraža atoma pārneši (HAT) vai iespriešanos C-H saitē, kurā iesaistītas metāla karbenoīdu, okso- vai nitrenoīdu daļiņas, kā arī citus procesus.



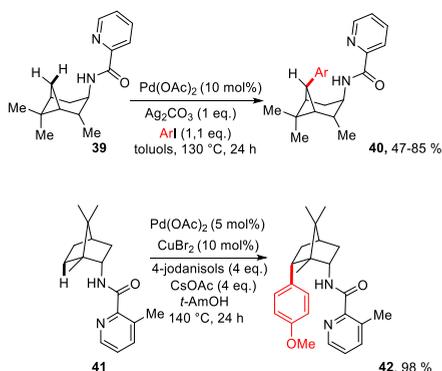
7. shēma. C-H aktivācija un C-H funkcionalizēšana.

Absolūtas ķīmiskās selektivitātes un reģioselektivitātes kontroles sasniegšana joprojām ir būtisks izaicinājums sintētiski piemērotām C-H aktivācijas reakcijām. Reģioselektivitāti var regulēt ar substrāta elektroniskajām vai stēriskajām īpašībām, kā arī ar helātu palīdzību. Lai atvieglotu pēdējo, ir izstrādātas dažādas monodentātās un bidentātās virzošās grupas vai nu dabiski substrātā esošas (8. shēma: izejvielas **33**, **35**), vai arī apzināti ievadītas (8. shēma: izejviela **37**), lai nodrošinātu pārejas metālu katalizētu C-H aktivāciju.^{49, 50, 51, 52}



8. shēma. C(*sp*³)-H aktivācija izmantojot dažāda veida virzošās grupas.

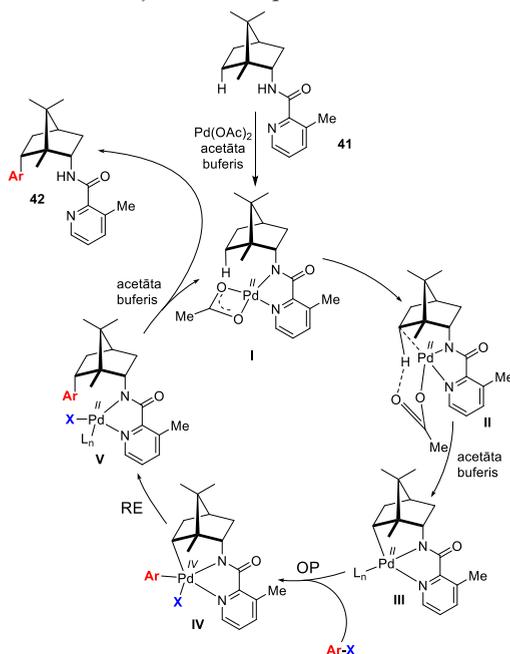
Pēdējo desmitgažu laikā ir ziņots par ievērojamiem dabasvielu C-H arilēšanas un sekojošas funkcionalizēšanas lietojumiem. Piemēram, pinamīnu **39**, kas satur pikolinamīda virzošo grupu, var selektīvi funkcionalizēt ar dažādi aizvietotiem aromātiskiem cikliem (9. shēma).⁵³ Savukārt Šeparda (*Shepard*) grupa ir aprakstījusi sintētisku protokolu 4-anizolilaizvietotāja iekļaušanai bornilamīna karkasā **41**, izmantojot dažādi aizvietotas virzošās piridilgrupas, starp kurām 2-metilpiridilgrupa nodrošināja vislabāko reģioselektivitāti.⁵⁴



9. shēma. Dabisko terpēnu C-H arilēšana.

Tiek uzskatīts, ka palādija katalizētās C-H arilēšanas mehānisms sākas ar palādija koordinēšanos pie virzošās grupas un ligandu apmaiņu, veidojot kompleksu **I** (10. shēma). Pēc tam

C-H aktivācijas solis notiek, izmantojot saskaņotu metalēšanas-deprotonēšanas ceļu⁵⁵, kas ietver C-H saites koordinēšanos ar palādiju, veidojot palādijs-oglekļa σ -kompleksu **II**. Aprēķinātais pārejas stāvoklis parāda, ka oglekļa-metāla saite sāk veidoties vienlaikus ar protona pārneši uz karboksilāta grupu, kā rezultātā veidojas metāla kompleksss **III**. Salīdzinot ar citiem iespējamiem procesiem, piemēram, C-H saites oksidējošo pievienošanās metālam, CMD process prasa ievērojami mazāk enerģijas.⁵⁶ Ariljodīda oksidējošā pievienošanās kompleksam **III** dod palādijs(IV) intermediātu **IV**, un sekojoša C-C reducējošā eliminācijā un ligandu apmaiņa rada palādijs kompleksu **V**, kas atbrīvo mērķa arilēšanas produktu.

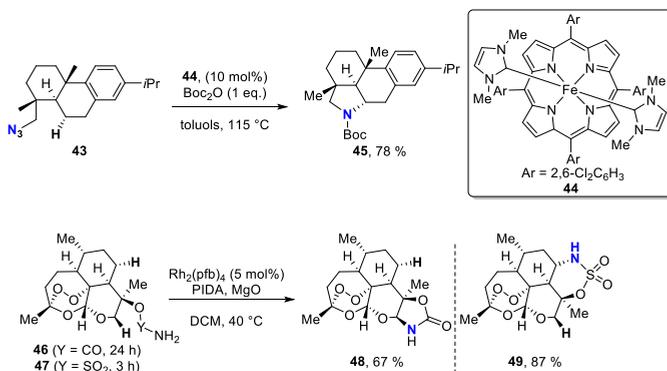


10. shēma. Palādijs katalizētas C-H arilēšanas mehānisms.

Metālu piedevas, piemēram, vara(II) un sudraba(I) sāļi, bieži ir izšķirošas palādijs katalizētās C-H aktivācijas reakcijās, palīdzot uzlabot reakcijas spēju, selektivitāti vai pat nodrošināt noteiktas pārvērtības, kas citādi nenotiktu efektīvi. Vara piedeva var atjaunot Pd(II) savienojumus, kas var reducēties līdz Pd(0) un apturēt Pd(II)/Pd(IV) katalītisko ciklu. Dažos gadījumos vara(II) sāļi tieši palīdz C-H saišu šķelšanā, darbojoties kā Luisa skābe, kas aktivizē substrātu, vai Brensteda bāze (īpaši ar acetāta ligandiem), kas palīdz deprotonēšanā (īpaši CMD procesā).⁵⁷ Ag(I) sāļu loma ir aprakstīta dažādos palādijs katalizētos C-H aktivācijas procesos. Parasti sudraba piedevas var izmantot kā terminālo oksidētāju vai halogēnīdu saistītāju, tomēr daudzi pētījumi par heterometālisku Pd-Ag katalīzi liecina, ka palādijs un sudrabs var darboties kopā visa katalītiskā cikla laikā. Dažos gadījumos sudraba karboksilāti var tieši aktivizēt (sašķelt) C-H saites arēnos,

veidojot arilsudraba(I) savienojumus. Šie arilsudraba starpprodukti pēc tam var pārnest arilgrupu uz palādija kompleksu, palīdzot veidot vēlamo produktu.⁵⁸

Dažādu terpēnu dabasvielu aminoatvasinājumu sintēzei ir plaši lietota neaktivētu C-H saišu pārveidošana par C-N saitēm, izmantojot C-H funkcionalizēšanas metodi (11. shēma). Šajā gadījumā metāla-nitrenoīda daļiņas kalpo kā izšķirošs starpprodukts C-H saites šķelšanas procesā, kas rodas, pārnesot nitrēna grupu no aminēšanas aģenta uz metāla centru. Ar virzītu nitrēna iespīšanās ir panākta intramolekulāra aminēšana, izmantojot dažādas aminoskābes vai azīdu grupas, piemēram, sulfonamīdus, sulfamīdus, sulfamātus, karbamātus vai azīdus, sulfonilazīdus un karbonilazīdus. Piemēram, lēlamīna azidoatvasinājums **43** paaugstinātā temperatūrā un dzelzs katalizatora **44** klātienē tika izmantots kā nitrēna prekursors, iegūstot pirolidīna atvasinājumu **45** (11. shēma). No artemizīna atvasināts karbamāts **46** un sulfamāts **47** rodīja katalizatora un PIDA klātienē tika attiecīgi ciklizēti par oksazolidinonu **48** un oksatiazinānu **49**, uzrādot viens otram pretēju nitrēna C-H iespīšanās reģioselektivitāti.

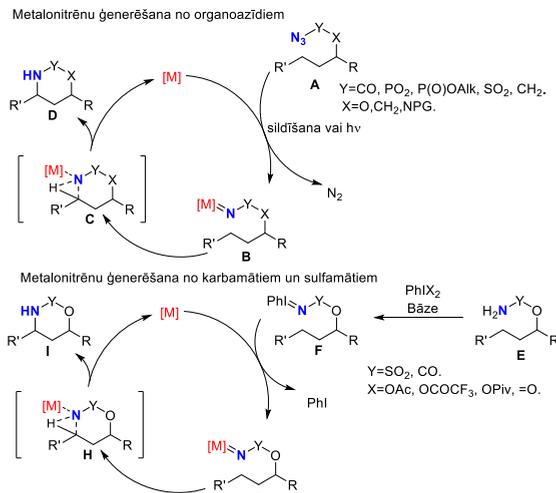


11. shēma. Lēlamīna azidoatvasinājuma **43**,⁵⁹ artemizīna karbamāta **46** un sulfamāta **47**⁶⁰ iekšmolekulārā C-H aminēšana.

Metalonitrēnu **B** var iegūt, apstarojot ar UV gaismu vai termiski sadalot organozīdus **A** piemērota pārejas metāla klātbūtnē (12. shēma). Arī karbamāti un sulfamāti kalpo kā efektīvi nitrēna prekursori hipervalentā joda reaģentu klātbūtnē, veidojot starpproduktus **F**, kas tālāk mijiedarbojas ar pārejas metāla katalizatoru un izveido vēlamo metalonitrēnu **G**. Iekšmolekulāras nitrēna iespīšanās reakcijas ir pierādījušas sevi kā spēcīgu paņēmienu dažādu *N*-heterociklu sintēzē, nodrošinot augstu ķīmisko un reģioselektivitāti. Tomēr sulfamāta un karbamāta ciklizācija var notikt arī pa radikāļu ceļu bez pārejas metālu starpniecības, kā Hofmana-Leflera-Freitāga reakcijas variācija vai arī kā π -selektīva Luisa skābes katalizēta amīnu pievienošana nepiesātinātām sistēmām.^{61,62}

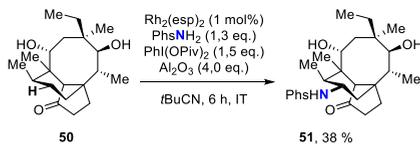
Par pēdējo gadu sasniegumiem oksatiazināna ciklu sintēzē no sulfamātu esteriem, ieskaitot nitrēna tipa intermediātu lietojumu, kādi tiks apskatīti arī šī darba 2.2. apakšnodaļā, var lasīt apskatītajā: Kroškins, V., Turks, M. Recent investigations in synthesis of oxathiazinanes by

sulfamate ester cyclization (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2023**, *59*, 637–639. (4. pielikums).



12. shēma. Metalonitrēnu ģenerēšanas mehānismi un sekojoša iespējamās C-H saitē.

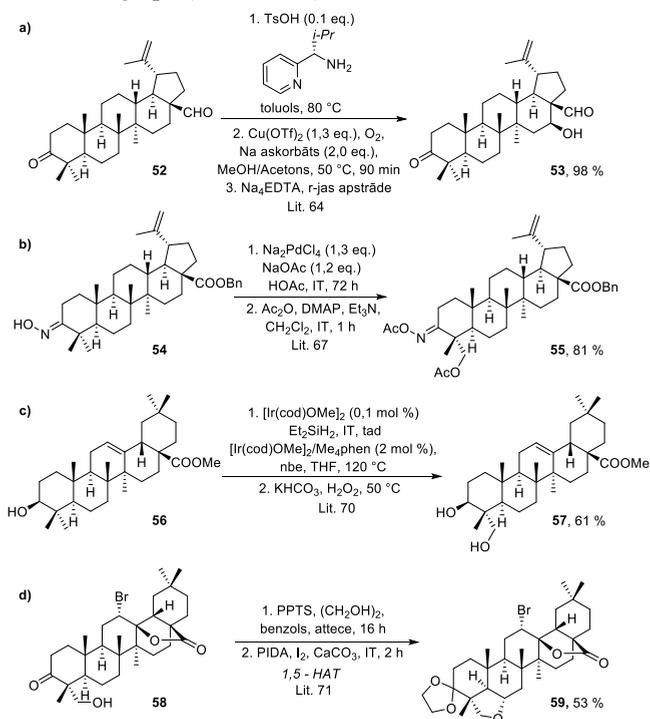
Starpmolekulārajai C-H iespējamās pieejai nav nepieciešams sintētiski ievadīt virzošo grupu, tomēr, to lietojot, parasti tiek novērota zemāka selektivitāte. Piemēram, fenilsulfamāts (PhsNH₂) rodīja katalizatora un PhI(OPiv)₂ klātbūtnē tika izmantots kā starpmolekulārs C-H aminēšanas reaģents, nodrošinot strukturāli sarežģītas dabavienas **50** C-N saites veidošanos ar 38 % iznākumu (13. shēma).⁶³



13. shēma. Dabavienas **50** iekšmolekulārā C-H aminēšana.

Lielākā daļa zināmo sintētisko pārvērtību pentaciklisko triterpenoīdu funkcionalizēšanai ietver biogēno C(3) un C(28) C-O funkcionalitāšu un pieejamās dubultsaites izmantošanu.²⁴ Tomēr jāatzīmē, ka PCT terpenoīdā struktūra ir bagāta ar daudzām C(sp³)-H saitēm, ko teorētiski varētu funkcionalizēt, izmantojot pārejas metālu katalizētu C-H aktivācijas pieeju. Savukārt reakcijas spējas un reģioselektivitātes problēmas var apgrūtināt PCT ciklu tiešu funkcionalizēšanu. Priekšnoteikums šādu sarežģītu savienojumu reģioselektīvai derivatizācijai, aktivējot C-H saites, ir funkcionālu virzošo grupu klātbūtne struktūrā.

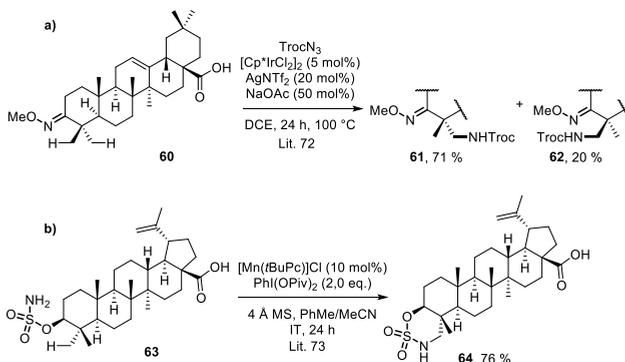
Literatūrā ir tikai daži $C(sp^3)$ -H aktivācijas piemēri PCT policikliskajā struktūrā (14. shēma). Ju (*Yu*) grupa^{64,65} ir aprakstījusi dažādu pentaciklisko triterpenoīdu reģiosektīvu C-H hidroksilēšanu, izmantojot Šēnekera (*Schönecker*) un Barana (*Baran*) vara katalizētos aerobos apstākļus ($\text{Cu}(\text{OTf})_2$, O_2) (14. a shēma). Šajā gadījumā oksidēšanas vietas selektivitāti noteica pārējo hirāla iminopiridīna virzošā grupa, kas tika ievadīta, izmantojot viegli pieejamu C(28) aldehīdu. Vairākas pētnieku grupas ir lietojušas Baldvina⁶⁶ (*Baldwin*) izstrādātās pieejas izmantošanu hidroksilgrupas selektīvai ievadīšanai neaktivētā C(23) metilgrupā (14. b shēma).^{67,68,69} Savukārt oleanolskābes C(23) reģiosektīvu oksigenēšanu, izmantojot irīdija katalizētu C(3) hidroksilgrupas virzītu siliļēšanu/Tamao-Fleminga oksidēšanas sekvenci, ir izpētījusi Hartviga (*Hartwig*) grupa (14. c shēma).⁷⁰ Jāatzīmē, ka Maulides (*Maulide*) grupa⁷¹ nesēn aprakstīja B gredzena reģiosektīvu C-H oksidēšanu oleanāna struktūrā, izmantojot C(23)-OH funkcionalitāti kā virzošo grupu (14. d shēma).



14. shēma. Literatūrā aprakstītie pentaciklisko triterpenoīdu C-H oksidēšanas piemēri.

Runājot par aminēšanas reakcijām, Lu (*Lu*) grupa ir izstrādājusi irīdija katalizētu $C(sp^3)$ -H aminēšanas reakciju oleanonskābes metiloksīma C(23) pozīcijā, izmantojot TrocN₃ kā amīna prekursoru (15. a shēma).⁷² Betulīna karkass ir pētīts $C(sp^3)$ -H aminēšanā, kas tika panākts ar metalonitrēna izveidi no sulfamāta estera **63**. Vaitas (*White*) grupa ir atklājusi, ka $[\text{Mn}(t\text{BuPc})]\text{SbF}_6$

katalizators veicina C-N saites veidošanos pie ekvatoriālās C(23) metilgrupas γ -C-H saites un nodrošina labu oksatiazinānu **64** iznākumu ar augstu reģio- un diastereoselektivitāti (15. b shēma).⁷³

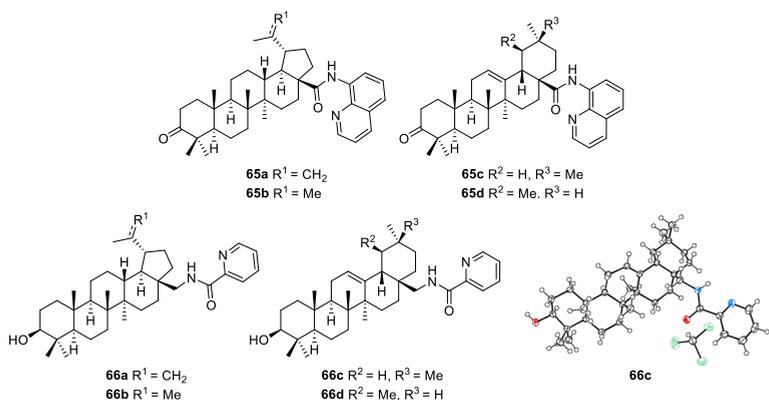


15. shēma. Literatūrā aprakstītie C-H pentaciklisko triterpenoīdu aminēšanas paņēmieni.

Pēc promocijas darba autora rīcībā esošās informācijas bez iepriekšminētajiem dažiem C-H hidroksilēšanas piemēriem un diviem vienīgajiem C-H aminēšanas piemēriem literatūrā nav datu par C-C saīšu veidojošām C-H aktivācijas pieejām pentaciklisko triterpenoīdu molekulārajos karkasos. Tomēr ir aprakstīti daži veiksmīgi mazāku dabisko terpēnu molekulu C(*sp*³)-H arilēšanas piemēri.⁷⁴ Turklāt pēdējās desmitgades laikā ir izstrādātas vairākas C(*sp*³)-H arilēšanas stratēģijas, izmantojot dažādas virzošās grupas un katalītiskās sistēmas, kas ir piemērotas sarežģītu molekulu vēlinājai funkcionalizēšanai.^{75, 76, 77, 78} Līdz ar to šajā promocijas darbā tika izstrādāta iepriekš neaprašītu palādija katalizētu pentaciklisko triterpenoīdu C(*sp*³)-H (het)arilēšana, kā arī rodīja katalizētu betulīna karkasa D- un E-ciklu C-H aminēšana ar sekojošu aminogrupas funkcionalizēšanu.

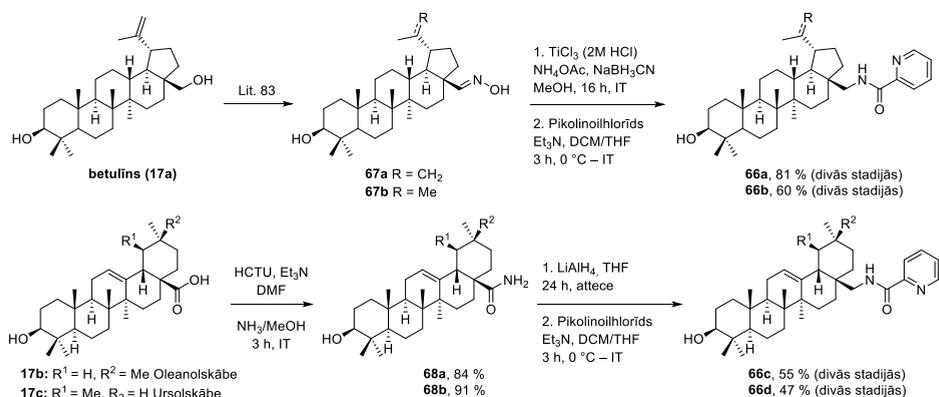
2.1. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H (het)arilēšana un azetidīnēšana

Pentaciklisko triterpenoīdu C(*sp*³)-H (het)arilēšanas pētījumi tika iesākti, iegūstot atvasinājumus, kas satur Dauguļa izstrādātās 8-aminohinolīnamīda un pikolīnamīda virzošās grupas.⁷⁹ Vienkāršākajā gadījumā tās ir savienotas ar triterpenoīda skeletu kā karboksamīdi **65a-d**, kas iegūstami no dabīgajām triterpēnkarbonskābēm, vai ar konformacionāli fleksiblāku -CH₂-NH- saiti **66a-d** (8. att.).



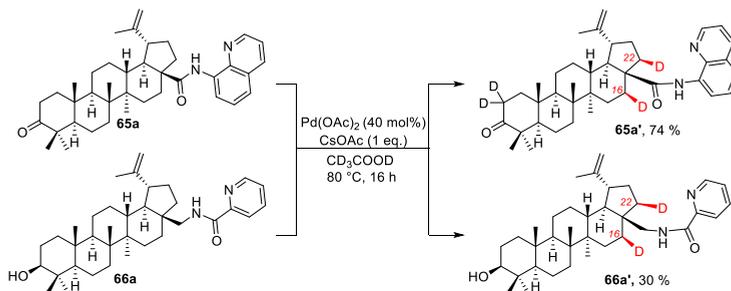
8. attēls. Triterpēnkarbonskābju 8-aminohinolīnamīdi **65a-d** un pikolīnamīdi **66a-d**.

8-Aminohinolīna amīdi **65a-d** tika iegūti amidēšanas reakcijās starp betulonskābi, ursonskābi, oleanonskābi **18a-c** un 8-aminohinolīnu, iepriekš pārveidojot šīs skābes par attiecīgajiem skābes hlorīdiem.^{80,81} Pikolīnamīda⁸² virzošā grupa tika ievadīta, izmantojot triterpenoīda C(28)-amīnu reakciju ar pikolinoilhlorīdu. Betulīnamīns un tā piesātinātais analogs tika iegūti, reducējot atbilstošos oksīmus⁸³ **67a** un **67b**. Komerčiāli pieejamās oleanolskābes un ursolskābes tika pārveidotas par atbilstošajiem amīniem divos posmos.^{84,85} *In situ* ģenerētie aktivētie esteri tika pārveidoti par amīdiem **68a** un **68b**, kuru reducēšana ar LiAlH₄ deva attiecīgos pirmējos amīnus, kas tika pārveidoti par pikolīnamīdiem **66a** un **66b**, izmantojot iepriekš izstrādātus reakcijas apstākļus (16. shēma).



16. shēma. Pikolīnamīdu **66a-d** sintēze.

Lai izpētītu virzošo grupu saturošu PCT atvasinājumu spēju kompleksēt palādiju un veidot C-H deiterēšanas produktus, kas parādītu C-H aktivācijas procesa iespējamību, izejvielas **65a** un **66a** tika pakļautas C-H deiterēšanas eksperimentiem, izmantojot deiterētu etiķskābi kā šķīdinātāju Pd(OAc)₂ un CsOAc klātbūtnē (17. shēma). Abi substrāti nodrošināja C(16)/C(22) dideiterētus produktus. Balstoties daudzsoļosās C-H aktivācijas iespējās, tika pārbaudīti iespējamie reakcijas apstākļi C-H arilēšanas reakcijai. Pārsteidzoši, bet hinolīnamīda **65a** gadījumā visos izskatītos reakcijas apstākļos C-H arilēšana netika novērota.

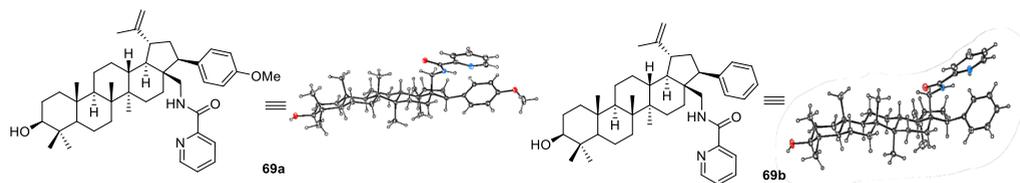


17. shēma. Savienojumu **65a** un **66a** C(sp³)-H deiterēšana; skābās -OH un -NH grupas ir attēlotas to nedeiterētā formā, jo produktu izdalīšanas procesā notiek ātra apmaiņa pret protoniem.

Tomēr konformacionāli elastīgākais pikolīnamīds **65a** izrādījās derīgs C-H arilēšanas reakcijām. Pikolīnamīda **66a** (1 eq.), 4-jodanizola (4 eq.), Pd(OAc)₂ (5 mol.%), CuBr₂ (10 mol.%)⁸⁶ un CsOAc (4 eq.) kombinācija, kā šķīdinātāju izmantojot *t*-AmOH, uzrādīja vislielāko efektivitāti, dodot C(22)- un C(16)-reģioizomēru **69a** un **70a** maisījumu attiecībā 92 : 8 ar 83 % kopējo iznākumu. Ar šiem C(sp³)-H arilēšanas apstākļiem tika pārbaudīts ariljodīdu komponentu klāsts (1. tabula). Elektronbagātīe ariljodīdi uzrādīja labu reakcijas spēju, un C(sp³)-H arilēšanas produkti **69a-d/70a-d** tika iegūti ar kopējiem iznākumiem 50–83 % diapazonā (1. tabula). Divu arilēto savienojumu **69a,b** molekulārās struktūras tika nepārprotami pierādītas, izmantojot rentgenstruktūranalīzi (9. att.). Visos gadījumos tika novērota arī C(22)-azetidīna blakusprodukta **71** veidošanās. Elektrondeficītie jodarēni deva zemākus arilēto reģioizomēru iznākumus 29–54 % robežās. Savukārt jodarēni ar tādiem aizvietotājiem kā -COOMe, -C(O)Me, -CN, -Cl, -NO₂ (1. tabula) deva azetidīnu **71** kā galveno produktu ar iznākumiem 40–64 % robežās. Visaugstākais azetidīna iznākums tika novērots ar I-C₆H₄-CN (64 %), savukārt I-C₆H₄-NO₂ izmantošana nodrošināja selektīvu azetidīna veidošanos ar 61 % iznākumu, kas atviegloja tā izdalīšanu un attīrīšanu. Azetidīni kā C(sp³)-H arilēšanas blakusprodukti ir aprakstīti iepriekš. Piemēram, Vu (*Wu*) grupa iepriekš ir publicējusi mērķtiecīgu C-H azetidīnēšanas protokolu, izmantojot AgOAc/C₆F₅I uz vienkāršiem modeļsubstrātiem.⁸⁷ Ir zināma arī azetidīnu veidošanās no pikolīnamīdiem Pd-katalizatora, Phi(OAc)₂ un Li₂CO₃ klātbūtnē.^{88, 89} Tomēr mēģinājumi, izmantot iepriekš minētos apstākļus bez vara piedevas, neuzrādīja izejvielas **66a** konversiju.

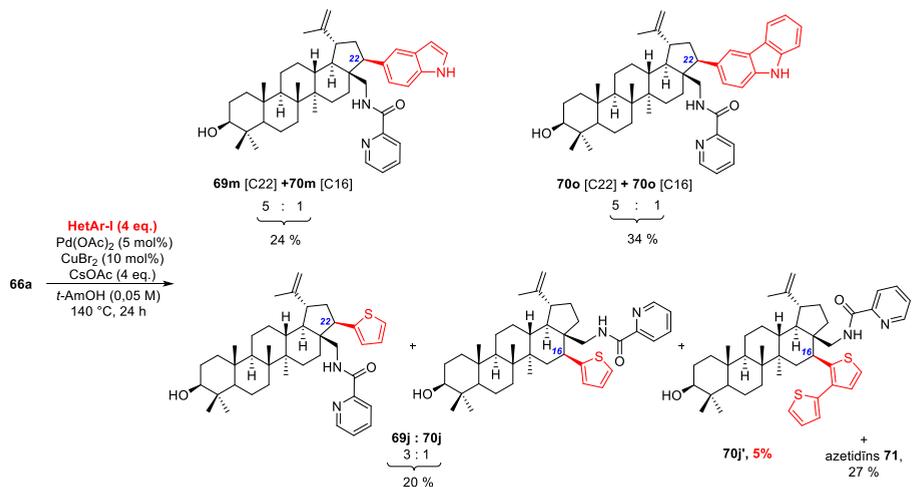
Pikolinamīda **66a** C(sp³)-H arilēšanas substrātu klāsts un produktu iznākumi

Ar	69a-i iznākums (%)	70a-i iznākums (%)	71 iznākums (%)
	69a , 76	70a , 7	10
	69b , 64	70b , 9	26
	69c , 60	70c , 5	19
	69d , 45	70d , 6	10
	69e , 32	70e , 6	36
	69f , 32	70f , 6	56
	69g , 22	70g , 7	40
	69h , 19	70h , 12	64
	69i , 42	70i , 12	44
	-	-	61

9. attēls. Savienojumu **69a** un **69b** rentgenstruktūranalīze.

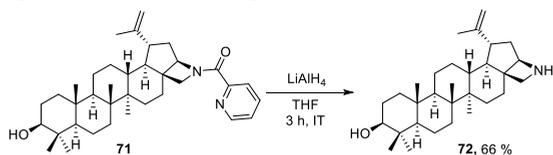
Tika pārbaudītas arī izejvielas **66a** C(sp³)-H (het)arilēšanas reakcijas ar 4-jod-*N,N*-dimetilaniilīnu, 3-jodpiridīnu un 4-jod-1-metil-1*H*-pirazolu, taču izejvielas konversija netika novērota. Tomēr heteroarilēšana ar 5-jodindolu un 7-jodkarbazolu deva rezultātu, un sagaidāmie arilēšanas produkti **69m/70m** un **69o/70o** tika izdalīti attiecīgi ar 24 % un 34 % iznākumu, bet šoreiz bez azetidīna blakusprodukta veidošanās (18. shēma). Reakcija starp **66a** un 2-jodtiofēnu

deva produktu **69j/70j** un azetidīnu **65**, bet papildus tam tika novērots arī diarilēts produkts **70j'** 5 % apmērā. Interesanti, ka otrā C-H aktivācija tiofēna gadījumā notiek pie sākotnēji ievadītā tiofēna fragmenta produktā **70j** (18. shēma). Lai iegūtu citus dubultās arilēšanas produktus, izmantojot citus jodarēnus, tika palielināts reakcijas laiks, (het)ariljodīda komponentes koncentrāciju un katalizatora deva, tomēr nevienā citā gadījumā papildu dubultās arilēšanas produkti netika novēroti.



18. shēma. Pikolīnamīda **66a** C(sp^3)-H heteroarilēšana.

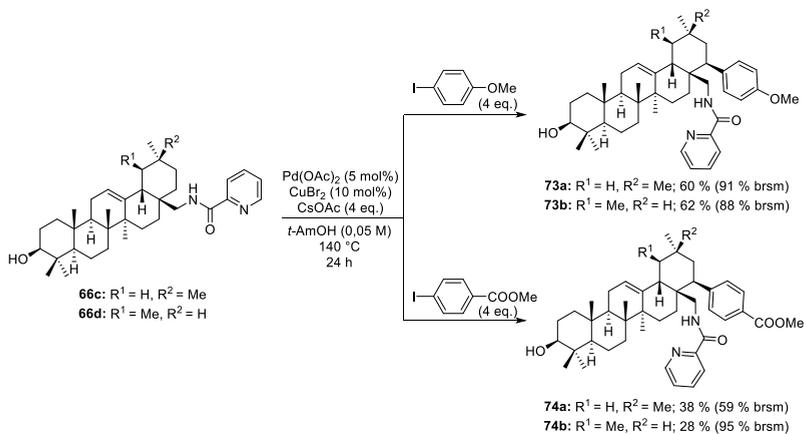
Lai nodrošinātu NH-azetidīnus tālākai sintētiskai izmantošanai, tika pētītas pikolīnamīda fragmenta šķelšanas iespējas. Reducējošie šķelšanas apstākļi, izmantojot LiAlH₄/THF istabas temperatūrā, tika atzīti par efektīviem vēlāmā produkta iegūšanai (19. shēma).



19. shēma. NH-Azetidīna **72** sintēze.

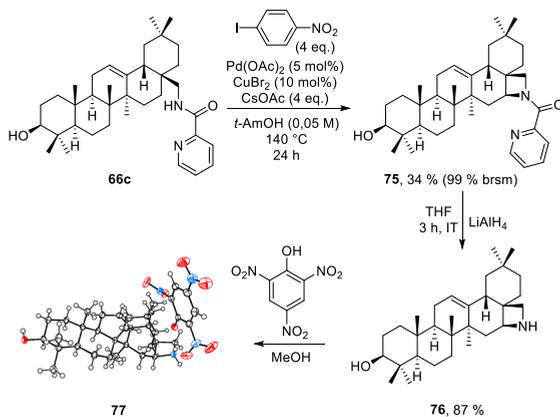
Iedvesmojoties no veiksmīgas betulīna karkasa arilēšanas, tika nolemts pētīt arī no oleanolskābes un ursolskābes pikolīnamīdu **66c,d** arilēšanu, izmantojot elektronbagāto 4-jodanizolu un elektrondeficīto 4-jodbenzoscābes metilesteri (20. shēma). Plānotā ursāna un oleanāna molekularā skeleta transformācija vainagojās ar augstāku 19 : 1 reģioselektivitāti pie C(22), tomēr pilnīga izejvielu **66c** un **66d** konversija netika sasniegta. Līdzīgi kā betulīna karkasa gadījumā elektrondeficītais 4-jodbenzoscābes metilesteris deva ievērojami zemāku arilēšanas produktu **74a,b** iznākumu nekā reakcija ar 4-jodanizolu. Turklāt oleanāna un ursāna izejvielu **66c,d**

gadījumā blakusprodukta azetidīna klātbūtne praktiski netika novērota (blakusprodukts ap vai zem KMR detektēšanas robežas).



20. shēma. Oleanāna un ursāna atvasinājumu **66c,d** C(sp³)-H arilēšana.

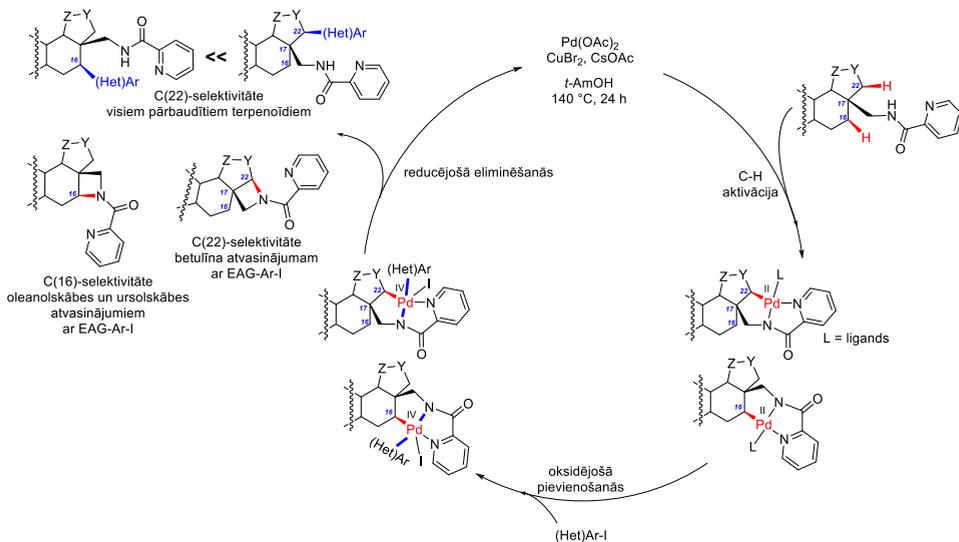
Oleanolskābes atvasinājuma **66c** C-H aktivācija 1-jod-4-nitrobenzola klātbūtnē nodrošināja izcilu C(16) selektivitāti, lai gan nedeva pilnu konversiju. Pēc virzošās grupas šķelšanas ar LiAlH₄ tika iegūts NH-azetidīns **76**. Tas tālāk tika pārveidots par kristālisku azetidīnija pikrātu **77**, kura molekulārā struktūra un līdz ar to arī C(16) reģioselektivitāte tika nepārprotami pierādīta ar rentgenstruktūranalīzes palīdzību (21. shēma).



21. shēma. Azetidīna **76** veidošanās no pikolīnamīda **66c**.

Saskaņā ar vispārpieņemto teoriju reducējošā eliminēšana, visticamāk, ir ātrumu noteicošā stadija C(sp³)-H arilēšanas procesā.⁹⁰ Analizējot novērotās ķīmiskās selektivitātes un reģioselektivitātes, var secināt, ka reducējošā eliminēšana notiek lēnāk palādija(IV) kompleksos,

kas satur elektrondeficītas arilgrupas. Šādos gadījumos reducējošā eliminēšanās ar C-N saites veidošanos var būt ātrāka par C-C saites veidošanos. Piemēram, betulīna rindā izmantojot 4-nitrojodbenzolu (4-NO₂C₆H₄I) (22. shēma), reducējošā eliminēšanās no C(22)-[Pd]-NC(O) sistēmas ir produktīvāka nekā no C(22)-[Pd]-Ar-EAG kompleksa, kā rezultātā veidojas azetidīns. Līdzīgi oleanāna rindā reducējošās eliminēšanās ātruma vispārējā tendence ir šāda: Ar-EDG > pikolinamīds > Ar-EAG. Tomēr oleanāna rindā C-H aktivācija ir lēnāka un sākotnēji notiek ar C(16) selektivitāti, padarot to kinētiski salīdzināmu ar reducējošās eliminēšanās ātrumu no C(16)-[Pd]-NC(O) starpprodukta. Līdz ar to izejviela **66c**, reaģējot ar 4-NO₂-C₆H₄I, dod azetidīnu **77** C(16) pozīcijā. Turklāt azetidīna veidošanās pie C(22) oleanāna karkasā radītu nelabvēlīgu 1,3-diaksiālo mijiedarbību ar vienu no geminālajām C(20) metilgrupām, radot stēriskus traucējumus, kas betulīna molekulārajā struktūrā nav novērojami.



22. shēma. Iespējamais palādijs katalizētas C(sp³)-H arilēšanas un azetidīnēšanas mehānisms.

Noslēgumā var secināt, ka ir izstrādāta pirmā C-C saites veidojošo C(sp³)-H aktivācijas metode triterpenoīdos, izmantojot palādijs katalizētu triterpenoīdu pikolinamīducarilēšanu ar ariljodīdiem. Visiem trim pārbaudītiem lupāna, oleanāna un ursāna molekulārajiem karkasiem var īstenot arilēšanu ar labu C(22)-selektivitāti un vidējiem līdz labiem iznākumiem. Oleanāna un ursāna atvasinājumiem tika novērota augstākā C(22)/C(16) selektivitāte (līdz 19 : 1), savukārt betulīna atvasinājumi deva augstākus iznākumus (līdz 83 %). Elektronbagātie ariljodīdi deva arilēšanas produktus, bet elektrondeficītie ariljodīdi veicina C(sp³)-azetidīnēšanu. Azetidīnēšana īpaši labi notiek 4-nitrojodbenzola klātienē, un tās reģioselektivitāte bija atkarīga no terpenoīda tipa – betulīna atvasinājumi deva C(22)-azetidīnu, savukārt oleanāna atvasinājumiem tika novērots C(16)-

azetidīns. Pikolinamīda grupu izdevās efektīvi nošķelt ar Zn/HCl. Azetidīna ciklu saturošie, kā arī arilētie triterpenoīdi piedāvā daudzsološas iespējas to tālākai izpētei medicīnas ķīmijas jomā.

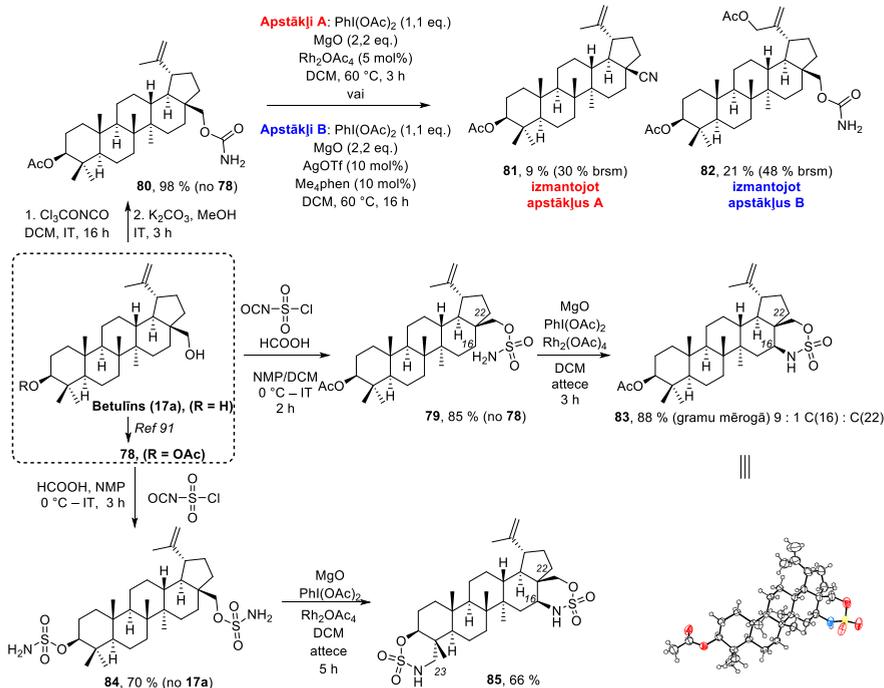
Par šiem pētījumiem var plašāk lasīt publikācijā: Kroškins, V., Lugiņina, J., Lācis, R., Kumar, D., Kumpiņš, V., Rjabovs, V., Mishnev, A., Turks, M. Palladium-catalyzed C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids. *ACS Omega*. **2025**, *10*, 27992–28019. (5. pielikums).

2.2. Pentaciklisko triterpenoīdu C-H aminēšana

Literatūrā nav publicētu precedentu par PCT skeleta D un E gredzenu C-H aminēšanu, izmantojot no C(28) atvasinātas virzošās grupas. Tomēr vairāki C-N saišu veidošanas piemēri, izmantojot starpmolekulāru C(sp³)-H aminēšanas pieeju terpēnu, steroīdu un alkaloidu molekulās, radīja interesi par attiecīgi piemērotu C(28) modificētu PCT atvasinājumu izstrādi. Šim nolūkam stika intežēti no C(28) spirta **78**⁹¹ viegli pieejamie karbamāta un sulfamāta atvasinājumi. Balstoties promocijas darba autora zinātniskās grupas iepriekšējā pieredzē, tika izvēlēts izvairīties no reakcijām, kas notiek pēc brīvo radikāļu mehānisma, lai izslēgtu dubultsaites iespējamās blakusreakcijas. Tāpēc tika attīstīta metode, kas balstās pārejas metālu katalizētu nitrēna ģenerēšanā, ņemot vērā tā iespēšanos C-H saitē.

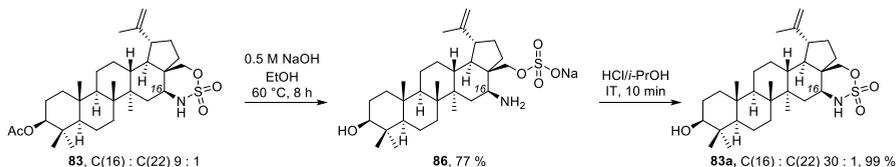
Tika atklāts, ka no betulīna atvasināts karbamāts **80** rodīja un sudraba katalītiskajos apstākļos nedod paredzētos aminēšanas produktus. Tā vietā paaugstinātā temperatūrā (60 °C spiediena mēģene) un ilgākā reakcijas laikā tika detektēti izejvielas degradācijas produkti un C(28) nitrila **81**⁹² veidošanās. Savienojuma **81** rašanos var izskaidrot ar C-H aminēšanas reakciju pie C(28), veidojot nestabilu četru locekļu ciklu, pēc kura dekarboksilēšanas un oksidēšanas PIDA klātienē varētu veidoties nitrils (23. shēma). Savukārt katalītiskajos apstākļos ar sudrabu, izmantojot dažādus sudraba avotus⁹³ (AgOTf, AgPF₆ vai AgSbF₆) kombinācijā ar MgO un PhI(OAc)₂ vai PhIO, tika novērota zema izejvielas konversija kopā ar degradēšanās produktu veidošanos. 3,4,7,8-Tetrametil-1,10-fenantrolīna (Me₄phen) kā liganda piedeva sudraba apstākļos veicināja alilpozīcijas C-H acetoksilēšanas reakciju, dodot produktu **82**.

Bija iepriecinoši konstatēt, ka sulfamāta esteris **79** pēc trīs stundām uzrādīja pilnīgu konversiju, un, reakcijas apstākļiem izmantojot 2,2 eq. MgO, 1,1 eq. PhI(OAc)₂ un 2 mol% Rh₂(OAc)₄ kombināciju⁹⁴, tika iegūti divi C-H aminēšanas reģioizomēri attiecībā 9 : 1. Pārākumā esošā izomēra **83** struktūra tika nepārprotami noteikta ar rentgenstruktūranalīzes palīdzību. Līdzīgā veidā tika sintezēts betulīna 3,28-di-O-sulfamāta esteris **84** ar 70 % iznākumu. Tas, izmantojot iepriekšējos apstākļus, tika veiksmīgi pārvērsts par dubultās C-H aminēšanas produktu **85**, veidojot C-N saites pie C(23) un C(16) pamatizomēra struktūrā (23. shēma).



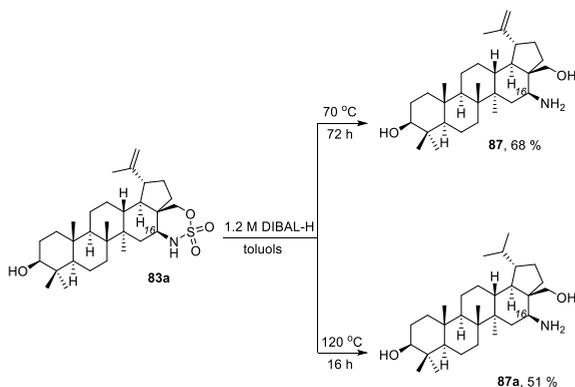
23. shēma. Betulīna karkasa C-H aminēšana.

Tālāk tika pētīta iegūtā 1,2,3-oksatiazinān-2,2-diona **77** reakcijas spēja nukleofilās cikla atvēršanas reakcijās, kas dotu pieeju 1,3-difunkcionalizētiem C(16)-aminoatvasinājumiem. Vairāki šīs pārvērtības mēģinājumi ar dažādiem nukleofiliem (N₃⁻, AcO⁻, PhS⁻, morfolīns, ūdens), nenodrošināja pat minimālu izejvielas konversiju oksatiazināna gredzena zemās elektrofilitātes dēļ. Tikai bāziskā hidrolīze, izmantojot 0,5 M NaOH etanola šķīdumu, vainagojās ar nukleofīlo uzbrukumu sēra atomam, iegūstot jonogēnu 1,3-aminosulfātu **86**. Iegūtā sulfāta nātrija sāls paskābināšana izraisīja ātru ciklizēšanos atpakaļ par oksatiazināna gredzenu, iegūstot C(3)-hidroksi-PCT oksatiazināna atvasinājumu **83a** (24. shēma). Turklāt tika novērots, ka sulfāts **80** selektīvi izgulsnējas no etanola šķīduma, kā rezultātā sākotnējā savienojuma **77** C(16):C(22) 9 : 1 reģioizomēru attiecība uzlabojas līdz 30 : 1 savienojumā **86**. Savienojuma **86** izgulsnēšanas filtrāta analīze liecināja, ka **83a** mazākumā esošais C(22)-izomērs 0,5 M NaOH etanola šķīdumā nehidrolizējas un neveido jonogēnu C(22) sulfāta produktu, kas nodrošina pietiekamu polaritātes atšķirību selektīvai izgulsnēšanai. Tika izmēģināti arī vairāki stipri skābi un stipri bāziski hidrolīzes apstākļi sulfāta grupas nošķelšanai savienojumā **86**, lai iegūtu 1,3-aminospirta atvasinājumu, taču neviens no tiem nebija efektīvs.



24. shēma. Sulfāta **86** sintēze un ciklizēšana par **83a** skābā vidē.

Tālākā darba gaitā tika pētīti reducējošie apstākļi 1,2,3-oksatiāzinān-2,2-diona cikla atvēršanai. DIBAL-H šķīdums toluolā izrādījās efektīvs, lai veiksmīgi atvērtu oksatiāzinu un izveidotu vēlamo 1,3-aminospirta atvasinājumu **87** ar 68 % iznākumu. Paaugstināta reakcijas temperatūra izraisīja ātrāku reakciju, tomēr tika novērota pilnīga dubultsaites piesātināšana (25. shēma).

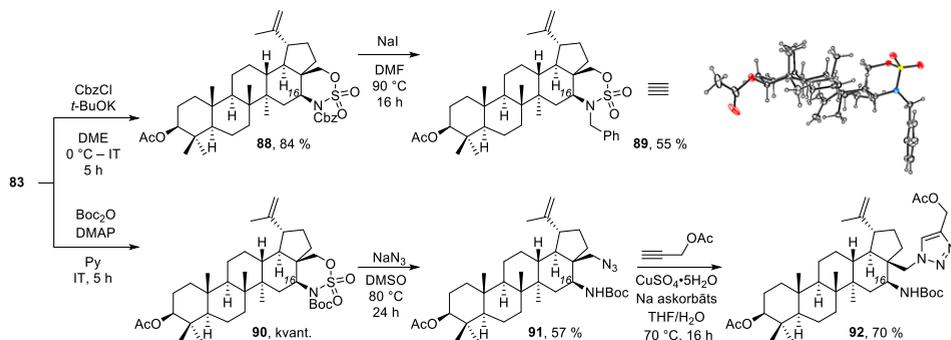


25. shēma. Savienojuma **83a** cikla atvēršana reducējošos apstākļos.

Lai palielinātu oksatiāzināna gredzena elektrofilītāti un atvieglotu gredzena atvēršanas reakcijas ar nukleofiliem, ar kuriem pirms tam reakcija nenotika, tika veiktas divas dažādas NH-grupas karbamoilēšanas reakcijas. *N*-Cbz oksatiāzināna **88** gredzena atvēršanas mēģinājumi galvenokārt beidzās ar Cbz grupas nošķelšanu, un vēlamie cikla atvēršanas produkti veidojās tikai nelielā daudzumā. Interesanti, ka jodīda nukleofila gadījumā tika novērota *N*-Cbz grupas transformācija par *N*-benzilgrupu. Tas ir skaidrojams ar Cbz grupas nošķelšanu, *in situ* dekarboksilēšanos un izveidotā benziljodīda sekojošu reakciju ar brīvo NH-grupu. *N*-Benzilblakusprodukta **89** struktūra tika nepārprotami noteikta ar rentgenstaru difrakcijas analīzi (26. shēma).

N-Boc grupas izmantošana uzlaboja oksatiāzināna reakcijas spēju, un azīda nukleofila gadījumā tika iegūts 1,3-diaizvietotais produkts **91**. Tomēr citi nukleofīlie reaģenti (acetāts, tiofenolāts, morfolīns, cianīds, tiocianāts, fenolāts, metoksīds) joprojām izraisīja *N*-Boc grupas šķelšanos, saglabājot 1,2,3-oksatiāzinān-2,2-diona gredzenu neskartu. Oksatiāzināna zemo reakcijas spēju ar nukleofiliem var skaidrot ar betulīna C(28) neopentilpozīcijas statusu, ko stēriski

traucē kvaternārais centrs pie C(17).⁹⁵ Optimālie aminoazīda **91** sintēzes apstākļi tika iegūti, izmantojot 2 eq. NaN₃ 80 °C temperatūrā DMSO šķīdumā 24 stundas. Pēc tam iegūtais azīds **91** tika izmantots vara katalizētā azīda-alkīna 1,3-dipolārā ciklopievienošanas reakcijā (CuAAC) ar propargilacetātu, iegūstot triazolu **92** (26. shēma).

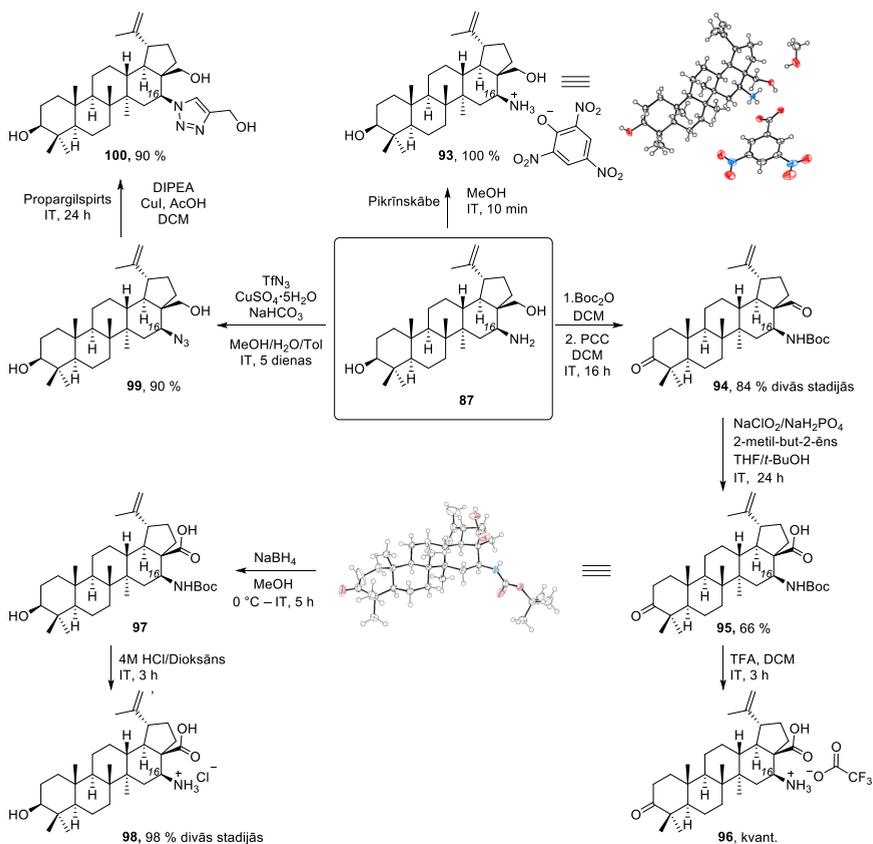


26. shēma. *N*-Aizsargātu oksatiazīnānu **88** and **90** nukleofilās cikla atvēršanas reakcijas.

Iegūtais 1,3-aminospirts **87** tika atzīts par daudzpusīgu izejvielu dažādām noderīgām sintētiskām pārvērtībām. Tā reakcija ar pikrīnskābi deva pikrāta sāli **93**, kura struktūra tika pierādīta ar rentgenstruktūranalīzi (27. shēma). Amīna aizsargāšana ar Boc grupu un sekojoša divu stadiju oksidēšana deva *N*-Boc-β-aminobetulīnskābi **95**, kuras diastereoselektīvā reducēšana pie C(3) deva *N*-Boc-β-aminobetulīnskābi **97**.

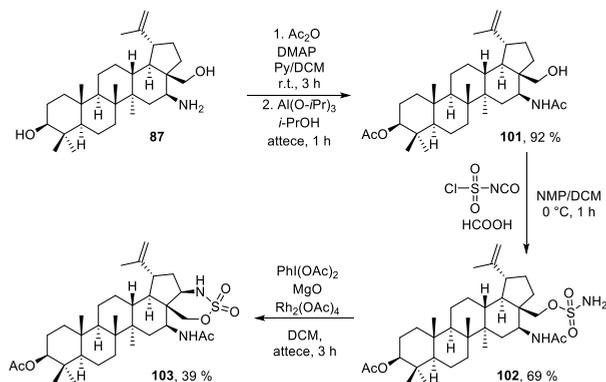
Abu aminoskābju Boc grupu nošķelšanu var panākt ar TFA, iegūstot atbilstošās β-aminoskābes to trifluoracetāta sāls formā. Tomēr betulīnskābes atvasinājuma **97** gadījumā tika konstatēta C(3) hidroksilgrupas trifluoracilēšana. Tādēļ tika piemeklēti alternatīvi apstākļi, un 4M HCl/dioksānā izmantošana veiksmīgi nodrošināja β-aminoskābes **98** rašanos hidrogēnhlorīda sāls formā.

Tālāk 16-azidobetulīns **99** tika veiksmīgi iegūts no atbilstošā amīna, izmantojot trifluormetānsulfonilazīdu vara(II) piedevas klātbūtnē. Savienojuma **99** CuAAC reakcijā ar propargilspirtu tika iegūts C(16)-triazolilbetulīns **100**, kas kā modeļsavienojums parāda iespējas praktiski bezgalīgai jaunu betulīna-triazola konjugātu bibliotēkai (27. shēma).



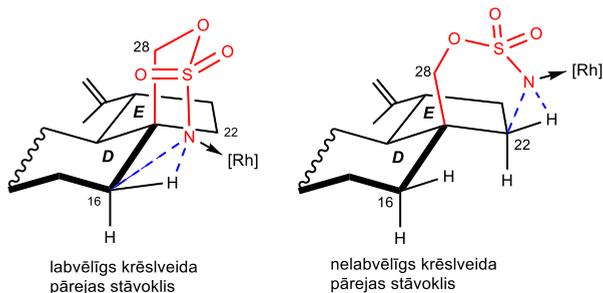
27. shēma. 1,3-Aminospirta **87** sintētiskās transformācijas.

Tālākā darba gaitā tika pārbaudīts, vai ir iespējams vēlreiz veikt C-H aminēšanas reakciju un ievadīt otru aminogrupu triterpenoīda struktūrā, izmantojot tādu pašu C(28) sulfamāta esterī. Šim nolūkam tika iegūts diacetāts **101**, izmantojot betulīna ķīmijā zināmu acilēšanas/deacilēšanas stratēģiju. Tad tas 0 °C temperatūrā tika apstrādāts ar *in situ* sagatavotu sulfamoilhlorīdu, iegūstot sulfamāta esterī **96**, kas tika pakļauts iepriekš izmantotajiem C-H aminēšanas apstākļiem. Mērķa oksatiazināns **103** pie betulīna C(22) tika iegūts ar vidēju iznākumu (28. shēma). Visdrīzāk, savienojuma **103** oksatiazināna ciklu var tālāk pārveidot līdzīgā veidā kā savienojumā **83**, kas paver vairākus potenciālus ceļus betulīna molekulārā karkasa tālākām transformācijām.



28. shēma. Sulfamāta **102** sintēze un pielietojums C-H aminēšanas reakcijā pie C(22).

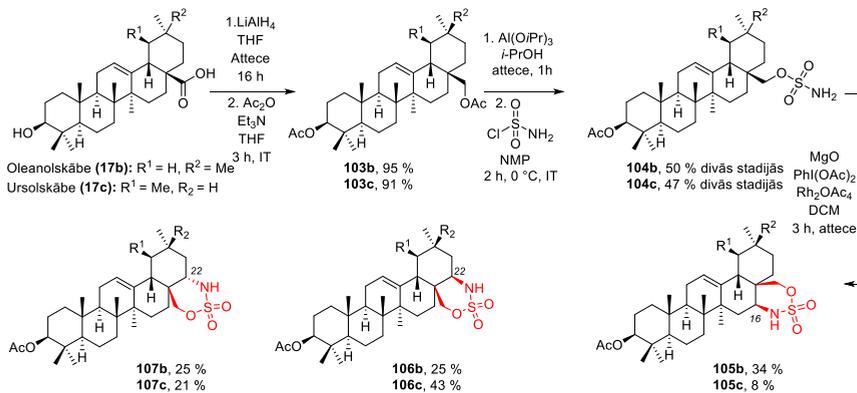
C-H aktivācijas reģio- un diastereoselektivitāti, visticamāk, nosaka substrāta kontrole. Metalonitrēna intermediāts iespējās izejvielas **79** D-cikla ekvatoriālajā C-H saitē, nodrošinot produkta **77** veidošanos, kas satur jaunizveidoto ciklu stabilā krēsla konformācijā. Lupāna tipa PCT telpiskā uzbūve neļauj izveidot jaunu ciklu krēsla konformācijā pie E-gredzena (10. att.).



10. attēls. C-H iespēšanās iespējamie pārejas stāvokļi pie C(16) un C(22).

Visbeidzot, tika iesākti arī pētījumi par ursāna un oleanāna tipa sulfamāta esteru **104b,c** C-H aminēšanu. Izejvielas tika iegūtas no atbilstošajām komerciāli pieejamajām skābēm **17b,c** četrās stadijās. Iepriekš izmantotie C-H aminēšanas apstākļi deva pilnu izejvielas konversiju dažu stundu laikā, abos gadījumos iegūstot trīs produktu maisījumu: C(16) aminētu produktu **105b,c** un C(22) aminētu produktu diastereoizomēru maisījumu **106b,c** un **107b,c** (29. shēma). Ursāna struktūras C-H aminēšana izrādījās selektīvāka pret C(22) aminētu produktu, domājams, metilgrupu alternatīvā novietojuma dēļ E gredzenā. Tomēr ursāna gadījumā kopējais izolētais iznākums ir zemāks nekā oleanāna sērijā, kas skaidrojams ar ursāna tipa savienojumu sliktāku šķīdību organiskajos šķīdinātājos un tehniski sarežģītāku izdalīšanas procedūru. Reģioselektivitātes kritumu, salīdzinot ar betulīna molekulāro karkasu, var skaidrot ar atšķirīgo ursāna un oleanāna tipa PCT E gredzena izmēru un ortogonālo ekspozīciju, kam vairs nav *trans*-dekalīnam līdzīgā

struktūra. Lai iegūtu oksatiazināna cikla atvēršanas produktus un atvieglotu reģio- un diastereoizomēru atdalīšanu, aminēto savienojumu **105b-107b** un **105c-107c** maisījumi tika pakļauti sārmainās hidrolīzes apstākļiem, tomēr šīs reakcijas neuzrādīja izejvielu konversiju. Tālākie C-H aminēšanas un iegūto produktu sintētiskā lietojuma pētījumi ursāna un oleanāna tipa PCT rindās tiks veikti citu projektu ietvaros nākotnē.



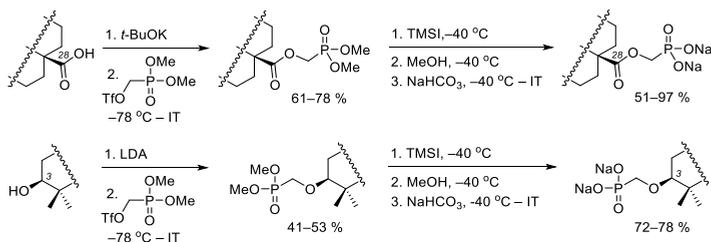
29. shēma. Oleanāna un ursāna atvasināto sulfamātu esteru **105b,c** sintēzē un izmantošanā C-H aminēšanas reakcijā.

Kopumā var teikt, ka ir izstrādāta jauna metode selektīvai C(16)-N saites veidošanai betulīna D-ciklā, izmantojot rodīja katalizētu nitrēna C-H iespiešanos. Reakcijspējīgais sulfamāta esteris tika iegūts no dabīgā betulīna vairākos soļos. Neraugoties uz stēriskajiem traucējumiem un iespējamām pārgrupēšanās reakcijām C(28) pozīcijā, tika izstrādātas vairākas veiksmīgas oksatiazināna gredzena atvēršanas reakcijas: 1) reakcija ar NaOH deva aminosulfāta sāli; 2) reakcija ar NaN₃ veidoja 1,3-aminoazīdu, kas tika pārveidots par γ -amino C(28)-triazoliem; 3) reducējošā cikla atvēršana deva 1,3-aminospirtu, kas tālāk tika pārvērsts 16-aminobetulīnskābē un betulonskābē. Turklāt 16-aminobetulīnu var pārvērst par 16-azidobetulīnu. Tika parādīts, ka pēc C(16) funkcionalizēšanas iespējama arī otra nitrēna C-H iespiešanās C(22) pozīcijā. Izstrādātā metode nodrošina vairākus jaunus lupāna tipa triterpenoīdu atvasinājumus ar amino- vai azidogrupām, kas var būt noderīgas izejvielas turpmākai modificēšanai un bioloģiskās aktivitātes izpētei.

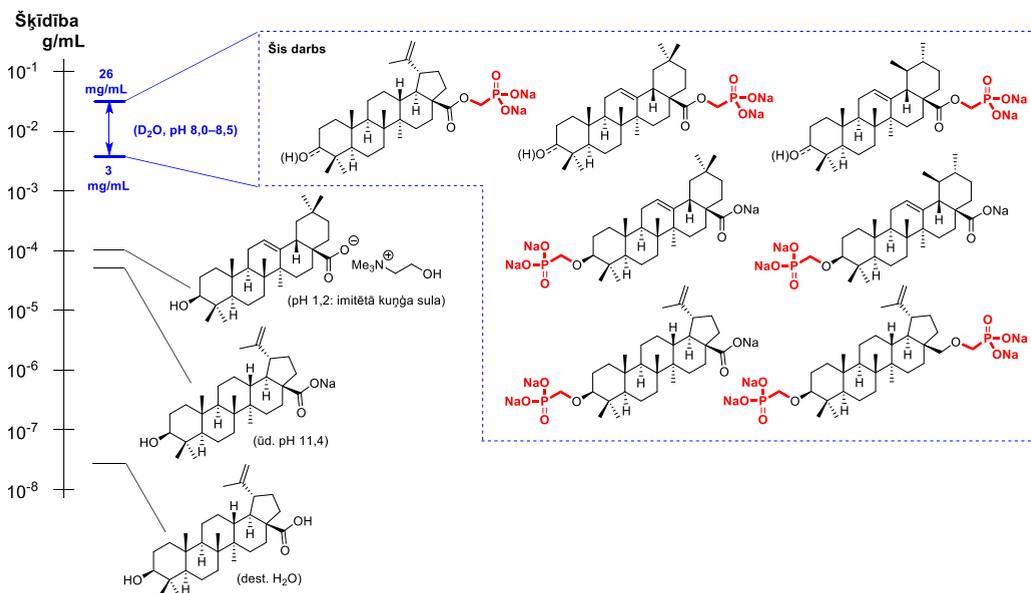
Plašāk par šajā nodaļā aprakstītajiem pētījumiem var lasīt: Kroškins, V., Lugiņina, J., Lācis, R., Mishnev, A., Turks, M. Site-selective C-H amination of lupane type triterpenoids. *Eur. J. Org. Chem.* **2025**, 2500340. (6. pielikums).

SECINĀJUMI

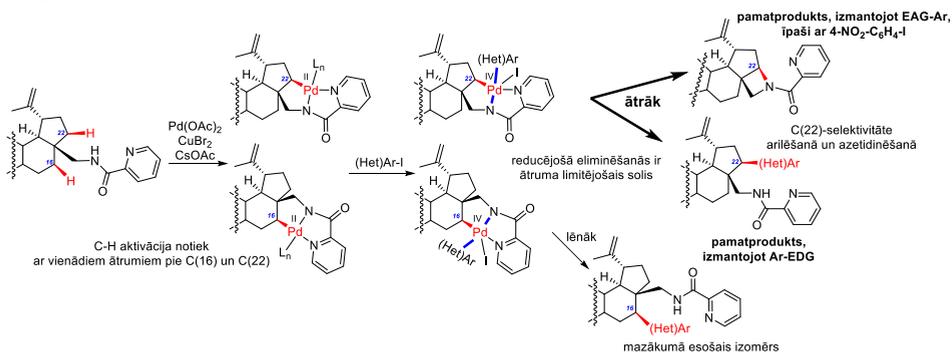
1. Neskatoties uz C(3) un C(28) neopentilnovietojumu, pie tiem esošās HO-grupas ir iespējams alkilēt, izmantojot (dimetoksifosforil)metiltrifluormetānsulfonātu. Alkilēšanu var panākt bāziskos apstākļos, izmantojot *t*-BuOK karbonskābes gadījumā un LDA spirtu gadījumā. Iegūtos metilfosfonāta starpproduktus var selektīvi demetilēt, izmantojot TMSI, vienlaikus saglabājot jaunizveidoto karbonskābes estera funkcionalitāti. Demetilēšanas selektivitāti var panākt, veicot visu procesu, ieskaitot neutralizācijas posmu, aptuveni $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.



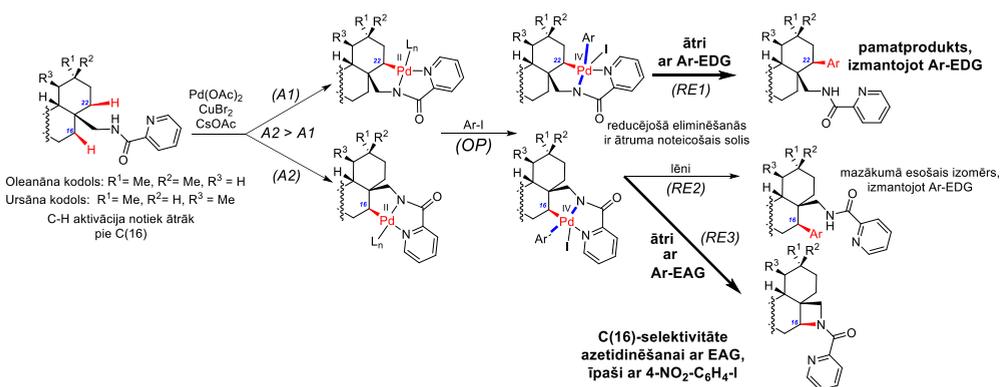
2. Iegūtie pentaciklisko triterpenoīdu-fosfonātu konjugāti C(28)(CO)-O-CH₂-P(O)(ONa)₂ un C(3/28)-O-CH₂-P(O)(ONa)₂, kam raksturīgs īsākais iespējamais metilēntiltnišs starp terpenoīda karkasu un fosfonāta daļu, uzrāda ievērojamu šķīdību ūdenī pH diapazonā no 8,0 līdz 8,5 (3–26 mg/mL). Šī šķīdība ir par vairākām kārtām augstāka nekā attiecīgajām triterpēnkarbonskābēm vai to sāļiem.



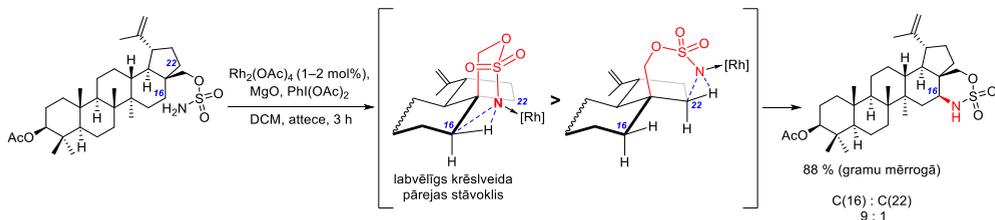
3. Betulīna rindā ātra un neselektīva C-H aktivācija notiek gan ar C(16)-H, gan ar C(22)-H, ko pierāda deiterēšanas eksperimenti, izmantojot gan pikolinamīda, gan hinolinamīda virzošās grupas. Selektivitāti sekojošajās C-H arilēšanas un azetidīnēšanas reakcijās galvenokārt nosaka reducējošās eliminēšanas stadija, kas šajā substrātu klasē abos gadījumos vieglāk notiek pie C(22). Arilgrupas ar elektronakceptoriem aizvietotājiem (piemēram, 4-nitrofenilgrupa) veicina C-N saiti dodošo reducējošo eliminēšanos, kā rezultātā veidojas C(22)-azetidīns. Savukārt arilgrupas ar elektronadoriem aizvietotājiem veicina ātrāku reducējošo eliminēšanos no C-[Pd]-Ar starpproduktiem, kā rezultātā galvenokārt veidojas C(22)-arilēti produkti ar selektivitāti līdz 9 : 1.



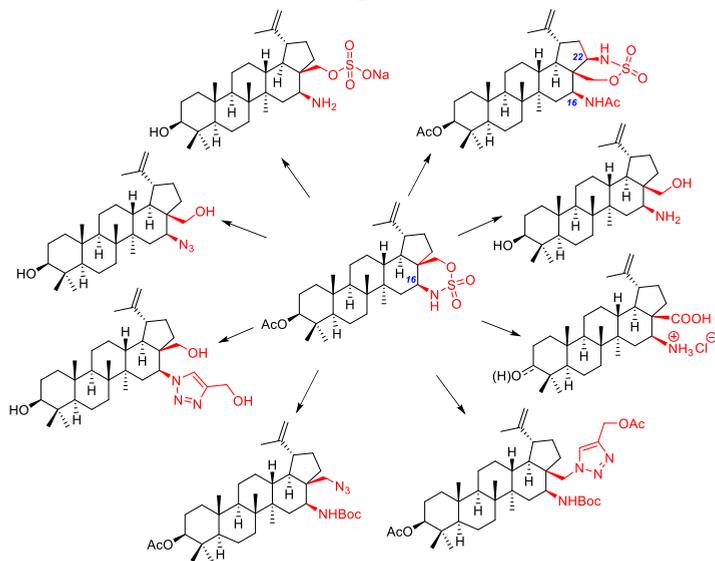
4. Ursāna un oleanāna tipa savienojumos C-H aktivācijas solis notiek ar C(16)-H selektivitāti (A2 > A1) un ir lēnāks nekā betulīna sērijā. Lietojot arilgrupas ar elektronakceptoriem aizvietotājiem (piemēram, 4-nitrofenilgrupu) C-H aktivācijas ātrums (A2 solis) kļūst salīdzināms ar reducējošās eliminēšanas ātrumu (RE3) no C(16)-[Pd]-NC(O) starpprodukta, kā rezultātā veidojas C(16)-azetidīna produkti. Toties, izmantojot arilgrupas ar elektronadoriem aizvietotājiem, reducējošās eliminēšanās relatīvie ātrumi atbilst secībai RE1_{EDG} > RE2 >> RE3, dodot priekšroku C(22)-arilētu produktu veidošanai ar C(22)/C(16) selektivitāti 19 : 1.



5. No betulīna atvasinātais 28-*O*-sulfamāta esteris ir efektīvs nitrēna prekursors rodīja katalizētos apstākļos. Nitrēna iespīšanās C-H saitē notiek ar labu C(16)-H selektivitāti, dodot oksatiazināna produktu ar teicamu iznākumu multigramu mērogā.



6. Oksatiazīna ciklu var efektīvi atvērt ar azīda un hidrīda nukleofīliem, iegūstot starpproduktus, kas ir piemēroti tālākai funkcionalizēšanai. Izstrādātā metodoloģija ļauj sintezēt lupāna atvasinājumus ar dažādām modifikācijām C(16) un C(28). Svarīgi, ka pēc betulīna C(16)-funkcionalizēšanas joprojām ir iespējama arī nākamā nitrēna C-H iespīšanās, un tā notiek selektīvi C(22)-H pozīcijā.



Pateicības

Paldies:

- Latvijas Republikas Ekonomikas ministrijai par finansiālo atbalstu (Nr. VPP-EM-BIOMEDICINA-2022/1-0001 “Valsts pētījumu projekts biomedicīnas, medicīnas tehnoloģiju un farmācijas jomā”, projekts *BioMedPharm*);
- Kristapa Kļaviņa grupai par HRMS analīzēm;
- Anatolijam Mišņevam par rentgenstruktūranalīzēm;
- visai OĶTI grupai un īpaši Rihardam Lācim, Elzai Fedorovskai, Renāram Ozoliņam un Dinešam Kumaram par viņu ieguldījumu šī darba izstrādē;
- Jevgeņijai Lugiņinai un Mārim Turkam par pacietīgu un viedu vadīšanu, kā arī milzīgo atbalstu gadu gaitā!

DOCTORAL THESIS PROPOSED TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR PROMOTION TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE

To be granted the scientific degree of Doctor of Science (Ph.D), the present Doctoral Thesis has been submitted for defence at the open meeting of RTU Promotion Council on 13 November 2025, at the Faculty of Natural Sciences and Technology of Riga Technical University, Paula Valdena iela 3, Room 272.

OFFICIAL REVIEWERS

Head of Laboratory, Principal Investigator Dr. chem. Mārtiņš Katkevičs,
Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

Associate Professor Dr. chem. Artis Kinēns,
University of Latvia, Latvia

Professor, Dr. Zbigniew Pakulski,
Polish Academy of Sciences, Poland

DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for review to Riga Technical University for promotion to the scientific degree of Doctor of Science (Ph.D) is my own. I confirm that this Doctoral Thesis has not been submitted to any other university for promotion to a scientific degree.

Vladislavs Kroškins.....
(signature)

Date

The Doctoral Thesis has been prepared as a collection of thematically related scientific publications complemented by summaries in both Latvian and English. The Thesis unites three original research articles in SCI journals, one review, one patent and unpublished results.

LIST OF ABBREVIATIONS

Ac	acetyl-	HFIP	hexafluoro-2-propanol
<i>t</i> -Am	<i>t</i> -amyl-	LDA	lithium diisopropylamide
Ar	aryl-	nbe	norbornene
Bn	benzyl-	NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl-	NMR	nuclear magnetic resonance
brsm	based on recovered starting material	OA	oxidative addition
BQ	benzoquinone	Pc	phthalocyanine
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -butyl-	PCC	pyridinium chlorochromate
Cbz	benzyloxycarbonyl-	PCT	pentacyclic triterpenoid
CMD	concerted metalation deprotonation	pfb	perfluorobutyrate
cod	cyclooctadiene	PG	protecting group
Cp	cyclopentadienyl-	Ph	phenyl-
DCM	dichloromethane	phe	phenylalanine
DCE	dichloroethane	PIDA	(diacetoxyiodo)benzene
DG	directing group	Piv	pivaloyl-
DMAP	4-dimethylaminopyridine	phen	phenanthroline
DMSO	dimethylsulfoxide	Phs	phenylsulfamoyl-
DIBAL-H	diisobutylaluminium hydride	PMB	4-methoxybenzyl-
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -propyl-
Esp	$\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -tetramethyl-1,3-benzenedipropionic acid	Py	pyridine
Eq	equivalent	RE	reductive elimination
h	hours	Tf	trifluoromethanesulfonyl-
HAT	hydrogen atom transfer	TFA	trifluoroacetic acid
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate	THF	tetrahydrofuran
		TM	transition metal
		TMS	trimethylsilyl-
		Troc	2,2,2-trichloroethoxycarbonyl-

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

Introduction

Pentacyclic triterpenoids (PCTs) comprise a widespread family of natural isoprene-derived secondary metabolites, which display an extensive range of biological properties.^{1,2,3,4} PCTs can be classified into three major groups: lupane **I** (betulinic acid, betulin and lupeol), oleanane **II** (oleanolic acid, erythrodiol, and β -amyrin) and ursane **III** (ursolic acid, uvaol, and α -amyrin) terpenoids (Fig. 1).⁵

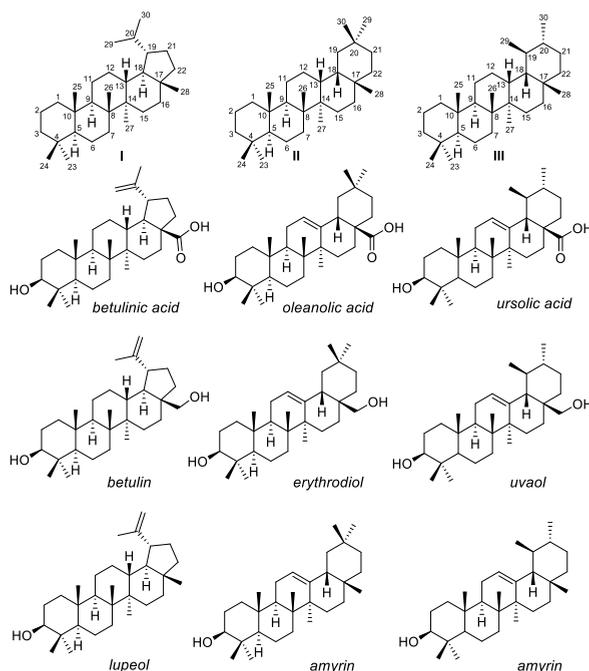


Fig. 1. Representative members of pentacyclic triterpenoids from the major lupane **I**, oleanane **II** and ursane **III** series.

Approximately a quarter of contemporary drugs are shaped by or derived from natural products. During the past four decades, either natural products or natural product derivatives, mimics of natural products, or compounds bearing a natural product pharmacophore have taken over more than half of the field of anticancer and anti-infective therapy.⁶ Lowered toxicity profile in normal cells⁷ and reduced side effects promote PCTs to be great multitarget drug candidates.

The ubiquity of PCTs in nature, sustainability and their facile isolation process have become the cause for many studies that have discovered potential therapeutic applications of these terpenoids. Among them, the most promising PCT applications are in the antitumor and antiviral

domains.^{8,9,10,11,12} An emerging area of research on PCTs and their semi-synthetic derivatives involves the development of compounds with antibacterial¹³ and antifungal activity,¹⁴ as well as derivatives with potential therapeutic applications in the treatment of diabetes¹⁵ and inflammatory diseases.¹⁶

Besides common medicinal applications, PCT can be successfully applied in cosmetology. For the cosmetic industry, betulin-containing birch bark extract was found to be a noteworthy natural raw material. A wide range of betulin-containing products can be found in well-known brands for face, body, and hair care. Furthermore, the properties of betulin and its derivatives that boost the burn and wound healing process were demonstrated by several companies.¹⁷ In addition, a certain effect of betulin on collagen production is used in daily care creams, as well as in the anti-cellulite products.^{18, 19}

The unique structural framework of PCTs, while biologically advantageous, presents notable synthetic challenges. Their rigid, polycyclic architecture and high degree of C-H bond saturation often limit the accessibility of diverse chemical transformations. Traditionally, derivatization efforts on PCTs have concentrated on reactive peripheral functional groups, particularly on the hydroxyl and carboxylic acid moieties at C(3) and C(28), and on the olefin moiety C(20) = C(29), including its allylic position at C(30).²⁰ While being valuable, such modifications exploit only a narrow subset of the molecular landscape, leaving the vast potential of the carbon framework underutilized.

In recent years, the development of transition-metal-catalyzed C-H functionalization has provided new opportunities for direct and selective transformation of otherwise inert C(*sp*³)-H bonds.²¹ These strategies enable the synthesis of novel derivatives directly from advanced intermediates, eliminating the need for prefunctionalization and facilitating efficient late-stage diversification. Despite widespread application of these methods in other complex molecular systems, their implementation in triterpenoid chemistry has been surprisingly limited thus far.

This Thesis presents a series of studies aimed at expanding the synthetic toolbox for PCTs through innovative C-H functionalization strategies and strategic introduction of heteroatomic functionalities (Fig. 2). Specifically, two major catalytic platforms – rhodium-catalyzed C-H amination and palladium-catalyzed C-H arylation/azetidination – were developed and optimized to functionalize previously inaccessible positions within the triterpenoid core. The first approach developed in this Thesis involves palladium-catalyzed C(*sp*³)-H arylation and azetidination of triterpenoid-derived picolinamides. Here, the introduction of picolinamide as a flexible and effective directing group enabled regioselective arylation at C(22) and, in certain series, C(16). Unexpectedly, reactions with electron-deficient iodoarenes gave rise to C-N bond formation, leading to azetidine ring structures. This discovery expands the chemical diversity accessible from natural triterpenoids and introduces a new class of nitrogen-containing derivatives that may hold unique biological properties.

The second approach involves the rhodium-catalyzed intramolecular C-H amination of betulin-derived sulfamate esters, which enabled the formation of 1,2,3-oxathiazinane-fused triterpenoids

with high regioselectivity at the C(16) position. The installation of a directing group at C(28) strategically positioned the reactive intermediate in proximity to otherwise unreactive methylene sites, allowing for controlled formation of C-N bonds. These intermediates were subsequently transformed into 16-amino and 16-azido derivatives, which represent rare and synthetically valuable motifs in PCT chemistry. The possibility of sequential functionalization at C(22) further highlights the potential of this method for skeletal elaboration.

In addition to the aforementioned C-H functionalization strategies, a complementary line of research focused on enhancing the physicochemical properties of PCTs through the installation of phosphonate groups. By attaching methylene phosphonates at C(3) and/or C(28) via an alkylation strategy, a range of mono- and bis-phosphonate esters and their disodium salts were synthesized. The obtained sodium phosphonates exhibited excellent aqueous solubility – a characteristic not commonly observed in native PCTs. While solubility enhancement is specific to the phosphonate series, it demonstrates the utility of structural modifications in addressing formulation challenges.

In summary, the study presented in this Thesis introduces new and efficient methodologies for diversifying the PCT scaffold (Fig. 2). By unlocking chemically inert positions such as C(16) and C(22) for selective modification, these approaches provide access to previously unknown structural motifs. The developed synthetic toolbox will enable deeper exploration of the structure-activity relationship (SAR) of triterpenoids in the future and provide novel building blocks for the development of new triterpenoid-based pharmaceutically active compounds and/or cosmeceuticals.

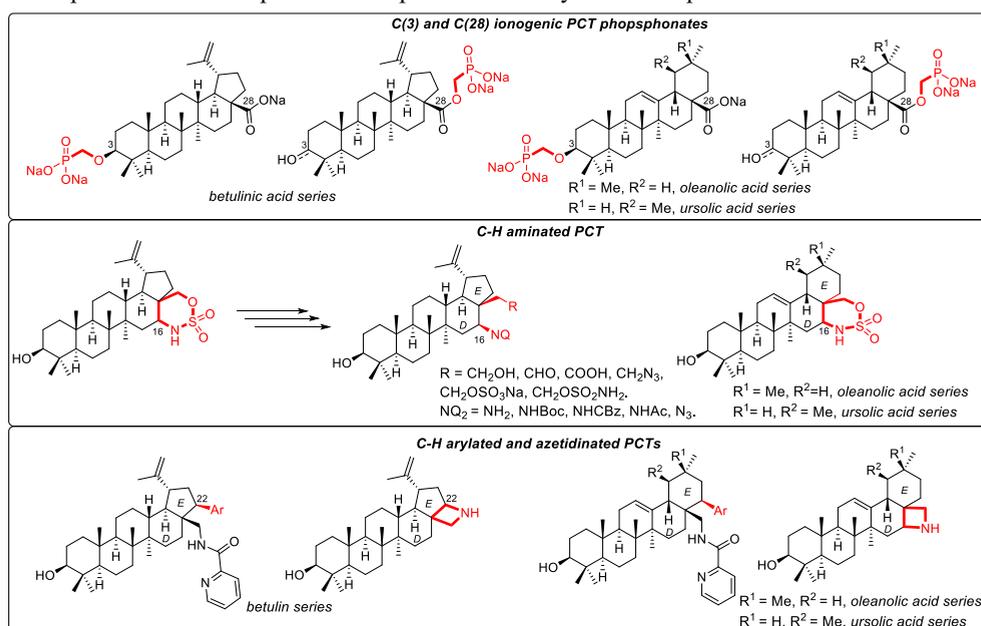


Fig. 2. Developed synthetic approaches enabling the site-selective C-H functionalization and solubility-enhancing modifications of pentacyclic triterpenoids (PCTs).

Aims and objectives

The aim of the Thesis is the synthesis and solubility determination of ionogenic pentacyclic triterpenoid phosphonates and the development of synthetic methods towards C-H functionalized derivatives of pentacyclic triterpenoids.

To achieve the goal, the following tasks were set:

- Development of synthetic methodologies for PCT C(28) phosphonate conjugates via ester linkages and PCT C(3) phosphonate conjugates via ether linkages, along with evaluation of the aqueous solubility of the resulting compounds.
- Development of C(*sp*³)-H arylation and heteroarylation methodologies in the D/E rings of terpenoids, including C(*sp*³)-H deuteration studies and analysis of side products to elucidate the reaction mechanism and regioselectivity-determining factors.
- Synthesis of various C(16) and C(22) PCT (het)aryl derivatives, exploring the scope of applicable aryl halides.
- Development of a C(*sp*³)-H amination strategy for C-N bond formation within the D/E ring of betulin, followed by evaluation of the synthetic potential of the resulting aminobetulin derivatives through subsequent functionalization pathways.

Scientific novelty and main results

This Thesis introduces a collection of novel synthetic transformations applied to pentacyclic triterpenoids. The most notable advances include:

- The design of previously unexplored ionogenic phosphonate derivatives of betulinic, oleanolic and ursolic acids was established. A scalable, convenient synthetic procedure suitable for PCT derivatives was developed, which afforded a series of differently linked PCT phosphonates. All obtained ionogenic PCT derivatives displayed high aqueous solubility up to 26 mg/mL and hydrolytic stability at pH 8.5. Cytotoxicity evaluation of the latter revealed that the obtained PCT-derived sodium phosphonates do not possess a significant cytotoxicity profile towards normal cells, providing promising possibilities for future medicinal chemistry research of established compounds.
- For the first time, synthetic procedures for regioselective palladium-catalyzed C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids have been developed. The methodology demonstrates a successful use of picolinamide directing group for PCTs. The optimized C-H arylation reaction affords C(*sp*³)-arylation and heteroarylation products with C(22)/C(16) selectivity from 9 : 1 in the lupane (betulin) series to 19 : 1 in the oleanane and ursane series. On the other hand, changing electron-rich aromatic iodides to electron-poor aromatic iodides enabled C-N bond formation at PCT cores, furnishing betulin-derived C(22)-azetidine and oleanane-derived C(16)-azetidine.

- A novel catalytic method has been developed for achieving regioselective C-H amination on the betulin molecular scaffold using a rhodium catalyst. The transformation of a 28-*O*-sulfamate ester precursor enables intramolecular nitrene insertion, forming a fused 1,2,3-oxathiazinane-2,2-dione structure with high preference for functionalization at the C(16) position. Sequential functionalization was also developed, and it provides access to 16-amino-betulin, 16-azido-betulin, 16-amino betulinic and betulonic acids, among others. Moreover, introduction of a substituent at C(16) directs a second C-H amination to occur selectively at C(22) and provides a precursor of 16,22-diamino-betulin. The obtained products offer modular entry points for diversification and potential therapeutic development in the semi-synthetic triterpenoid domain.

In summary, the compound design proposed in this Doctoral Thesis, along with the developed synthetic methods for their preparation, provides preparative access to novel structural motifs previously unavailable in the chemistry of pentacyclic triterpenoids, thereby opening new opportunities for research in medicinal chemistry within this field.

Structure and volume of the Thesis

The Doctoral Thesis has been prepared as a collection of thematically related scientific publications dedicated to the synthesis of ionogenic phosphonate and C-H functionalized PCT derivatives and studying their biological and synthetic applications. The Thesis consists of three original research articles published in SCI journals, one review, one patent and unpublished results.

Publications and approbation of the Thesis

Results of the Thesis have been reported in three original research articles. One review has been published. One patent has been obtained. The main results have been presented at 13 conferences.

Scientific publications

1. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Lācis, R., Mishnev, A., Turks, M. Site-selective C-H amination of lupane type triterpenoids. *Eur. J. Org. Chem.* **2025**, 2500340.
2. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Lācis, R., Kumar, D., Kumpiņš, V., Rjabovs, V., Mishnev, A., Turks, M. Palladium-catalyzed C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids. *ACS Omega.* **2025**, *10*, 27992–28019.
3. Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Lācis, R., Fedorovska, E., Demir, Ö., Dubnika, A., Loca, D., Turks, M. Synthesis and preliminary cytotoxicity evaluation of water soluble pentacyclic triterpenoid phosphonates. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 28031.

4. **Kroškins, V.**, Turks, M. Recent investigations in synthesis of oxathiazinanes by sulfamate estercyclization (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2023**, *59*, 637–639.

Obtained patents

Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Lācis, R., Fedorovska, E., Turks, M. Water-soluble triterpenoid phosphonates and synthesis method thereof. LV15836 B1, 20.03.2025.

Results presented at the scientific conferences

1. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Loča, D., Dubņika, A. Water Soluble Phosphonate Derivatives of Pentacyclic Triterpenoids. In *Balticum Organicum Syntheticum 2024: Abstract Book*, Latvia, Riga, 7–10 July 2024. Riga: 2024, p. 80.
2. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Regioselective C-H Amination of Lupane-Type Triterpenoids. In *Balticum Organicum Syntheticum 2024: Abstract Book*, Latvia, Riga, 7–10 July 2024. Riga: 2024, p. 81.
3. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Site Selective C-H Amination of Lupane Type Triterpenoids. In *24th Tetrahedron Symposium: Abstract Book*, France, Montpellier, 18–21 June 2024. Montpellier, p. 242.
4. Kumpiņš, V., **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Site Selective C(sp³)-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *24th Tetrahedron Symposium: Abstract Book*, France, Montpellier, 18–21 June 2024. Montpellier, p. 243.
5. **Kroškins, V.**, Lācis, R., Lugiņina, J., Turks, M. Palladium-Catalyzed C(sp³)-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *International Symposium on Synthesis and Catalysis 2023: Abstract Book*, Portugal, Evora, 5–9 September 2023. Evora: 2023, p. 204.
6. **Kroškins, V.**, Lācis, R., Lugiņina, J., Loča, D., Turks, M. Synthesis of Phosphonate Derivatives of Pentacyclic Triterpenoids. In *International Symposium on Synthesis and Catalysis 2023: Abstract Book*, Portugal, Evora, 5–9 September 2023. Evora: 2023, p. 227.
7. **Kroškins, V.** C(sp³)-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *13th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry: Program and Abstract Book*, Latvia, Riga, 14–15 September 2023. Riga: 2023, p. 46.
8. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. C-H Arylation of Pentacyclic Triterpenoids. In *81st International Scientific Conference of the University of Latvia 2023. Chemistry Section and Section of Institute of Chemical Physics: Book of Abstracts*, Latvia, Riga, March 17, 2023. Riga: University of Latvia Press, 2023, p. 11.
9. Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Lācis, R., Loča, D., Turks, M. Pentaciklisko triterpenoīdu fosfonātu atvasinājumu sintēze. In *Konference "Inovāciju fonds – nozaru pētījumu programma: viedie materiāli, fotonika un biomedicīna"*, Latvia, Riga, November 18, 2023. Riga: 2023, pp. 1–2.
10. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. Rh Catalyzed C-H Amination of Pentacyclic Triterpenoids. In: *Materials Science and Applied Chemistry 2022: Programme and Abstracts*, Latvia, Riga, October 21, 2022. Riga: 2022, p. 5.

11. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Jankovičs, K. C-H Activation of Lupane Type Triterpenoids. In: *80th International Scientific Conference of the University of Latvia 2022. Chemistry Section: Book of Abstracts*, Latvia, Riga, February 11, 2023. Riga: University of Latvia Press, 2022, p. 75.
12. Lugiņina, J., **Kroškins, V.**, Mishnev, A., Turks, M. Palladium-Catalyzed C-H Activation of Triterpenoids. In: *Balticum Organicum Syntheticum 2022: Program and Abstract Book*, Lithuania, Vilnius, July 3–6, 2022. Vilnius: 2022, p. 115.
13. **Kroškins, V.**, Lugiņina, J., Turks, M. C-H Amination of Pentacyclic Triterpenoids. In: *Balticum Organicum Syntheticum 2022: Program and Abstract Book*, Lithuania, Vilnius, July 3–6, 2022. Vilnius: 2022, p. 115.

MAIN RESULTS OF THE THESIS

1. Synthesis and application of ionogenic pentacyclic triterpenoid phosphonates

Numerous natural compounds exhibit significant biological activity in both *in vitro* experiments and preclinical animal models. However, their effectiveness in human clinical trials often yields inconsistent outcomes. A key factor contributing to this gap between laboratory or animal research and human applications is the limited bioavailability of many natural products. A significant reason for the latter is the increased lipophilicity of many natural molecules. The concepts of hydrophobicity and lipophilicity are widely used regarding the sorption of organic compounds from aqueous media.²² The hydrophobic effect narrates the predisposition of non-polar compounds to prefer a non-aqueous environment to an aqueous one. Nevertheless, absolute suppression of lipophilicity can lead to the stoppage of passive transport of active pharmaceutical ingredients through the membranes of organisms and following drug-receptor binding. As a result, conventional drugs are typically developed with a focus on ensuring good bioavailability and desirable pharmacokinetic properties, which is often a delicate objective to succeed.²³

One of the most common strategies for improvement of physicochemical, biopharmaceutical or pharmacokinetic properties of pharmacologically potent compounds is the development of prodrugs – chemically modified forms of the pharmacologically active molecule that must undergo transformation *in vivo* to release the active parental molecule. Notably, that prodrug technique can be applied to increase aqueous solubility and bioavailability of hydrophobic non-polar compounds by introduction of polar ionogenic functionalities, and oppositely to enhance lipophilicity and permeability of polar hydrophilic molecules, by introduction of non-polar moieties.²⁴ Thus, the phosphate ester of prednisolone **1** is a representative example of a prodrug with improved aqueous solubility among steroidal drugs. Another example is the phosphate ester of miproxiifene **2**, which displayed significantly enhanced aqueous solubility compared to parental miproxiifene (Fig. 3).

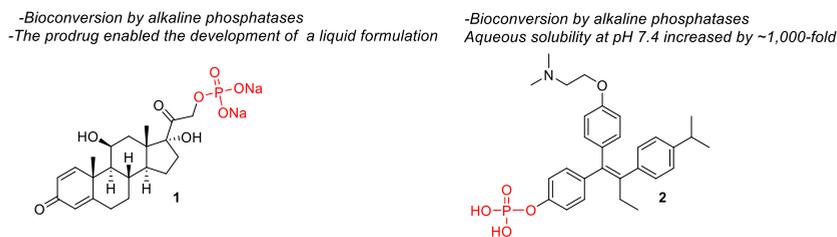


Fig. 3. Water-soluble prodrugs of prednisolone and miproxiifene.

Enhanced lipophilicity of pentacyclic triterpenoid steroidal feedstock is a common limitation to the drugability of these complex natural molecules. To improve the undesirable properties of triterpenoids, prodrug strategies came into sight. Triterpenoid phosphates and sulfates, as well as

their conjugates with amino acids, polymers, or sugars, have been widely used to improve aqueous solubility and oral bioavailability (Fig. 4).²⁵

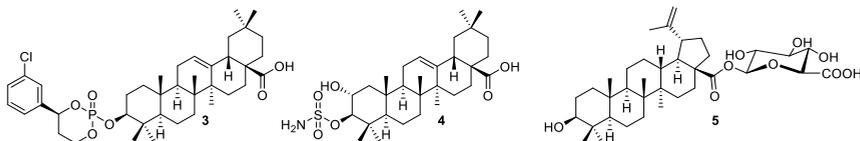


Fig. 4. Oleanolic acid phosphate precursor **3** and water-soluble PCT derivatives **4** and **5**.

Improvement of aqueous solubility can also be achieved by the installation of stable polar ionogenic functionalities, ensuring salt forms of biologically active compounds.²⁶ Salts of acidic and basic drugs generally have greater aqueous solubilities than their corresponding acid or base forms. Indeed, introduction of new functional groups as well as presence of new counterion in the molecules can affect the protein binding, bio-distribution and metabolism of modified molecules.

Triterpenic acids themselves can be easily transformed into corresponding salts by a simple neutralization reaction with a variety of inorganic and organic bases. For example, sodium and potassium betulinates **6** can be obtained by treatment of betulinic acid with NaOH and KOH ethanolic solution. However, solubility tests of the latter were significantly obscured due to the formation of colloids at concentrations above 0.02 mg/g. Organic counterion containing choline oleanolate **7** exhibits the best solubility (81.7 $\mu\text{g/mL}$) in a simulated gastric juice (aqueous solution of NaCl and sodium dodecyl sulfate, which was adjusted to pH 1.2 by HCl solution).^{27, 28}

Many semisynthetic cationic PCT derivatives were synthesized by various functional group transformations at PCT core C(3), C(28) and double bond during the past decade. Different PCT cores were decorated with various ammonium **10**,²⁹ imidazolium **11**³⁰ and guanidinium **12**³¹ moieties bearing diverse counterions through different types and sizes of linkers. Analogously, C(28), C(30), and C(2) PCT triphenylphosphonium salts³² have been produced and biologically evaluated. Unfortunately, solubility data of these cationic PCT conjugates were not reported.

Anionic derivatives of semi-synthetic PCT analogues include mostly sulfate^{33, 34} and phosphate^{35, 36, 37} derivatives, that can be obtained via sulfation or phosphorylation of C(3)-OH and/or C(28)-OH groups (Fig. 5). Monophosphorylated and diphosphorylated PCTs were found to be multipurpose molecules in terms of biochemistry, by changing the spatial and electronic environment of the molecule. Nevertheless, comprehensive aqueous solubility data are not yet reported.

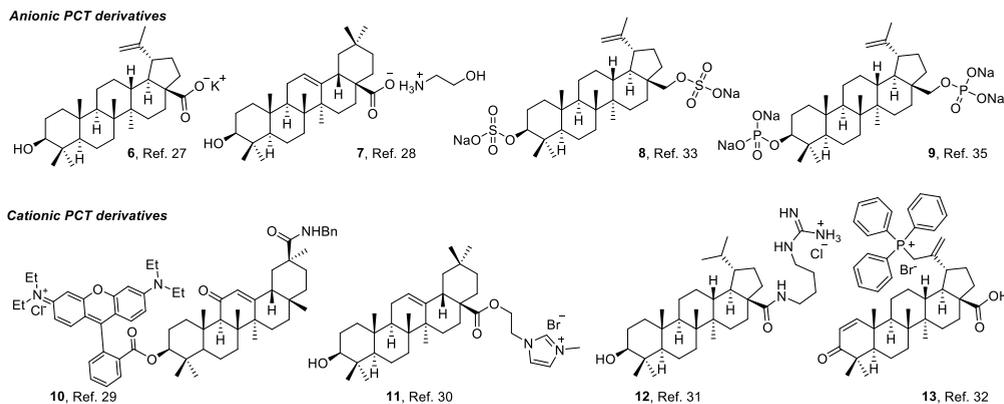


Fig. 5. Previously reported ionogenic PCT derivatives.

Replacing of phosphate group with the isosteric phosphonate group can significantly reduce the hydrolytic instability issues. This approach has demonstrated the prominence of phosphonate derivatives as a class of stable biologically active compounds delivering a series of antiviral nucleotide drugs.^{38, 39} A few examples of the utility of phosphonates as phosphate mimics in a PCT series have been published. Introduction of the phosphonate moiety to the triterpenoid core can be done by amide bond **14**⁴⁰ or C-C bond **15**⁴¹ (Fig. 6). To the best of our knowledge, there is only one example of PCT-phosphonate **16** linked by C(28) carboxylic ester reported.⁴² However, the transformation of known PCT phosphonates into phosphonic acids or their salts remains unexplored prior to our research. Solubility data of such phosphonate salts are not available either.

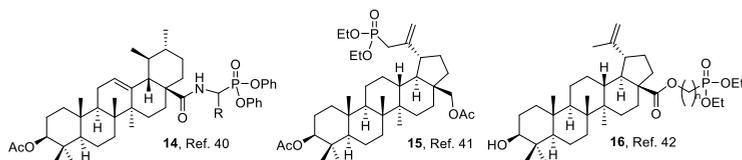


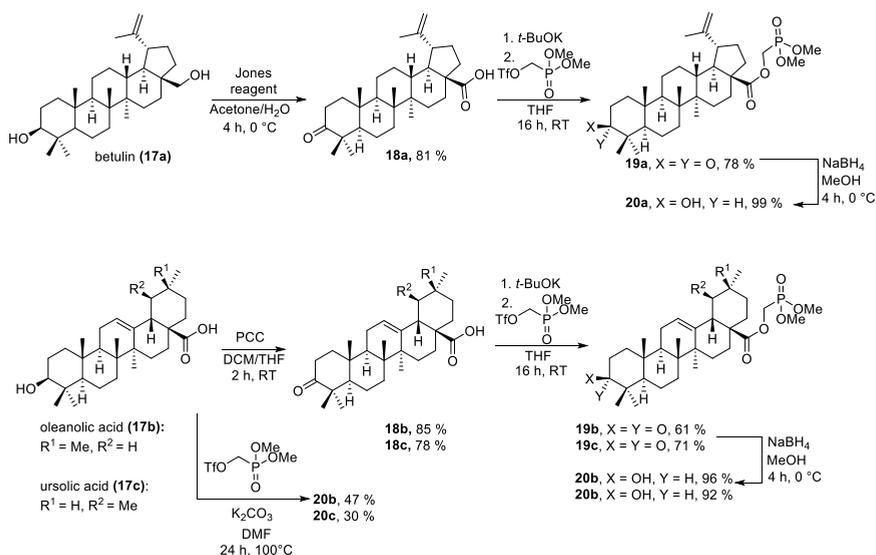
Fig. 6. Previously reported PCT phosphonate conjugates.

In this Thesis, a design and synthetic approach has been developed towards novel pentacyclic triterpenoid phosphonate derivatives of type C(17)-COO-CH₂-P, C(3)-O-CH₂-P and C(3/28)-O-CH₂-P, where the simplest possible methylene linker was utilized to attach the phosphonate fragment via ester or ether bond. It should be highlighted that previously reported triterpenoid C(28) esters display sufficient stability in acidic and basic media.⁴³ Herein, we reveal in the Thesis that such triterpenoid-based phosphonate esters are easily achievable, can be smoothly converted to the resultant salt form, and the latter exhibit significantly enhanced aqueous solubility.

Initially, we attempted to install the target phosphonate moiety by a simple esterification reaction of 3-oxo PCT carboxylic acids with dimethyl (hydroxymethyl)phosphonate, but no efficient conditions were found. The problem was solved by the transfer of the reaction site one

atom further from the C(17) quaternary center, overcoming the steric hindrance of the triterpenic core. For that purpose, we decided to switch reactivity and explore a possible carboxylate alkylation reaction.

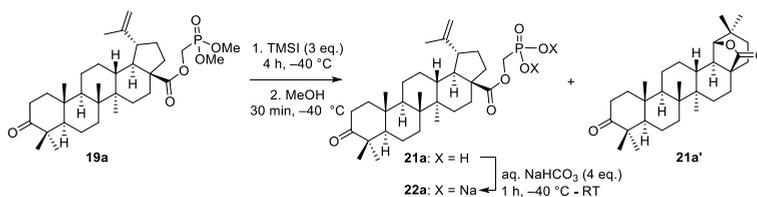
t-BuOK was suitable for the rapid deprotonation of 3-oxo triterpenic acids **18a-c**, and following alkylation with (dimethoxyphosphoryl)methyl trifluoromethanesulfonate in anhydrous THF afforded desired esters **19a-c** in good yields (Scheme 1). The used triflate is readily available from the previously mentioned alcohol.⁴⁴ A similar approach using (dimethoxyphosphoryl)methyl trifluoromethanesulfonate in a combination with 3-hydroxy triterpenic acids **17b, c** provided direct access to compounds **20b,c** (process **17b, c** → **20b, c** (Scheme 1), thus far with a lower yield due to formation of side products. To improve chemoselectivity between target C(17)-COOH and unwanted C(3)-OH alkylation in the transformation **17b, c** → **20b,c**, K₂CO₃ was used as a weaker base. The latter protocol also resulted in undesirable transesterification between C(17)-COOH and phosphonic acid methyl ester moiety of the alkylation reagent, producing C(17)-COOMe side product accompanied by TfOCH₂P(O)(OH)(OMe). The diastereoselective C(3) reduction of PCT phosphonate conjugates **19a-c** was found to be more optimal, providing clean transformations and access to C(3)-OH phosphonate derivatives **20a-20c**.



Scheme 1. Synthesis of target PCT phosphonates **19a-c** and **20a-c**.

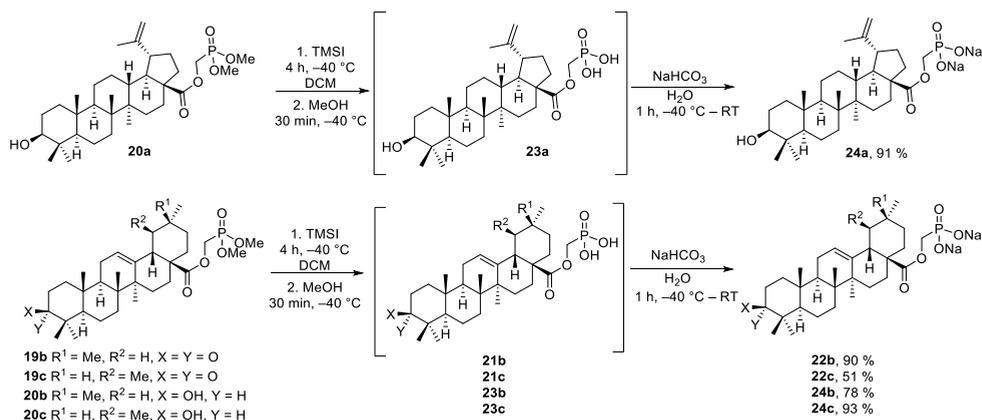
Next, we investigated the transformation of the obtained phosphonates into sodium phosphonates **22a-c** and **24a-c** utilizing TMSI assisted demethylation followed by the transformation of formed phosphonic acids **21a-c** and **23a-c** into the corresponding sodium salts. Starting with the betulonic acid derived phosphonate **19a**, we found that required temperature for

the demethylation must be $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Scheme 2). At increased temperatures cleavage of the previously installed ester bond was observed and betulinic acid olefin moiety underwent cationic rearrangements.⁴⁵ We discovered that the methanolysis of the intermediate *O*-TMS-phosphonates and subsequent neutralization of HI including formation of phosphonic acid disodium salt by addition of aqueous sodium bicarbonate solution must be performed also at a decreased temperature.



Scheme 2. Demethylation of compound **19a**.

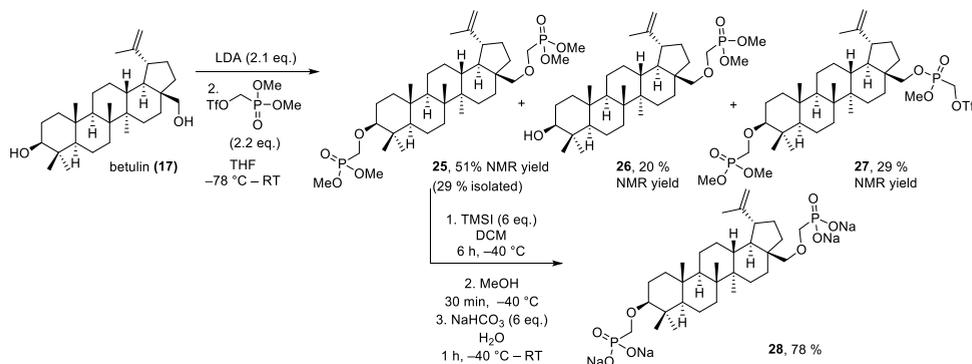
The developed demethylation conditions were successfully applied on all other compound series consisting of betulinic acid derivative **20a** with free C(3)-OH group, 3-oxo-series of oleanolic and ursolic acid-derived phosphonates **20b,c** and their corresponding C(3)-OH derivatives **21b,c**, providing target products **22a-c** and **24a-c** in good to excellent yields (Schemes 2 and 3).



Scheme 3. Synthesis of triterpene acid-derived sodium phosphonates **22b,c** and **24a-c**.

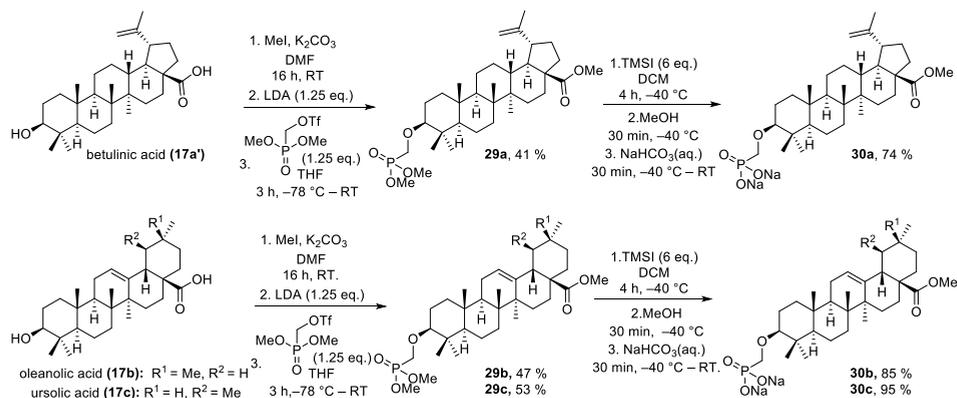
The obtained products **22a-c** and **24a-c** exhibited high hydrolytic stability, and an eventual cleavage of the carboxylate ester bond was not observed even after heating under two different basic conditions: (1) $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1.5 M NaOH/MeOH solution for 6 h; (2) $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the presence of 4 equiv. NaOH in H_2O for 24 h. The obtained ionic PCT derivatives displayed excellent aqueous solubility, which can be demonstrated by the acquisition of their ^1H NMR spectra in D_2O .

Afterwards, we investigated the introduction of the phosphonate moiety to PCT via an ether bond. Starting with betulin, the most abundant natural PCT-3,28-diol, we examined a one-pot double alkylation possibility involving both hydroxyl groups. The utility of such strong bases as NaH, *t*-BuOK, *n*-BuLi and MeMgBr in combination with previously used (dimethoxyphosphoryl)methyl triflate or tosylate was found to be ineffective. We have finally found that combining triflate alkylation reagent (2.2 equiv.) and betulin Li-dialkoxide generated from LDA (lithium diisopropylamide) (2.1 equiv.) afforded the target product **25** in 29 % isolated yield (Scheme 4). The desired product **25** was accompanied by the C(28)-*O*-monoalkylation product **26** and C(28)-*O*-phosphonylation product **27** in the **25** : **26** : **27** ratio 51 : 20 : 29 (by NMR). Formation of the latter is a result of the alkoxide attack on the phosphorous center due to the presence of two competing electrophilic reaction centers in (dimethoxyphosphoryl)methyl trifluoromethanesulfonate. The obtained tetramethyl bis-phosphonate **25** was successfully converted to tetrasodium salt **28** (78 %) using the previously developed TMSI conditions.



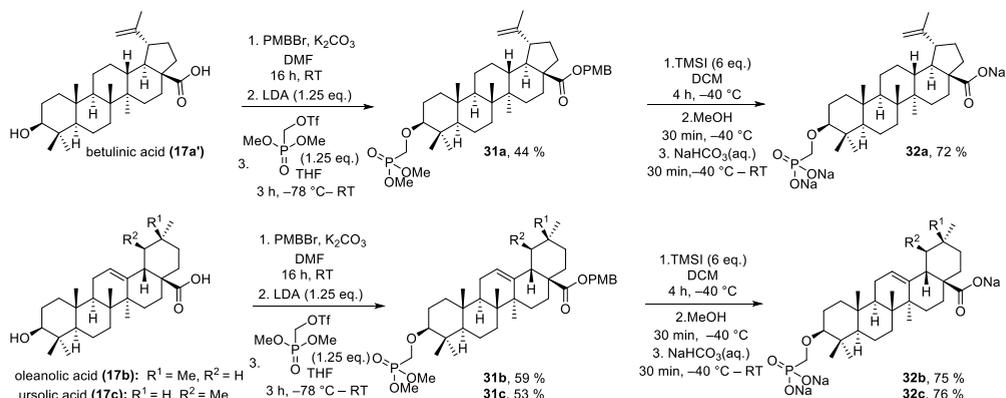
Scheme 4. Synthesis of bis-phosphonate **28**.

Next, we synthesized also mono-phosphonate PCT derivatives at C(3). For that purpose, betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid were protected as methyl esters. Application of previously developed LDA/triflate combination afforded a series of C(3) ethers in a moderate yield (Scheme 5). Besides target products, also starting materials and degradation of alkylating reagent were observed after reaction workup.



Scheme 5. Synthesis and demethylation of methyl-protected PCT derivatives **29a-c**.

We expected that previously developed TMSI conditions would demethylate both phosphonate and C(28) carboxylic acid methyl ester, providing desired trisodium salts. However, C(28) methyl ester displayed enhanced stability, affording products **30a-c**. Implementation of alternative conditions for ester cleavage, such as 6M KOH/EtOH at reflux, LiI/DMF/DMSO reflux was found to be ineffective. Therefore, we decided to change methyl ester to a more labile 4-methoxybenzyl ester. As expected, treatment of C(3) ethers **31a-c** containing C(28) PMB-protection with TMSI and subsequent methanolysis and neutralization furnished target PCT ionogenic derivatives **32a-c** in good yields (Scheme 6).



Scheme 6. Synthesis and demethylation of PMB-protected PCT derivatives **32a-c**.

All obtained ionogenic PCT sodium phosphonates were subjected to solubility tests in water (Fig. 7). A quantitative ¹H-NMR approach in D₂O, using potassium hydrogen phthalate as an external standard, was used for the precise calculation of solubility. The basic forms of

phosphonates⁴⁶ were ensured by the careful addition of NaOD, maintaining pH 8.0–8.5 during the quantification, which is 2–3 units higher than the pKa of phosphonic acid disalt.⁴⁷ Predictably, our newly designed PCT phosphonates **22a-c**, **24a-c**, **32a-c**, and **28** possessed excellent aqueous solubility in a range from 3 mg/mL to 26 mg/mL (pH 8.0–8.5) (Fig. 6). This is at least two orders of magnitude higher than the reported solubility data of the parent natural triterpenic acids. For example, aqueous solubility of oleanolic and betulinic acids is <0.1 µg/mL at neutral pH and can be increased to 42.1 µg/mL for betulinic acid and 99.5 µg/mL for oleanolic acid at pH 11.8.²² Also, natural ursolic acid displays similarly low aqueous solubility,²⁰ which may be expanded to a certain point by various modern drug delivery systems.^{18,19} Phosphonic acids are more acidic and easier to ionise than carboxylic acids. This ionic character helps to increase the aqueous solubility as demonstrated by here reported compounds.

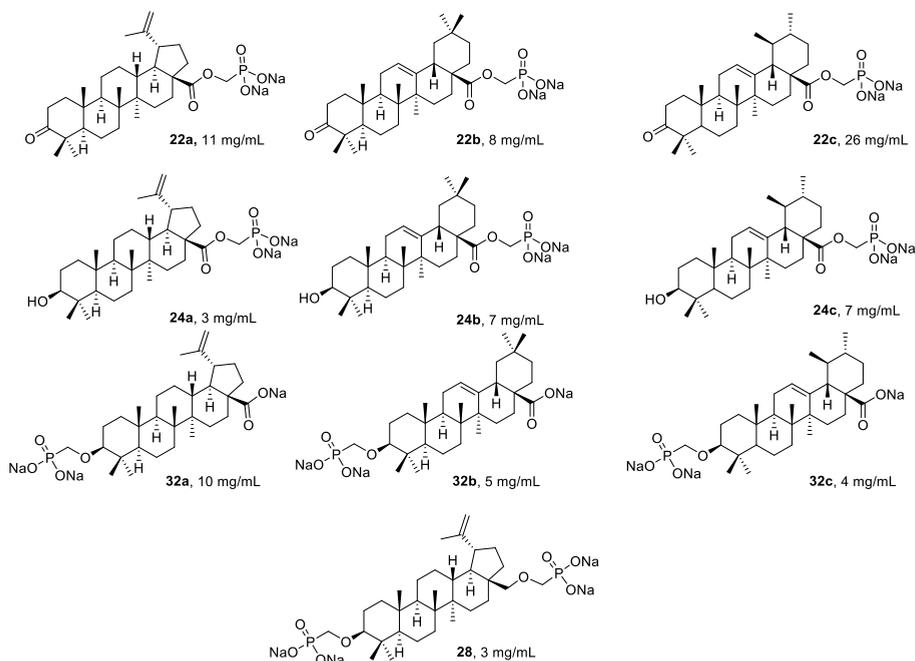


Fig. 7. Aqueous solubility (D₂O) of PCT phosphonates at pH 8.0–8.5.

In collaboration with Dr A. Dubņika and Prof. D. Loča (RTU Institute of Biomaterials and Bioengineering) cytotoxic activity of the obtained compounds was determined at various concentrations (10–50 µM) against human-derived osteosarcoma cell line MG-63 (ATCC, CRL-1427) and mouse-derived preosteoblast cell line MC3T3-E1 (ATCC, CRL-2593). For the comparison, naturally occurring betulinic (**17a'**), oleanolic (**17b**) and ursolic (**17c**) acids, as well as their 3-oxo analogs **18a-c** and doxorubicin, were also subjected to cytotoxicity tests. The

designed water-soluble PCT-derived phosphonates and the natural triterpenic acids, including their 3-oxo-analogs, were found to be harmless to the MC3T3-E1 cells.

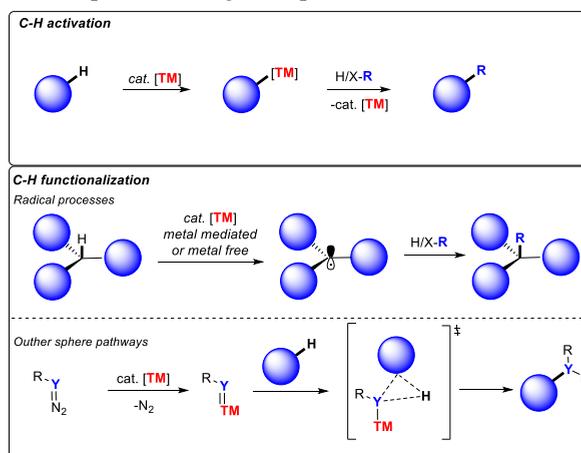
As an interesting exception should be mentioned the concentration-dependent cell viability drop of MC3T3-E1 cells in the presence of oleanonic acid (0.49 ± 0.12 relative metabolic activity at $50 \mu\text{M}$ of **18b**). To a lesser extent, ursolic acid affected the metabolic activity of MC3T3-E1 cells (0.72 ± 0.09 relative metabolic activity at $50 \mu\text{M}$ of **2c**). Nonetheless, the MG-63 cell line revealed somewhat lower metabolic activity in the presence of oleanonic acid-derived phosphonate **24b** (0.73 ± 0.05 relative metabolic activity at $50 \mu\text{M}$ of **24b**) than in the presence of its parental oleanonic acid (1.03 ± 0.18 for **18b**). It is interesting to note that ursolic acid **17c** and ursolic acid **18c** showed a cytotoxic effect towards the MG-63 cell line in the cell viability tests (0.28 ± 0.04 and 0.67 ± 0.04 relative metabolic activity at $50 \mu\text{M}$ of **17c** and **18c**, respectively).

In summary, it is possible to synthesize pentacyclic triterpenoid phosphonates linked to the terpene core via ether or ester-type functional groups and the shortest possible methylene bridge. The TMSI-induced demethylation of the phosphonates was optimized to avoid acid-induced rearrangement side reactions. Both disodium phosphonates with ester linkage derived from betulinic, oleanolic, and ursolic acids, including their 3-oxo forms, and trisodium salts of ether-linked phosphonic and terpenic carboxylic acids were obtained. The salts exhibited high aqueous solubility ($3\text{--}26 \text{ mg/mL}$ at pH $8.0\text{--}8.5$), quantified by qNMR. Their high solubility even allows structural characterization in D_2O by NMR. Preliminary cytotoxicity tests indicate low toxicity to normal cells, which opens opportunities for further research into their use in antiviral, antimicrobial, antidiabetic, and anti-inflammatory therapies.

More information about these studies can be found in the publication by Lugiņina, J., Kroškins, V., Lācis, R., Fedorovska, E., Demir, Ö., Dubnika, A., Loca, D., Turks, M., Synthesis and Preliminary Cytotoxicity Evaluation of Water-Soluble Pentacyclic Triterpenoid Phosphonates. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 28031 (Appendix 1); in the patent – Lugiņina, J., Kroškins, V., Lācis, R., Fedorovska, E., Turks, M., Water-Soluble Triterpenoid Phosphonates and Synthesis Method Thereof, LV15836 B1, 20.03.2025 (Appendix 2); as well as in Appendix 3 on the synthesis of PCT 3-*O*-methylphosphonates.

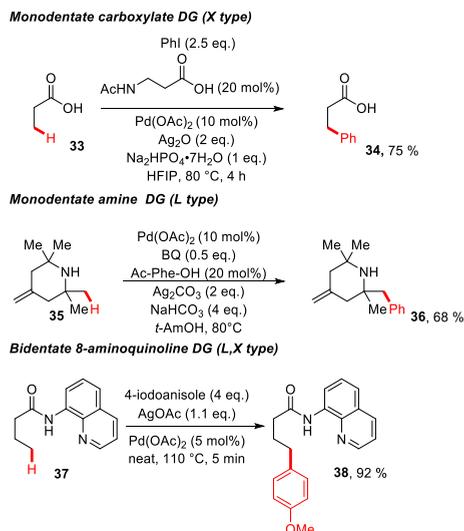
2. C-H activation of pentacyclic triterpenoids

Transformative metal catalysis has driven significant advancements in molecular synthesis, making it possible to construct increasingly complex compounds.²¹ Transition metal-catalyzed C-H activation, which involves inner-sphere C-H bond cleavage to generate a carbon-metal bond, proposes a sustainable and cost-effective approach to organic synthesis. The terms C-H activation and C-H functionalization are often used equivalently, but some difference is hidden in the mechanism.⁴⁸ C-H activation specifically involves an organometallic process where a C-H bond is cleaved to form a direct bond between carbon and a metal (Scheme 7). In contrast, C-H functionalization is a broader term that does not require the formation of a C-M bond and includes both inner-sphere and outer-sphere mechanisms. Outer-sphere C-H functionalization typically occurs through radical pathways, hydrogen atom transfer (HAT), or insertions involving metal carbenoids, oxo, or nitrenoid species, among other processes.



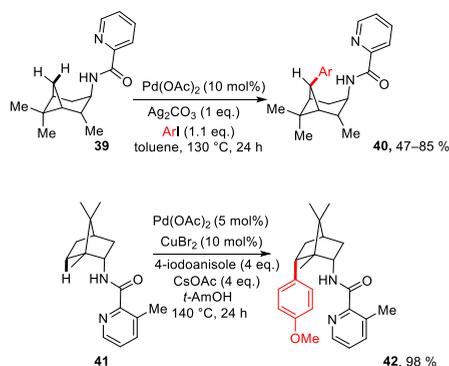
Scheme 7. Schematic representation of C-H activation and C-H functionalization.

Achieving complete control over chemoselectivity and site-selectivity remains a significant challenge for synthetically suitable C-H activations. Site-selectivity can be handled by the electronic or steric characteristics of the substrate, as well as through chelation assistance. To facilitate the latter, a variety of monodentate and bidentate directing groups – either naturally present in the substrate (Scheme 8: Compounds **33** and **35**) or intentionally introduced (Scheme 8: Compound **37**) – have been developed to enable proximity-driven, transition metal-catalyzed C-H activation.^{49,50,51,52}



Scheme 8. C(*sp*³)-H activation employing different types of directing groups.

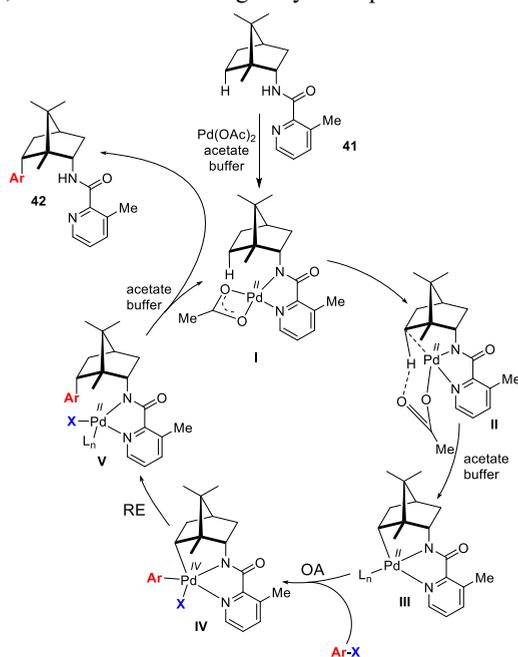
Notable applications of C-H arylation and diversification of natural products have been reported during the past few decades. For example, picolinamide directing group bearing pinamine **39** can be selectively decorated with differently substituted aromatic rings (Scheme 9).⁵³ Sheppard and coworkers reported a synthetic protocol for installation of a 4-anisole moiety into the bornylamine scaffold **41** utilizing different pyridyl directing groups, among which the 2-methylpyridyl moiety provided the best regioselectivity.⁵⁴



Scheme 9. C-H arylation of terpene natural products.

The mechanism of palladium-catalyzed C-H arylation starts with palladium coordination to the directing auxiliary and ligand exchange to give complex **I** (Scheme 10). Afterwards C-H activation

step proceeds via concerted metalation-deprotonation (CMD) pathway.⁵⁵ The latter involves a coordination of the C-H bond with the palladium to form a palladium-carbon σ -complex **II**. The calculated transition state shows that the carbon-metal bond begins to form at the same time as the proton is transferred to the carboxylate group, leading to the formation of a metal complex **III**. Compared to other possible processes, such as oxidative addition of the C-H bond to the metal, CMD is significantly lower in energy.⁵⁶ Aryl iodide oxidative addition to complex **III** affords palladium(IV) species **IV**, and subsequent C-C reductive elimination and ligand exchange produce the palladium complex **V**, which releases the target arylation product.

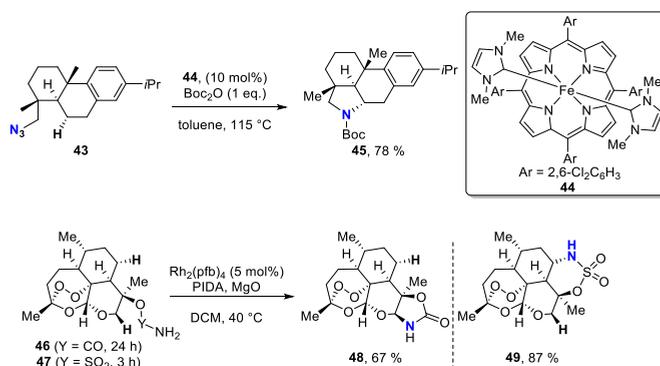


Scheme 10. Palladium-catalyzed C-H arylation mechanism.

Metal additives such as copper(II) and silver(I) salts often play crucial roles in Pd-catalyzed C-H activation reactions, helping to improve reactivity, selectivity, or even enabling certain transformations that would otherwise not proceed efficiently. Copper additive can regenerate Pd(II) species, which can suffer reduction to Pd(0) and stop the Pd(II)/Pd(IV) catalytic cycle. In some cases, copper(II) salts assist directly in C-H bond cleavage by acting as a Lewis acid that activates the substrate or a Brønsted base (especially with acetate ligands) that assists deprotonation (especially in CMD: concerted metalation-deprotonation pathway).⁵⁷ The role of Ag(I)-salts has been described for various Pd-catalyzed C-H activation processes. Generally, silver additives can be used as a terminal oxidant or as a halide scavenger; however, many studies on heterometallic Pd-Ag catalysis suggest that palladium and silver can work together during the entire catalytic cycle. In some cases, silver carboxylates can directly activate (cleave) C-H bonds in arenes,

forming aryl-silver(I) species. These aryl-Ag intermediates can then transfer the aryl group to a palladium complex, helping to form the desired product.⁵⁸

The transformation of unactivated C-H bonds into C-N bonds via C-H insertion was applied for the synthesis of different amino derivatives of terpene natural products (Scheme 11). It has been proposed that a metal-nitrenoid species serves as a crucial intermediate in the C-H bond cleavage process, generated through the transfer of a nitrene group from an aminating agent to the metal center. Directed nitrene insertions have been achieved in intramolecular aminations using different amino or azido tethered groups like sulfonamides, sulfamides, sulfamates, carbamates or azides, sulfonylazides and carbonylazides. For example, azido derivative of leelamine **43** was used as a nitrene precursor in the presence of an iron catalyst **44** at elevated temperature to give the pyrrolidine derivative **45** (Scheme 11). Artemisinin-derived carbamate **46** and sulfamate **47** in the presence of a rhodium catalyst and PIDA were cyclized to oxazolidinone **48** and oxathiazinane **49**, respectively, displaying opposite to each other regioselectivity of nitrene C-H insertion.

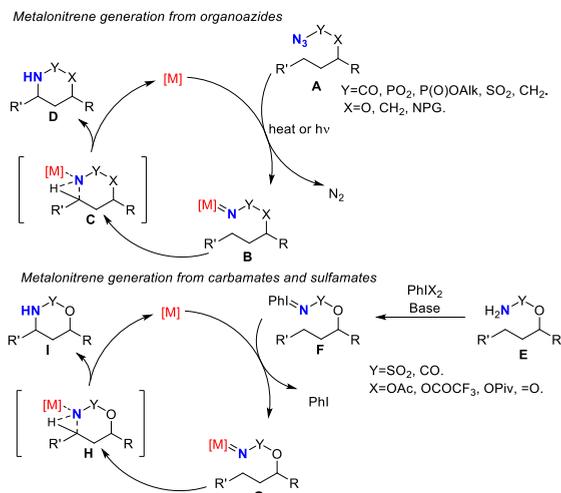


Scheme 11. Intramolecular C-H amination of azido derivative of leelamine **43**⁵⁹ and artemisinin-derived carbamate **46** and sulfamate **47**.⁶⁰

Metalonitrene species **B** can be generated by UV-light irradiation or thermal decomposition of organozides **A** in the presence of a suitable transition metal (Scheme 12). Carbamates and sulfamates serve as effective nitrene precursors in the presence of hypervalent iodine reagents, forming iminoiodinane intermediates **F**, that further interact with the transition metal catalyst to give desired metalonitrene **G**. Intramolecular nitrene insertion reactions proved to be a powerful tool in the synthesis of various *N*-heterocycles, providing high chemo- and site selectivities. Nevertheless, sulfamate and carbamate cyclization can also proceed via a metal-free radical pathway by a variation of the Hofmann-Löffler-Freytag reaction as well as via π -selective Lewis acid-catalyzed amine addition to unsaturated systems.^{61,62}

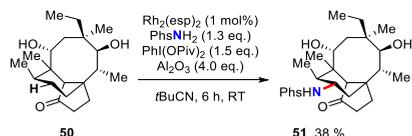
Recent advances in the synthesis of oxathiazinane rings from sulfamate esters, including the utility of nitrene-type intermediates, which will also be discussed in Section 2.2 of the Thesis, can be read in a review article by Kroškins, V., Turks, M., Recent Investigations in Synthesis of

Oxathiazinanes by Sulfamate Ester Cyclization (microreview), *Chem. Heterocycl. Comp.*, **2023**, *59*, 637–639, (Appendix 4).



Scheme 12. Mechanisms of metalonitrene generation and following insertion in the C-H bond.

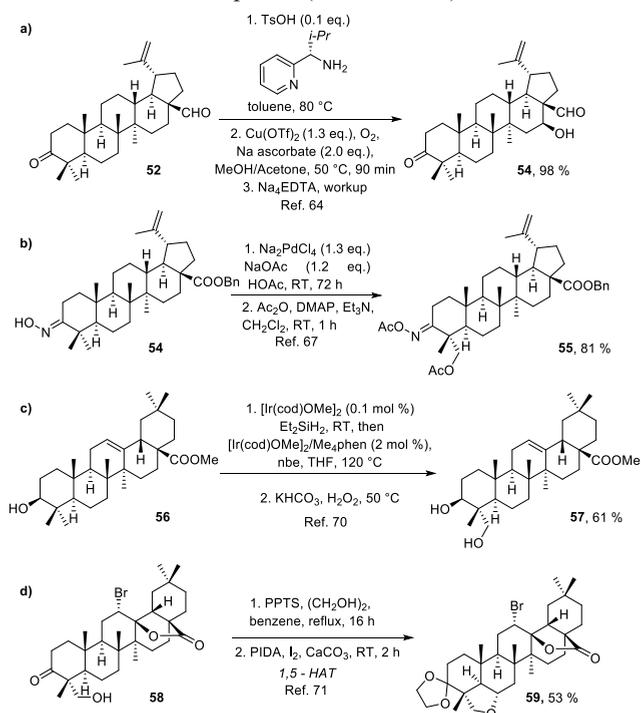
The intermolecular C-H insertion approach does not require directing group introduction steps; however, it usually results in lower selectivity. For example, phenylsulfamate (PhsNH₂) in the presence of rhodium catalyst and PhI(OPiv)₂ was used as an intermolecular C-H amination reagent, providing C-N bond formation of complex natural product **50** in 38 % yield (Scheme 13).⁶³



Scheme 13. Intermolecular C-H amination of natural product **50**.

A vast majority of known synthetic transformations for the decoration of PCT core involve the utility of biogenetic C(3) and C(28) C-O functionalities and the available olefin moiety.²⁴ Despite that, the terpenoid structure of PCTs is packed with multiple C(sp³)-H bonds, which theoretically can be functionalized by exploiting a transition metal-catalyzed C-H activation approach. However, reactivity and regioselectivity issues make functionalization of the triterpene core challenging for synthetic chemists. A prerequisite for regioselective derivatization of such complex compounds via activation of C-H bonds is the presence of functional handles for the attachment of suitable residues to their carbon skeleton. Literature analysis on C(sp³)-H activation in the PCT core has shown only a few examples (Scheme 14).

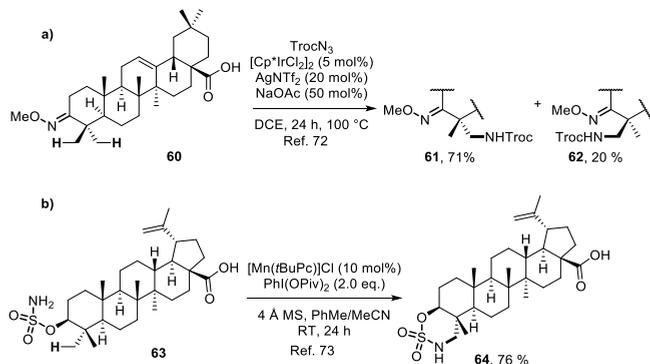
Thus, the Yu group^{64, 65} has reported site-selective C-H hydroxylation of various pentacyclic triterpenoids utilizing Schönecker and Baran's copper-mediated aerobic conditions ($\text{Cu}(\text{OTf})_2$, O_2) (Scheme 14, a). In this case, the site-selectivity has been controlled by the transient chiral pyridine-imino directing group, which was introduced using easily available C(28) aldehyde. Several research groups demonstrated the employment of Baldwin's⁶⁶ developed approach for the selective introduction of a hydroxyl group on a non-activated C(23) methyl group (Scheme 14, b).^{67, 68, 69} Site-selective oxygenation of oleanolic C(23) using iridium catalyzed C(3) hydroxyl group-directed silylation/Tamao-Fleming oxidation sequence was investigated by Hartwig (Scheme 14, c).⁷⁰ Notably, the Maulide group⁷¹ recently reported a protocol for regioselective functionalization of the B ring in oleanane core using hydroxylated C(23) group as the key functionality for further linear reaction sequence (Scheme 14, d).



Scheme 14. Previously reported C-H oxidation examples on the PCT core.

On the other hand, the Lu group developed Ir-catalyzed C(sp^3)-H amination reaction using TroCN_3 as amine precursor at C(23) of oleanolic acid-derived methyloxime **60** (Scheme 15, a).⁷² The betulun scaffold was also investigated in intramolecular metallonitrene-based C(sp^3)-H amination of sulfamate ester **63**. White's group discovered that $[\text{Mn}(t\text{BuPc})]\text{SbF}_6$ catalyst

preferentially forms C-N bond at the γ -C-H bond of the equatorial C(23) methyl group and provided oxathiazinane **64** with high site- and diastereoselectivity (Scheme 15, b).⁷³



Scheme 15. Previously reported C-H amination examples on the PCT core.

To the best of our knowledge, besides the abovementioned few examples of C-H hydroxylation and the only two C-H amination examples, there are no reports on C-C bond-forming C-H activation approaches within the pentacyclic triterpenoid scaffolds; however, some successful examples of C(sp^3)-H arylation of smaller natural terpene molecules were reported.⁷⁴ Moreover, during the past few decades, a plethora of C(sp^3)-H arylation methods using different directing groups and catalytic systems, and suitable for the late-stage functionalization of complex molecules, were developed.^{75,76,77,78} Hence, this Thesis describes previously unexplored site-selective palladium-catalyzed C(sp^3)-H (het)arylation of pentacyclic triterpenoids.

2.1. C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids

The studies were started by preparing PCT derivatives bearing 8-aminoquinolinamide and picolinamide directing groups developed by Daugulis,⁷⁹ which are connected to the triterpenic skeleton either by an innate carboxylic amide **65a-d** or by a more flexible -CH₂-NH- linker **66a-d** (Fig. 8).

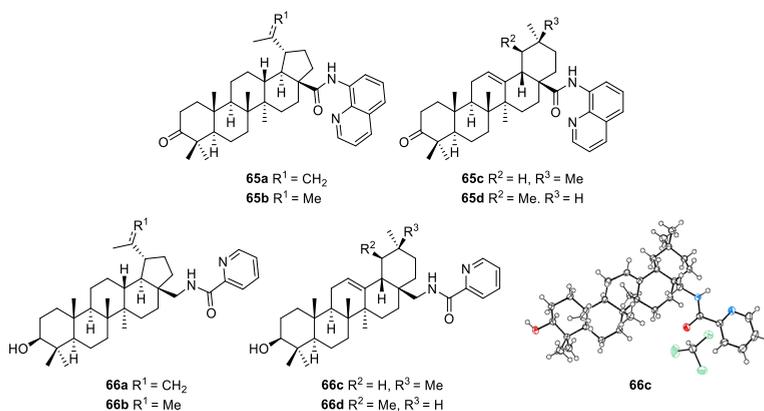
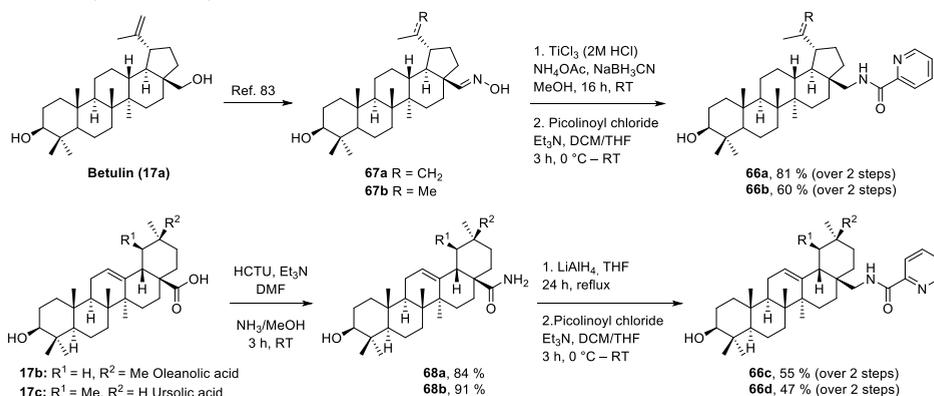


Fig. 8. Triterpenic 8-aminoquinolinamides **65a-d** and picolinamides **66a-d**.

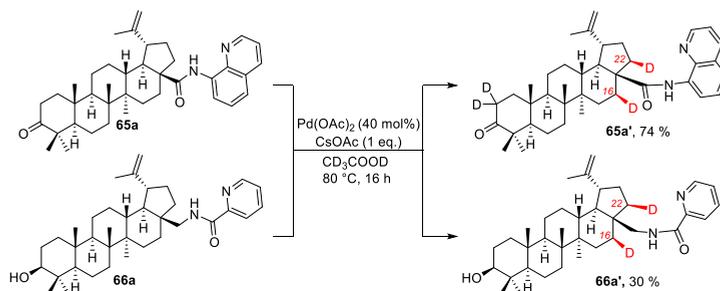
8-Aminoquinoline amides **65a-d** were prepared by simple coupling of betulonic, ursonic and oleanonic acids with an 8-aminoquinoline, with pre-transformation of acids into an acid chloride.^{80, 81} Picolinamide⁸² directing auxiliary was installed by triterpenic C(28) amine reaction with picolinoyl chloride. Betulinamine and its saturated congener were obtained from the reduction of corresponding oximes⁸³ **67a** and **67b**. Commercially available oleanolic and ursolic acids were converted into corresponding amines in two steps.^{84, 85} *In situ*-generated activated esters were converted into amides **68a** and **68b**. Reduction of the latter with LiAlH₄ afforded primary amines, which were converted into picolinamides **68a** and **68b** using previously developed reaction conditions (Scheme 16).



Scheme 16. Synthesis of picolinic amides **66a-d**.

To explore the ability of the obtained directing group bearing PCT derivatives to complex palladium and provide C-H deuteration products that would demonstrate the feasibility of the C-H

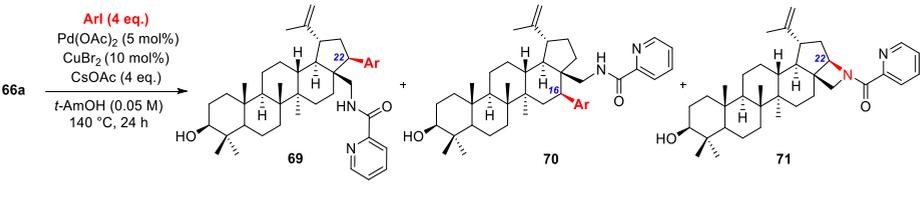
activation event, betulin-derived starting materials **65a** and **66a** were subjected to C-H deuteration experiments using deuterated acetic acid as a solvent in the presence of Pd(OAc)₂ and CsOAc (Scheme 17). Both substrates provided C(16)/C(22) double-deuterated products. Inspired by the possibility of the C-H activation event, we started screening possible reaction conditions for the C-H arylation reaction. Surprisingly, no efficient reaction conditions for C-H arylation were found in the case of quinolinamide **65a**.



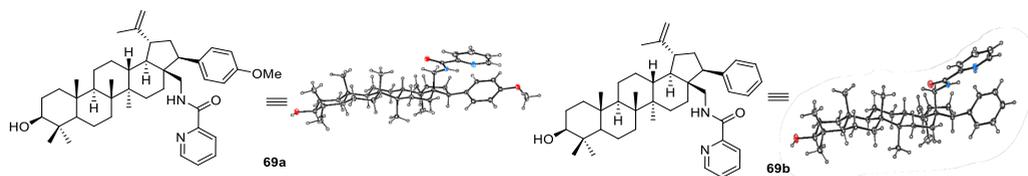
Scheme 17. C(*sp*³)-H deuteration of **65a** and **66a**; for clarity, the acidic -OH and -NH groups are depicted in their non-deuterated form as they undergo fast proton exchange during the isolation process.

Nevertheless, conformationally more flexible picolinamide **66a** was found to be an appropriate starting material for the target C-H arylation reactions. The combination of picolinamide **66a** (1 equiv.), 4-iodoanisole (4 equiv.), Pd(OAc)₂ (5 mol%), CuBr₂ (10 mol%)⁸⁶ and CsOAc (4 equiv.) in *t*-AmOH was found to be the most efficient reagent combination yielding a mixture of C(22)- and C(16)-regioisomers **69a** and **70a** in a 92:8 ratio with 83 % total yield. With suitable C(*sp*³)-H arylation conditions in hand, we examined the scope of the aryl iodide components (Table 1). Electron-rich aryl iodides displayed good reactivity, and C(*sp*³)-H arylation products **69a-d/70a-d** were obtained in the summary yield range 50–83 % (Table 1). Two molecular structures of compounds **69a** and **70b** were unambiguously proven by their single crystal X-ray analysis (Fig. 9). In all cases, the formation of C(22)-azetidine byproduct **71** was observed. Arylation employing iodoarenes with electron-withdrawing substituents resulted in decreased yields of arylated regioisomers within a 29–54 % yield range. On the other hand, iodobenzenes with substituents such as -COOMe, -C(O)Me, -CN, -Cl, -NO₂ (Table 1) afforded azetidine **71** as the major product in 40–64 % yields. The highest azetidine yield was observed with I-C₆H₄-CN (64%), but I-C₆H₄-NO₂ provided it as a single reaction product in 61 % yield, which facilitated its isolation and purification. Azetidines as C(*sp*³)-H arylation byproducts have been reported before, and a targeted C-H azetidination protocol employing AgOAc/C₆F₅I on simple model substrates has been previously reported by Wu and co-workers.⁸⁷ Furthermore, there are also reports on azetidine formation from picolinamide in the presence of Pd-catalyst, PhI(OAc)₂ and Li₂CO₃.^{88, 89} However, in our hands, these copper-free conditions did not result in any conversion of starting material **66a**.

Table 1

Scope and Isolated Yields of C(*sp*³)-H Arylation Products of Picolinamide **66a**.


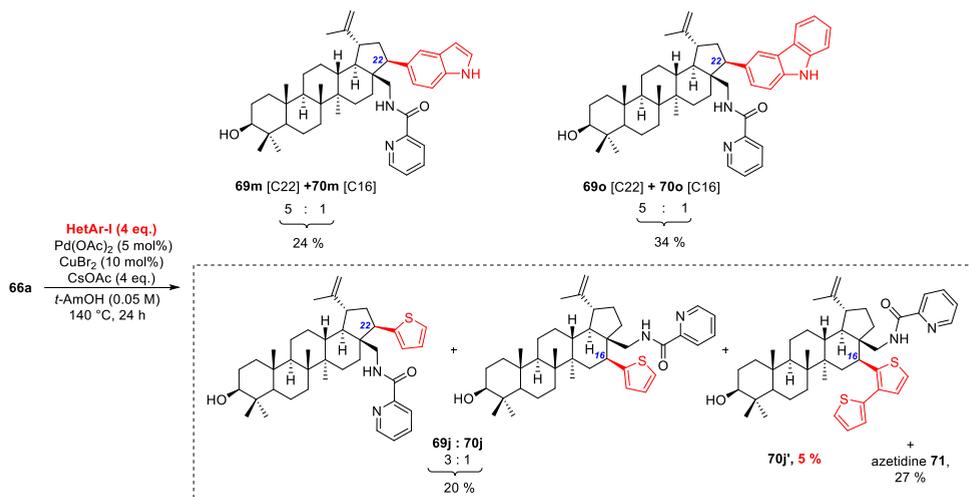
Ar	Yield of 69a-i (%)	Yield of 70a-i (%)	Yield of 71 (%)
	69a , 76	70a , 7	10
	69b , 64	70b , 9	26
	69c , 60	70c , 5	19
	69d , 45	70d , 6	10
	69e , 32	70e , 6	36
	69f , 32	70f , 6	56
	69g , 22	70g , 7	40
	69h , 19	70h , 12	64
	69i , 42	70i , 12	44
	-	-	61

Fig. 9. Single crystal X-ray diffraction analysis of **69a** and **69b**.

We have tested also C(*sp*³)-H (het)arylation reactions of **66a** with 4-iodo *N,N*-dimethyl aniline, 3-iodopyridine and 4-iodo-1-methyl-1*H*-pyrazole, but no conversion of starting material was observed. Moreover, we have tried hetarylation employing 5-iodo indole and 7-iodo carbazole (Scheme 18), and the expected arylation products **69m/70m** and **69o/70o** were isolated in 24 % and 34 % yields, respectively, albeit without formation of azetidine.

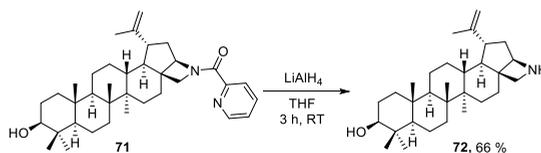
Reaction between **66a** and 2-iodo thiophene resulted in the formation of products **69j/70j** and azetidine **71**, and furthermore detectable amount of diarylated product **70j'** (5 %) was observed. The second C-H activation has taken place at the firstly installed thiophene moiety in product **70j** (Scheme 18).

To obtain other double arylation products utilizing other aromatic iodides, increased reaction time, higher concentration of an (het)aryl iodide component, as well as higher catalyst loading were applied; however, no additional double arylation products were detected.



Scheme 18. C(sp^3)-H heteroarylation of picolinamide **66a**.

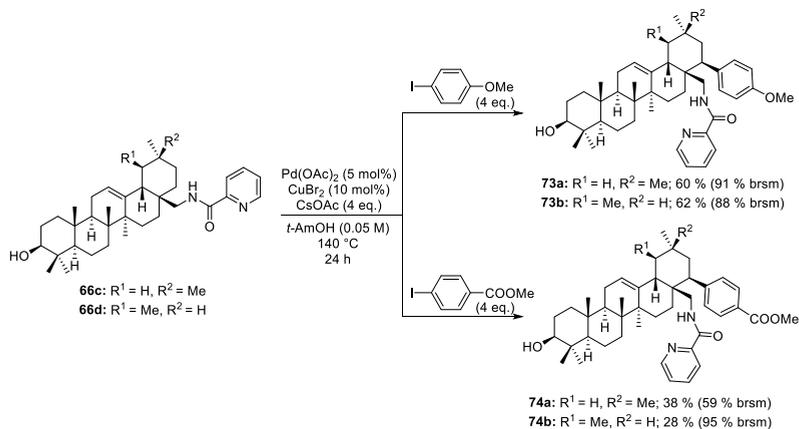
To provide NH azetidines for further synthetic applications, we explored the cleavage of the picolinamide moiety. Reductive cleavage conditions employing LiAlH_4 in THF at room temperature were found to be efficient to afford the desired product **72** (Scheme 19).



Scheme 19. Synthesis of unprotected azetidine **72**.

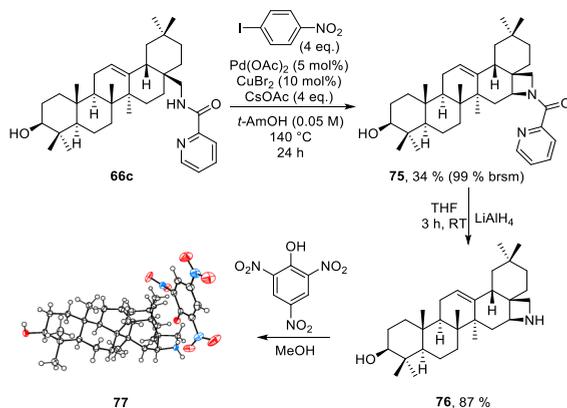
Inspired by the successful arylation of betulin core, we have also examined the arylation of oleanolic and ursolic acid-derived picolinamides **66c,d** employing electron-rich 4-methoxyphenyl iodide and electron-poor 4-iodobenzoic acid methyl ester (Scheme 20). Target transformation of ursane and oleanane cores resulted in a higher 19 : 1 site-selectivity at C(22); however, full conversion of **66c** and **66d** was not reached. Similar to the observation in the betulin series, the

electron-deficient 4-iodobenzoic acid methyl ester gave significantly lower yields of arylation products **74a,b** than the reaction with 4-methoxyphenyl iodide. Remarkably, the presence of side product azetidine was detected only in trace amounts in the case of oleanane and ursane starting materials **66c,d**.



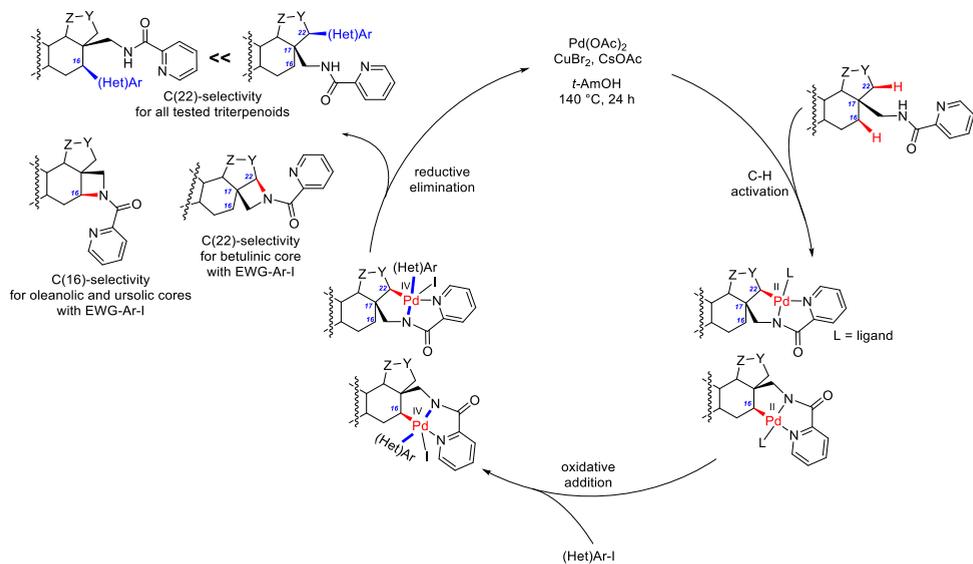
Scheme 20. C(*sp*³)-H arylation oleanane and ursane derivatives **66c,d**.

C-H activation of oleanane derivative **66c** in the presence of 1-iodo-4-nitrobenzene gave excellent C(16) selectivity, albeit incomplete conversion. Following reductive cleavage of the directing group with LiAlH₄ afforded corresponding azetidine **76**, which was further transformed into crystalline azetidinium picrate **77**. The molecular structure of the latter and thus the C(16)-regioselectivity was unambiguously established by its single crystal X-ray diffraction analysis (Scheme 21).



Scheme 21. Azetidine **76** formation from oleanane-derived picolinamide **66c**.

Based on generally accepted concepts, reductive elimination is most likely the rate-limiting step in the $C(sp^3)$ -H arylation process.⁹⁰ Analyzing the observed regioselectivity patterns, we can conclude that reductive elimination proceeds more slowly in palladium(IV) complexes bearing aryl groups with electron-withdrawing substituents. In such cases, the formation of a C-N bond via reductive elimination can outcompete C-C bond formation. In the betulinic series, for example, when 4-nitroiodobenzene (4-NO₂-C₆H₄I) is used in the oxidative addition step (Scheme 22), the reductive elimination from the C(22)-[Pd]-NC(O) intermediate is favored over that from the C(22)-[Pd]-Ar-EWG complex, resulting in the formation of an azetidine. Similarly, in the oleanane series, the general trend in reductive elimination rates is observed as follows: Ar-EDG > picolinamide > Ar-EWG. However, in this case, the C-H activation step is slower and occurs selectively at C(16), making it kinetically comparable to the rate of reductive elimination from the C(16)-[Pd]-NC(O) intermediate. Consequently, starting material **66c** affords azetidine **75** at the C(16) position upon reaction with 4-NO₂-C₆H₄I. Moreover, azetidine formation at C(22) in the oleanane scaffold would create an unfavorable 1,3-diaxial interaction with one of the geminal C(20) methyl groups – a steric hindrance that is absent in the betulin molecular framework.



Scheme 22. Plausible Pd-catalyzed $C(sp^3)$ -H arylation and azetidination mechanism.

In summary, we developed the first C-C bond-forming $C(sp^3)$ -H activation method in triterpenoids via palladium-catalyzed arylation of triterpenoid picolinamides with aryl iodides. The tested betulin, oleanane, and ursane scaffolds underwent selective C(22)-arylation in moderate to good yields. Oleanane and ursane derivatives gave high C(22)/C(16) selectivity (up to 19 : 1), while betulin-based substrates provided the highest yields (up to 83 %). Electron-rich aryl iodides

avored arylation, whereas their electron-deficient counterparts promoted C(*sp*³)-azetidination. The latter was exclusively observed in the presence of 4-nitroiodobenzene, and its regioselectivity varied by the employed scaffold. Thus, betulin gave C(22)-azetidine, while oleanane gave C(16)-azetidine. The picolinamide group can be cleanly removed using Zn/HCl. The obtained arylated and azetidine-fused triterpenoids offer promising platforms for further medicinal chemistry research.

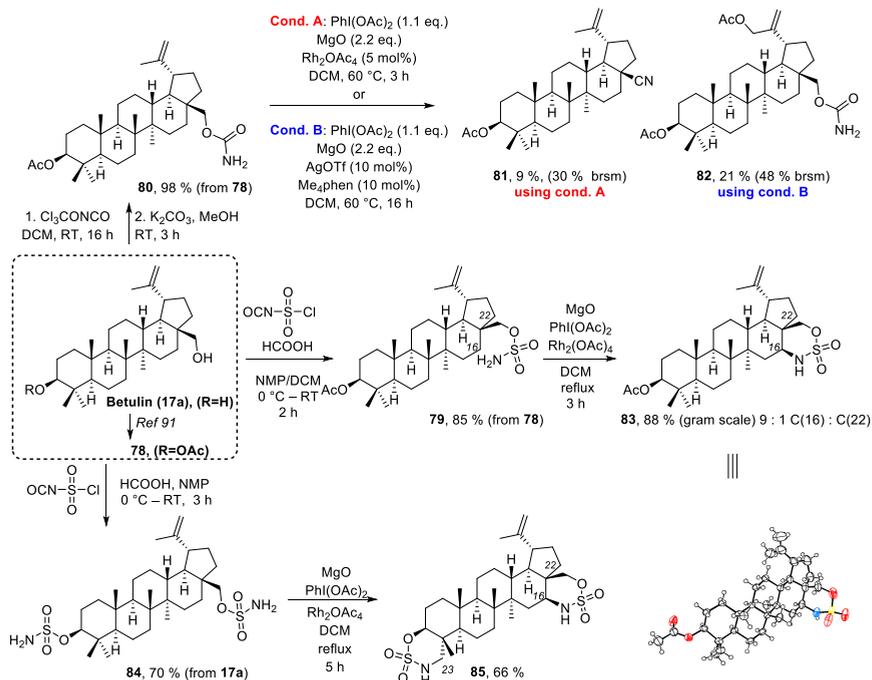
More information about these studies is available in the publication by Kroškins, V., Lugiņina, J., Lācis, R., Kumar, D., Kumpiņš, V., Rjabovs, V., Mishnev, A., Turks, M., Palladium-catalyzed C-H arylation and azetidination of pentacyclic triterpenoids, *ACS Omega*. **2025**, *10*, 27992–28019, (Appendix 5).

2.2. C-H amination of pentacyclic triterpenoids

Absence of C-H amination examples in literature on PCT skeleton D and E ring, employing C(28) derived directing auxiliaries and several examples of C-N bond formation via intermolecular C(*sp*³)-H amination in terpene, steroid and alkaloid molecules, caused an interest in developing PCT derivatives bearing functional handles at C(28) suitable for C-H amination reaction. For that purpose, we decided to synthesize from C(28) alcohol **78**⁹¹ easily available carbamate and sulfamate esters. Based on our previous experience, we chose to avoid radical involving conditions to escape possible double bond interaction and proceed with transition metal catalyzed nitrene generation and following the C-H insertion approach.

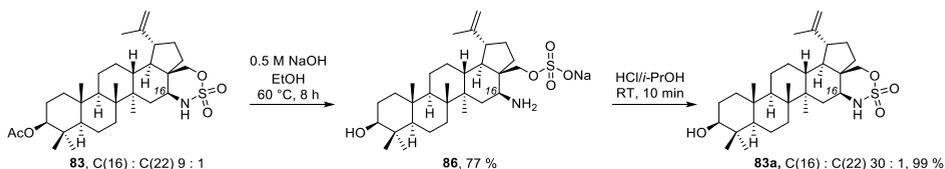
We have found that the carbamate tethered betulin derivative **80** does not provide the expected amination products under Rh- and Ag-catalytic conditions. Instead, upon increased temperature (60 °C in pressure tube) and longer reaction time, formation of degradation products and C(28) nitrile **81** was detected. Formation of the latter can be explained by C-H amination reaction at C(28), forming an unstable 4-membered ring, which rapidly underwent decarboxylative oxidation by PIDA to yield the nitrile⁹² (Scheme 23). Switching to silver catalysis employing different silver sources⁹³ like (AgOTf, AgPF₆ or AgSbF₆) in combination with MgO and PhI(OAc)₂ or PhIO, revealed weak conversion of the starting material and slow formation of degradation products. Catalytic Me₄phen additive promoted the allylic C-H acetoxylation reaction to yield product **82**.

It was gratifying to find that sulfamate ester **79** displayed full conversion after 3 h, and two regioisomers in 9 : 1 ratio were obtained using the following reaction conditions: 2.2 equiv. MgO, 1.1 equiv. PhI(OAc)₂ and 2 mol% Rh₂(OAc).⁹⁴ The structure of major isomer **77** was unambiguously determined by X-ray diffraction analysis. Similarly, betulin 3,28-di-O-sulfamate ester **84** was prepared with 70 % yield. The latter smoothly underwent double C-N bond formation using previous conditions to yield C(23) and C(16)aminated product **85** as the major isomer (Scheme 23).



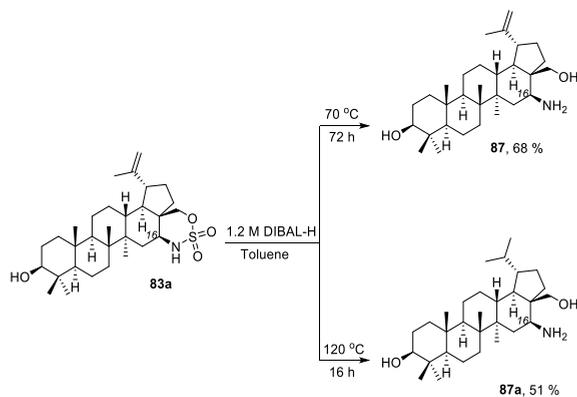
Scheme 23. C-H amination of betulin core.

Next, we explored the reactivity of the obtained 1,2,3-oxathiazinane-2,2-dione **83** in nucleophilic ring-opening reactions to cleave the ring and obtain 1,3-difunctionalized C(16)-amino derivatives. Several attempts for this transformation employing vigorous reaction conditions and different nucleophiles (e.g., N₃⁻, AcO⁻, PhS⁻, morpholine and water) did not provide any conversion of the starting material due to the low electrophilicity of the oxathiazinane ring. Only basic hydrolysis using 0.5M NaOH ethanolic solution led to nucleophilic attack at the sulfur atom, yielding ionogenic 1,3-aminosulfate **86**. Acidification of the obtained sulfate sodium salt induced rapid ring closure back to the oxathiazinane ring, giving C(3)-hydroxy-oxathiazinane derivative **83a**. (Scheme 24). Moreover, we noticed that sulfate **86** undergoes selective precipitation from ethanolic solution, which results in an improvement of the initial C(16):C(22) 9 : 1 regioisomer ratio in compound **7** to 30 : 1 for compound **86**. Filtrate analysis of compound **86** precipitation has revealed that the minor C(22)-isomer of **83a** did not undergo ring opening in the presence of 0.5 M NaOH ethanolic solution and did not form ionogenic C(22) product, ensuring sufficient polarity difference for selective precipitation. Several strongly acidic and strongly basic hydrolytic conditions have been applied to cleave the sulfate moiety from the intermediate **86**, to obtain 1,3-aminoalcohol derivative, but none of them were found to be efficient.



Scheme 24. Synthesis of sulfate **86** and its cyclization to **83a** in acidic media.

Application of reductive conditions using DIBAL-H solution in toluene was found to be useful to succeed ring opening of the oxathiazinane ring to establish the desired 1,3-aminoalcohol motif **87** with 68 % yield. Increased reaction temperature caused faster conversion of the reaction material; however, complete reduction of the double bond was observed (Scheme 25).

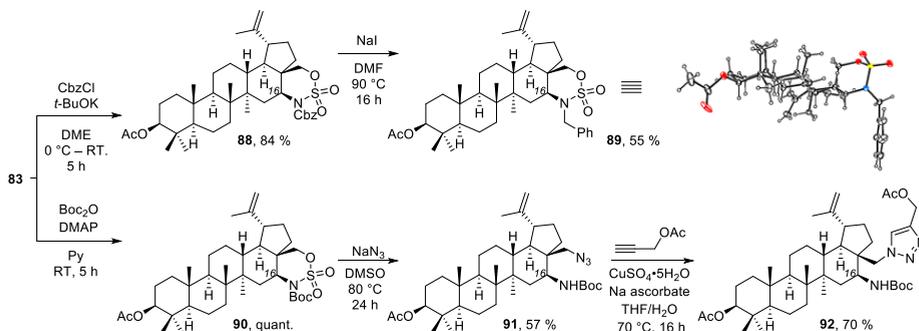


Scheme 25. Reductive ring opening of 1,2,3-oxathiazinane-2,2-dione **83a**.

To increase the electrophilicity of the oxathiazinane ring and facilitate ring-opening reactions with previously unreactive nucleophiles, two different carbamoylations of the -NH moiety were accomplished. Then the ring-opening attempts of *N*-Cbz oxathiazinane **88** resulted mostly in Cbz deprotection, and the desired ring-opening products were formed only in trace amounts. Curiously, in the case of iodide nucleophile, we have observed Cbz-group transformation into *N*-benzyl group. The latter can be explained by *in situ* decarboxylation of the Cbz group, benzyl iodide formation and following *N*-benzylation of the oxathiazinane ring. The structure of *N*-benzyl side product **89** was determined unambiguously by X-ray diffraction analysis (Scheme 26).

Switching the *N*-Cbz group to the *N*-Boc group improved selectivity towards the formation of the desired 1,3-substituted product **91** in the case of the azide nucleophile. Nevertheless, other nucleophilic reagents (e.g., acetate, thiophenolate, morpholine, cyanide, thiocyanate, phenolate and methoxide) still resulted in *N*-Boc group cleavage, keeping the 1,2,3-oxathiazinane-2,2-dione ring intact. Poor reactivity of nucleophiles can be explained by C(28) of the betulin core being a neopentyl position, which is sterically hindered by the quaternary center at C(17) atom.⁹⁵ Optimal

conditions for the synthesis of aminoazide **91** used 2 equivalents of NaN_3 at 80°C in DMSO solution for 24 h. Next, the obtained azide **91** was employed in CuAAC (copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition) reaction with propargylic acetate in the presence of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to yield triazole **92** (Scheme 26).

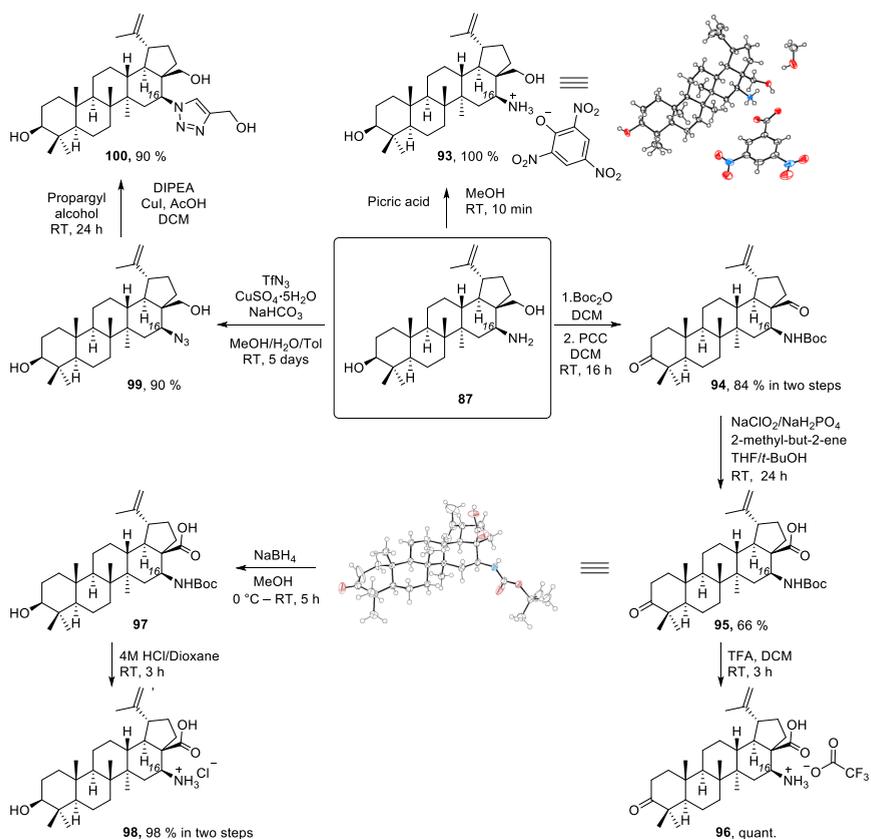


Scheme 26. Nucleophilic ring opening studies of *N*-protected oxathiazinanes **88** and **90**.

Obtained 1,3-aminoalcohol **87** was found to be a versatile feedstock for various useful synthetic transformations. Reaction of the latter with picric acid afforded picrate salt **93**, the structure of which was proved by single-crystal X-ray analysis (Scheme 27). Boc protection of amine functionality and the following two-step oxidation furnished *N*-Boc- β -amino betulonic acid **95**. Diastereoselective reduction of the latter at C(3) afforded *N*-Boc- β -amino betulonic acid **97**.

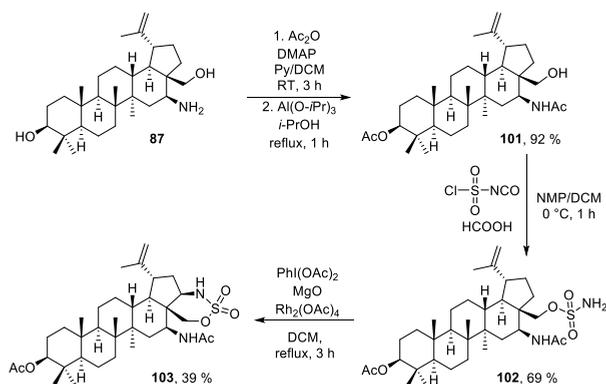
Boc deprotection of both amino acids to give corresponding β -amino acids in their trifluoroacetate salt form can be achieved by TFA treatment. However, in the case of betulonic acid derivative **97**, a trifluoroacetylation of the C(3) hydroxyl group was detected. Therefore, 4 M HCl/dioxane was found to be more efficient for selective *N*-Boc deprotection to yield β -amino acid **98** in its hydrogen chloride salt form.

Next, 16-azido-betulin **99** can be smoothly obtained from the corresponding amine *via* diazotransfer reaction, utilizing trifluoromethanesulfonyl azide in the presence of copper(II) additive. With compound **99** in hand, copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition furnished C(16)-triazolyl betulin **100** as a model compound for a virtually endless library of novel betulin-triazole conjugates (Scheme 27).



Scheme 27. Synthetic transformations of 1,3-aminoalcohol **87**.

At this point, we also explored the possibility of installing the second amino functionality at the triterpenoid core using the same sulfamate ester linker one more time. Accordingly, diacetate **101** was prepared *via* a protection/deprotection sequence and then carefully treated with *in situ* prepared sulfamoyl chloride at 0 °C, delivering sulfamate ester **102**. The latter was subjected to previously used C-H amination conditions. Target oxathiazinane **103** at betulin C(22) was obtained with moderate yield (Scheme 28). There is an expectation that the oxathiazinane cycle in compound **103** can be further transformed in a comparable way to that of compound **83**, which opens potential pathways for further transformations of the betulin core.



Scheme 28. Synthesis of sulfamate **102** and its application in C-H amination at C(22).

Regio- and diastereoselectivity of C-H activation most probably is determined by substrate control. The intermediate metallonitrene likely tends to insert into the equatorially aligned C-H bond of the D-ring of starting material **79**. This provides product **83** containing the newly formed cycle in a low-energy chair-like conformation. The intrinsic properties of the lupane core do not permit chair-like conformation of the newly formed cycle if it is attached to the E-ring (Fig. 10).

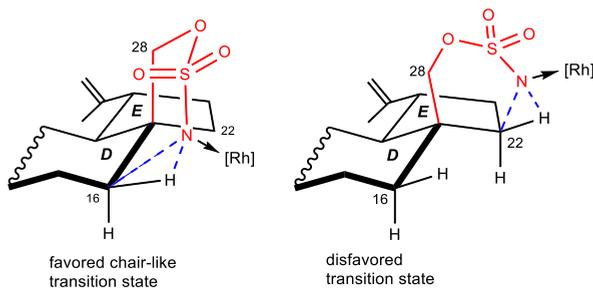
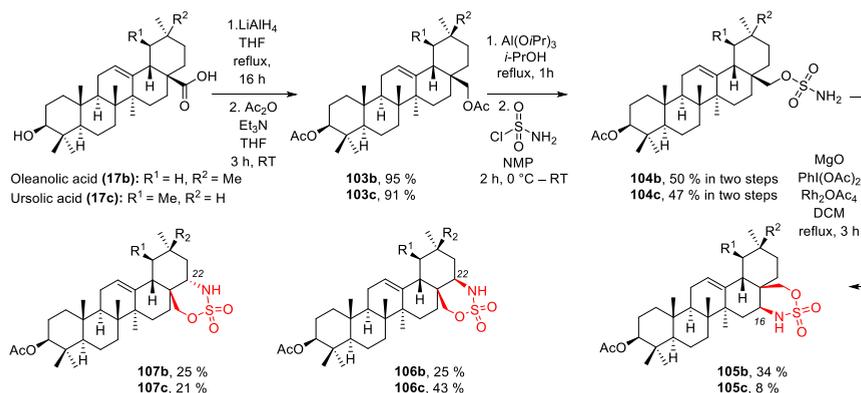


Fig. 10. C-H insertion transition states at C(16) and C(22).

Finally, we started the investigation of C-H amination of oleanane and ursane-derived sulfamate esters **104b,c**, which were obtained from corresponding commercially available acids **17b,c** in four steps. Same conditions as previously used resulted in full consumption of starting material, in a few hours delivering a mixture of three major products in both cases (Scheme 29): C(16) aminated product **105b,c** and a diastereomeric mixture of C(22) aminated products **106b,c** and **107b,c**. C-H amination of ursane core turned out to be more selective towards C(22) aminated product, presumably due to alternative location of methyl substituents at the E ring. Nevertheless, in comparison to the reaction of its oleanane counterpart, the total isolated yield was lower due to worse solubility in organic solvents and thus a more difficult isolation procedure. The loss of site selectivity compared to the betulin core can be explained by the different size and orthogonal

exposition of the triterpenoid E-ring. To obtain ring-opening product and facilitate easier separation of regio- and diastereoisomers, mixtures of aminated compounds **105b-107b** and **105c-107c** were subjected to previously successfully used ring-opening conditions. However, this time, attempted hydrolysis with NaOH failed to induce any conversion of starting material, displaying superior stability of oleanane- and ursane-derived oxathiazinanes. Further studies on C-H amination and the synthetic applications of the resulting products in ursane- and oleanane-type PCT series will be pursued in future projects.



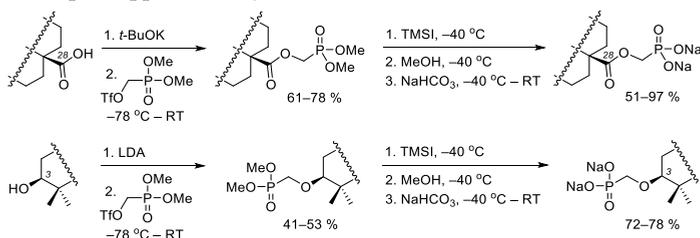
Scheme 39. Preliminary research of the synthesis and C-H amination reactions of oleanane- and ursane-derived sulfamate esters **104b,c**.

In summary, we have developed a novel synthetic method for site-selective C(16)-N bond formation on the D-ring of betulin using rhodium-catalyzed nitrene C-H insertion. Sulfamate ester, as the key starting material, was synthesized from natural betulin in a few steps. Despite the steric hindrance and rearrangement risk at the neopentyl C(28) position, several successful ring-opening reactions of the resulting oxathiazinane were achieved: 1) NaOH treatment yielded an aminosulfate salt; 2) NaN₃ gave a 1,3-aminoazide, which is a precursor to γ -amino C(28)-triazoles; 3) reductive ring-opening afforded a 1,3-aminoalcohol, leading to 16-amino-betulinic and betulonic acids. Additionally, 16-amino-betulin was transformed into 16-azido-betulin via diazotransfer. Notably, a second nitrene C-H insertion is possible at C(22) if the C(16) position is already aminated. The developed approach gives a straightforward approach to new lupane-type triterpenoid derivatives with amino or azido groups, offering valuable platforms for further modification and bioactivity studies in medicinal chemistry.

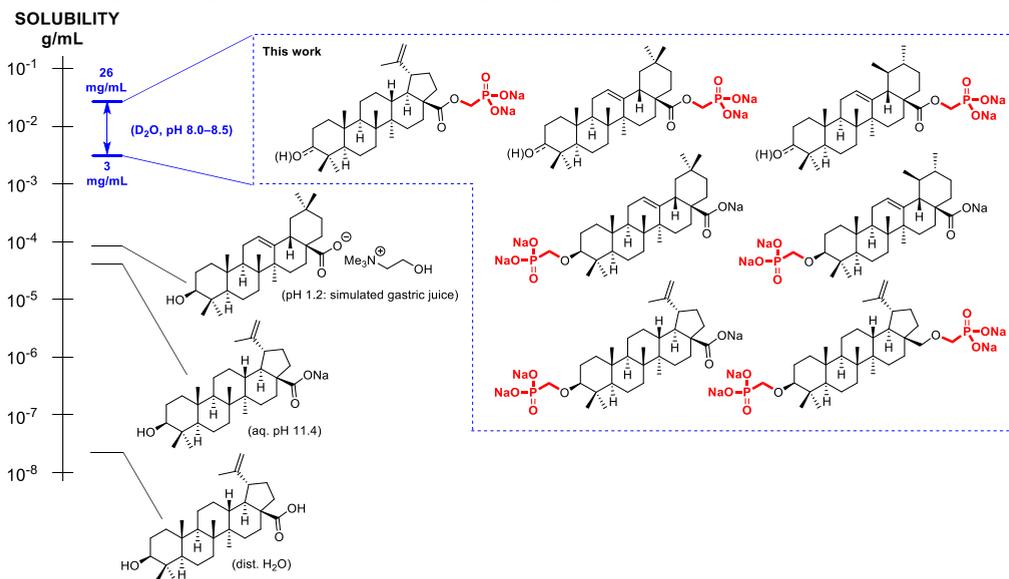
For more information on the studies described in this chapter, see the publication by Kroškins, V., Lugiņina, J., Lācis, R., Mishnev, A., Turks, M., Site-selective C-H amination of lupane type triterpenoids, *Eur. J. Org. Chem.*, **2025**, 2500340, (Appendix 6).

CONCLUSIONS

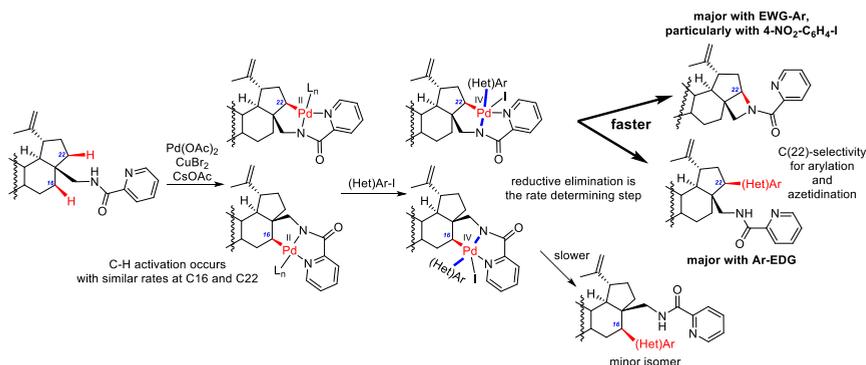
1. Despite the sterically hindered neopentyl environment at the C(3) and C(28) positions, the corresponding hydroxyl groups can be successfully alkylated with (dimethoxyphosphoryl)methyl trifluoromethanesulfonate. The alkylations are achieved under basic conditions, with *t*-BuOK employed for carboxylic acids and LDA for alcohols. The resulting methyl phosphonate intermediates can be selectively demethylated using TMSI while preserving the newly formed carboxylic ester moiety. The latter chemoselectivity can be ensured by conducting the entire sequence, including the neutralization step, at approximately $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.



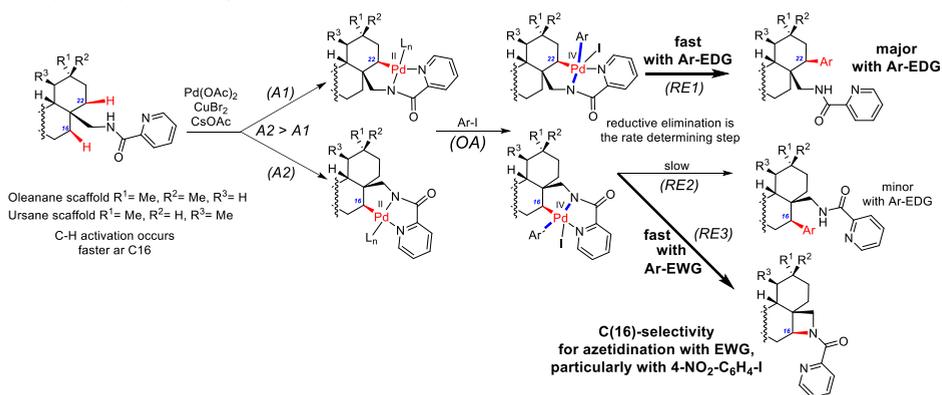
2. The obtained pentacyclic triterpenoid-phosphonate conjugates of types C(28)(CO)-O-CH₂-P(O)(ONa)₂ and C(3/28)-O-CH₂-P(O)(ONa)₂, featuring a minimal methylene linker between the terpenoid core and the phosphonate moiety, reveal remarkable aqueous solubility in the pH range 8.0–8.5 (3–26 mg/mL). This solubility is several orders of magnitude higher than that of the corresponding triterpenic acids or their salts.



3. In the betulin series, a fast and non-selective C-H activation occurs at both C(16)-H and C(22)-H, as proved by deuteration experiments, using both picolinamide and quinolinamide directing groups. The selectivity in subsequent C-H arylation and azetidination reactions is determined primarily by the reductive elimination step, which proceeds more readily at C(22) in either case. When electron-withdrawing aryl substituents (e.g., 4-nitrophenyl) are used, reductive elimination across the C-N bond is favored, resulting in azetidine formation at C(22). On the other hand, aryl groups bearing electron-donating substituents facilitate faster reductive elimination from C-[Pd]-Ar intermediates, leading to predominant formation of C(22)-arylated products, with selectivity ratios up to 9 : 1.



4. In the ursane and oleanane series, the C-H activation step occurs with C(16)-H selectivity (A2 > A1) and is slower compared to the betulin series. In the presence of electron-deficient aryl substituents (e.g., 4-nitrophenyl), the rate of C-H activation (step A2) becomes comparable to the rate of reductive elimination (RE3) from the C(16)-[Pd]-NC(O) intermediate, leading to the formation of C(16)-azetidine products. On the other hand, when electron-rich aryl substituents are used, the relative rates of reductive elimination follow the order RE1_{EDG} > RE2 >> RE3, favoring formation of C(22)-arylated products with C(22)/C(16) selectivity 19 : 1.



Acknowledgements

I would like to thank:

- Ministry of Economics of the Republic of Latvia for financial support from the project No. VPP-EM-BIOMEDICINA-2022/1-0001 “State research project in the field of biomedicine, medical technologies and pharmacy” (BioMedPharm);
- Kristaps Kļaviņš’ team for HRMS analysis;
- Anatoly Mishnev for X-ray analysis;
- OĶTI group and especially Rihards Lācis, Elza Fedorovska, Renārs Ozoliņš and Dinesh Kumar for their contributions to the development of the chemistry described in this Thesis;
- Jevgeņija Lugiņina and Māris Turks for their patient supervision and continuous support throughout the years.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA/REFERENCES

1. Ghante, M. H., Jamkhande, P. G. Role of Pentacyclic triterpenoids in Chemoprevention and Anticancer Treatment: an overview on targets and underlying mechanisms. *J. Pharmacopunct.* **2019**, *22*, 55.
2. Xiao, S., Wang, Q. Si, L., Shi, Y., Wang, H., Yu, F., Zhang, Y., Li, Y., Zheng, Y., Zhang, C., Wang C., Zhang, L., Zhou, D. Synthesis and anti-HCV entry activity studies of beta-cyclodextrin-pentacyclic triterpene conjugates. *ChemMedChem.* **2014**, *9*, 1060.
3. Sathya, S. Sudhagar, S., Sarathkumar, B., Lakshmi, B. S. EGFR inhibition by pentacyclic triterpenes exhibit cell cycle and growth arrest in breast cancer cells. *Life Sci.* **2014**, *95*, 53.
4. Wu, P., Tu, B., Liang, J., Guo, S., Cao, N., Chen, S., Luo, Z., Li, J., Zheng, W., Tang, X., Li, D., Xu, X., Liu, W., Zheng, X., Sheng, Z., Roberts, A. P., Zhang, K., Hong, W. D. Synthesis and biological evaluation of pentacyclic triterpenoid derivatives as potential novel antibacterial agents. *Bioorg. Chem.* **2021**, *109*, 104692.
5. Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules.* **2009**, *14*, 2016.
6. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of New drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770.
7. Safarzadeh, E., Shotorbani, S. S. & Baradaran, B. Herbal Medicine as inducers of apoptosis in Cancer Treatment. *Adv. Pharm. Bull.* **2014**, *4*, 421.
8. Lombrea, A., Scurtu, A. D., Avram, Z., Pavel, I. Z., Turks M., Luginina, J., Peipinš, U., Dehelean, C. A., Soica, C., Danciu, C. Anticancer potential of Betulonic acid derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3676.
9. Popov, S.A., Semenova, M.D., Baev, D.S., Sorokina, I.V., Zhukova, N.A., Frolova, T.S., Tolstikova, T.G., Shults, E.E., Turks, M. Synthesis and cytotoxicity of hybrids of 1,3,4- or 1,2,5-oxadiazoles tethered from ursane and lupane core with 1,2,3-triazole. *Steroids.* **2020**, *162*, 108698.
10. Wang, X, Bai, H., Zhang, X., Liu, J., Cao, P., Liao, N., Zhang, W., Wang, Z., Hai, C. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis. *Carcinogenesis.* **2013**, *34*, 1323.
11. Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Kwasniewicz, E., Deregowska, A., Wnuk, M. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. *Apoptosis.* **2017**, *22*, 800.
12. Similie, D., Minda, D., Bora, L., Kroškins, V., Luginina, J., Turks, M., Dehelan, C. A., Danciu, C. An update on Pentacyclic triterpenoids Ursolic and oleanolic acids and related derivatives as Anticancer candidates. *Antioxidants.* **2024**, *13*, 952.
13. Wang, C. M. Chen, H. S., Wu, Z. Y., Jhan, Y. L., Shyu, C. L., Chou, C. H. Antibacterial and synergistic activity of Pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules.* **2016**, *21*, 139.
14. Shu, C. Zhao, H., Jiao, W., Liu, B., Cao, J., Jiang, W. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing black spot rot on apple fruit and possible mechanisms involved. *Sci. Hortic.* **2019**, *256*, 108636.
15. Roy, S., Ghosh, A., Majie, A., Karmakar, A., Das, S., Dinda, S. C., Bose, A., Gorain, B. Terpenoids as potential phytoconstituent in the treatment of diabetes: from preclinical to clinical advancement. *Phytomedicine.* **2024**, *129*, 155638.
16. Costa, J. F. O., Meira, C. S., Gomes das Neves, M. V., Dos Reis, B. P. Z. C., Soares, M. B. P. Anti-inflammatory activities of Betulinic Acid: a review. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 883857.
17. Scheffler, A. The Wound Healing Properties of Betulin from Birch Bark from Bench to Bedside. *Planta Med.* **2019**, *85*, 524–527.
18. Pielok, M., Grymel, M. Betulin – application in dermatology and cosmetology. *Aesth. Cosmetol. Med.* **2023**, *12*, 97.
19. Frew, Q., Rennekampff, H. O., Dziewulski, P., Moiemien, N., Zahn, T., Hartmann, B. Betulin wound gel accelerated healing of superficial partial thickness burns: Results of a randomized, intra-individually controlled, phase III trial with 12-months follow-up. *Burns.* **2019**, *45*, 876.
20. Salvador, J. A. R., Leal, A. S., Valdeira, A. S., Gonçalves, B. M. F., Alho, D. P. S., Figueiredo, S. A. C., Silvestre, S. M., Mendes, V. I. S. Oleanane-, ursane-, and quinonemethide friedelane-type triterpenoid derivatives: recent advances in cancer treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 95–130.
21. Rogge, T., Kaplaneris, N., Chatani, N., Kim, J., Chang, S., Punji, B., Schafer, L. L., Musaev, D. G., Wencel-Delord, J., Roberts, C. A., Sarpong, R., Wilson, Z. E., Brimble, M. A., Johansson, M. J., Ackermann, L. C–H activation. *Nat. Rev. Methods. Primers.* **2021**, *1*, 43.

22. Arnott, J. A., Kumar, R., Planey, S. L. Lipophilicity indices for drug development, *J. Appl. Biopharm. Pharmacokinet.* **2013**, *1*, 31.
23. Chmiel, T. The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components. *Microchem J.* **2019**, *146*, 393.
24. Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 255–270.
25. Liu, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research Perspectives. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 92–94.
26. Serajuddin, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 603.
27. Fan, J. Lai, X. H., Zhang, X. H., Yang, L., Yuan, T. T., Chen, H. P., Liang, X. Synthesis and evaluation of the Cancer Cell Growth Inhibitory activity of the ionic derivatives of oleanolic acid and ursolic acid with improved solubility. *J. Mol. Liq.* **2021**, *332*, 115837.
28. Bag, B. G., & Dash, S. S. Self-assembly of Sodium and Potassium betulinates into Hydro-and Organo-Gels: entrapment and removal studies of fluorophores and synthesis of gel-gold nanoparticle hybrid materials. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 17290.
29. Wolfram, R. K., Heller, L., Csuk, R. Targeting mitochondria: esters of rhodamine B with triterpenoids are mitocanic triggers of apoptosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *152*, 21.
30. Dzhemileva, L. U., Tuktarova, R. A., Dzhemilev, U. M., D'yakonov, V. A. Pentacyclic Triterpenoids-Based Ionic Compounds: Synthesis, Study of Structure-Antitumor Activity Relationship, Effects on Mitochondria and Activation of Signaling Pathways of Proliferation, Genome Repairation and Early Apoptosis. *Cancers*, **2023**, *15*, 756.
31. Spivak, A. Y., Khalitova, R., Nedopekina, D., Dzhemileva, L., Yunusbaeva, M., Odinkov, V., D'yakonov, V., Dzhemilev, U. Synthesis and evaluation of Anticancer activities of Novel C-28 Guanidine-Functionalized Triterpene acid derivatives. *Molecules.* **2018**, *23*, 3000.
32. Spivak, A. Y., Nedopekina, D., Khalitova, R., Gubaidullin, R., Odinkov, V., Bel'skii, Y., Bel'skaya, N., Khazanov, V. Triphenylphosphonium cations of betulinic acid derivatives: synthesis and antitumor activity. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 518e531.
33. Bureeva, S., Pravdivy, J. A., Symon, A., Bichucher, A., Moskaleva, V., Popenko, V., Shpak, A., Shvets, V., Kozlov, L., Kaplun, A. Selective inhibition of the interaction of C1q with immunoglobulins and the classical pathway of complement activation by steroids and triterpenoids sulfates. *Bioor Med. Chem.* **2007**, *15*, 3489–3498.
34. Kazachenko, A. S., Akman, F., Vasylieva, N.Y., Issaoui, N., Malyar, Y. N., Kondrasenko, A. A., Borovkova, V. S., Miroshnikova, A.V., Kazachenko, A. S., Al-Dossary, O., Wojcik, M. J., Berezhnaya, Y. D., Elsuif'ev, E V. Catalytic Sulfation of Betulin with Sulfamic Acid: experiment and DFT calculation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1602.
35. Melnikova, N., Malygina, D., Klabukova, I., Belov, D., Vasin, V., Petrov, P., Knyazev, A., Markin, A. Betulin-3,28-diphosphate. Physico-Chemical properties and in Vitro Biological Activity experiments. *Molecules.* **2018**, *23*, 1175.
36. Chrobak, E., Kadela-Tomanek, M., Bębenek, E., Marciniak, K., Wietrzyk, J., Trynda, J., Pawelczak, B., Kusz, J., Kasperczyk, J., Chodurek, E. New phosphate derivatives of betulin as anticancer agents: synthesis, crystal structure, and molecular docking study. *Bioorg. Chem.* **2019**, *87*, 613–628.
37. Orchel, A., Chodurek, E., Jaworska-Kik, M., Padaszyński, P., Kaps, A., Chrobak, E., Bębenek, E., Boryczka, S., Borkowska, P., Kasperczyk, J. Anticancer activity of the Acetylenic Derivative of Betulin Phosphate involves induction of necrotic-like death in breast Cancer cells in Vitro. *Molecules.* **2021**, *26*, 615.
38. Krečmerová, M., Majer, P., Rais, R. & Slusher, B. S. Phosphonates and phosphonate prodrugs in Medicinal Chemistry: past successes and future prospects. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 889737.
39. Pradere, U., Garnier-Amblard, E. C., Coats, S. J., Amblard, F., & Schinazi, R. F. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154–9218.
40. Deng, S. L., Baglin, I., Nour, M., Flekhter, O., Vita, C., Cavé, C. Synthesis of Ursolic Phosphonate Derivatives as potential Anti-HIV agents. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2007**, *182*, 951–967.
41. Chrobak, E., Bębenek, E., Kadela-Tomanek, M., Latocha, M., Jelsch, C., Wenger, E., Boryczka, S. Betulin Phosphonates; synthesis, structure, and cytotoxic activity. *Molecules.* **2016**, *21*, 1123.
42. Chodurek, E., Orchel, A., Gwiazdoń, P., Kaps, A., Padaszyński, P., Jaworska-Kik, M., Chrobak, E., Bębenek, E., Boryczka, S., Kasperczyk, J. Antiproliferative and cytotoxic properties of Propynoyl Betulin derivatives against human ovarian Cancer cells: in Vitro studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16487.
43. Popov, S. A., Wang, C., Qi, Z., Shults, E. E., Turks, M. Synthesis of water-soluble ester-linked ursolic acid–gallic acid hybrids with various hydrolytic stabilities. *Synth. Commun.* **2021**, *51*, 2466.

44. Xu, Y., Lee, S. A., Kutateladze, T. G., Sbrissa, D., Shisheva, A., Prestwich, G. D. Chemical Synthesis and Molecular Recognition of Phosphatase-Resistant Analogues of Phosphatidylinositol-3-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 885.
45. Dehaem, W., Mashentseva, A. A. & Seitembetov, T. S. Allobetulin and its derivatives: synthesis and Biological Activity. *Molecules*. **2011**, *16*, 2443.
46. Cruz-Cabeza, A. J. Acid-base crystalline complexes and the pKa rule. *CrystEngComm*. **2012**, *14*, 6362.
47. Franz, R. G. Comparisons of pKa and log P values of some carboxylic and phosphonic acids: synthesis and measurement. *AAPS PharmSci*. **2001**, *3*, 1–13.
48. Labinger, J. A. & Bercaw, J. E. Understanding and exploiting C–H bond activation. *Nature*. **2002**, *417*, 507–514.
49. Gandeepan, P., Müller, T., Zell, D., Cera, G., Warratz, S., Ackermann, L. 3d transition metals for C-H activation. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 2192.
50. Ghosh, K. K., van Gemmeren, M. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 17697.
51. He, C., Gaunt, M. J. Ligand-Enabled Catalytic C-H Arylation of Aliphatic Amines by a Four-Membered-Ring Cyclopalladation Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15840.
52. Zaitsev, V. G., Shabashov, D., Daugulis, O. Highly Regioselective Arylation of sp³ C-H Bonds Catalyzed by Palladium Acetate. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13154–13155.
53. Cui, W., Chen, S., Wu, J.-Q., Zhao, X., Hu, W., Wang, H. Palladium-Catalyzed Remote C(sp³)–H Arylation of 3 Pinanamine. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4288.
54. Coomber, C. E., Porter, M. J., Aliev, A. E., Smith, P. D., Sheppard, T. D. Tuning Reactivity in Pd-catalyzed C(sp³)–H Arylations via Directing Group Modifications and Solvent Selection. *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 5105.
55. Lapointe, D., Fagnou, K. Overview of the Mechanistic Work on the Concerted Metallation–Deprotonation Pathway. *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 1118–1126.
56. García-Cuadrado, D., Braga, A. A. C., Maseras, F., Echavarren, A. M. Proton Abstraction Mechanism for the Palladium-Catalyzed Intramolecular Arylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1066.
57. Ghosh, S., Shilpa, S., Athira, C., Sunoj, R. B. Role of Additives in Transition Metal Catalyzed C-H Bond Activation Reactions: A Computational Perspective. *Top. Catal.* **2022**, *65*, 141.
58. Bay, K. L., Yang, Y. F., Houk, K. N. Multiple roles of silver salts in palladium-catalyzed C-H activations. *J. Organomet. Chem.* **2018**, 864, 19.
59. Shing, K. P., Liu, Y., Cao, B., Chang, X. Y., You, T., Che, C. M. N-Heterocyclic Carbene Iron(III) Porphyrin-Catalyzed Intramolecular C(sp³)–H Amination of Alkyl Azides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11947.
60. Liu, Y., Xiao, W., Wong, M. K., Che, C. M. Transition-Metal-Catalyzed Group Transfer Reactions for Selective C-H Bond Functionalization of Artemisinin. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4107.
61. Kroškins, V., Turks, M. Recent investigations in synthesis of oxathiazinanes by sulfamate ester cyclization (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2023**, *59*, 637.
62. Guthrie, D. B., Curran, D. P. Asymmetric Radical and Anionic Cyclizations of Axially Chiral Carbamates. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 249.
63. Chiappini, N. D., Mack, J. B. C., Du Bois, J. Intermolecular C(sp³)–H Amination of Complex Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4956.
64. Mu, T., Wei, B., Zhu, D., Yu, B. Site-selective C-H hydroxylation of pentacyclic triterpenoids directed by transient chiral pyridine-imino groups. *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 4371.
65. Mu, T., Xu, P., Yu, B. Facile Synthesis of Oleanane-type Pentacyclic Triterpenoids Bearing Hydroxy Groups on D/E Rings. *Asian. J. Org. Chem.* **2021**, *10*, 1752.
66. Baldwin, J. E., Jones, R. H., Najera, C., Yus, M. Functionalisation of unactivated methyl groups through cyclopalladation reactions. *Tetrahedron*. **1985**, *41*, 699.
67. Sun, F., Zhu, P., Yao, H., Wu, X., Xu, J. A Partial Synthesis of 23-Hydroxybetulonic Acid and 23-Hydroxybetulinic Acid Starting from Betulinic Acid. *J. Chem. Res.*, **2012**, *36*, 254.
68. Zhu, C., Tang, P., Yu, B. Total Synthesis of Lobatoside E, A Potent Antitumor Cyclic Triterpene Saponin. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5872.
69. Honda, T., Janosik, T., Honda, Y., Han, J., Liby, K. T., Williams, C. R., Couch, R. D., Anderson, A. C., Sporn, M. B., Gribble, G. W. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Biotin Conjugates of 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic Acid for the Isolation of the Protein Targets. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4923.
70. Simmons, E., Hartwig, J. Catalytic functionalization of unactivated primary C–H bonds directed by an alcohol. *Nature*. **2012**, *483*, 70.

71. Berger, M., Knittl-Frank, C., Bauer, S., Winter, G., Maulide, N. Application of Relay C-H Oxidation Logic to Polyhydroxylated Oleanane Triterpenoids. *Chem* **2020**, *6*, 1183.
72. Zhang, T., Hu, X., Dong, X., Li, G., Lu, H. Iridium-Catalyzed Unreactive C(sp³)-H Amination with 2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl Azide. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6260.
73. Paradine, S. M., Griffin, J. R., Zhao, J., Petronico, A. L., Miller S. M., White, M. C. A manganese catalyst for highly reactive yet chemoselective intramolecular C(sp³)-H amination. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 987.
74. Sennari, G., Yamagishi, H., Sarpong, R. C-H functionalization of camphor through emerging approaches. *Chem. Lett.* **2024**, *53*, upae204.
75. Martínez-Mingo, M., García-Viada, A., Alonso, I., Rodríguez, N., Gómez Arrayás, R., Carretero, J. C. Overcoming the Necessity of γ -Substitution in δ -C(sp³)-H Arylation: Pd-Catalyzed Derivatization of α -Amino Acids. *ACS Catal.* **2021**, *11*, 9, 5310–5317.
76. Weng, Y.; Ding, X.; Oliveira, J. C. A.; Xu, X.; Kaplaneris, N.; Zhu, M.; Chen, H.; Chen, Z.; Ackermann, L. Peptide late-stage C(sp³)-H arylation by native asparagine assistance without exogenous directing groups. *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, 9290.
77. Chen, Z.; Zhu, M.; Cai, M.; Xu, L.; Weng, Y. Palladium-Catalyzed C(sp³)-H Arylation and Alkynylation of Peptides Directed by Aspartic Acid (Asp). *ACS Catal.* **2021**, *11*, 7401.
78. Li, Y. -H., Ouyang, Y., Chekshin, N., Yu, J. -Q. PdII-Catalyzed Site-selective β - and γ -C(sp³)-H Arylation of Primary Aldehydes Controlled by Transient Directing Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 4727.
79. Zaitsev, V. G., Shabashov, D., Daugulis, O. Highly Regioselective Arylation of sp³ C-H Bonds Catalyzed by Palladium Acetate. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13154.
80. Kroškins, V., Luginina, J., Mishnev, A., Turks, M. Synthesis of 8-Aminoquinoline Amides of Ursolic and Oleanonic Acid. *Molbank* **2022**, *2022*, M1361.
81. Flekhter, O. B., Boreko, E., I., Nigmatullina, L., R., Tret'yakova, E., V., Pavlova, N., I., Baltina, L., A., Nikolaeva, S., N., Savinova, O., V., Eremin, V. F., Galin, F. Z., Tolstikov, G. A. Synthesis and Antiviral Activity of Betulonic Acid Amides and Conjugates with Amino Acids. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2004**, *30*, 80.
82. Nadres, E. T., Santos, G. I., Shabashov, D., Daugulis, O. Scope and Limitations of Auxiliary-Assisted, Palladium-Catalyzed Arylation and Alkylation of sp² and sp³ C-H Bonds. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9689.
83. Luginina, J., Linden, M., Bazulis, M., Kumpinš, V., Mishnev, A., Popov, S. A., Golubeva, T. S., Waldvogel, S. R., Shults, E. E., Turks, M. Electrosynthesis of Stable Betulin-Derived Nitrile Oxides and their Application in Synthesis of Cytostatic Lupane- Type Triterpenoid-Isoxazole Conjugates. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 2557.
84. Jin, B., Dong, Q., Hung, G., Kaldor, S. W. Terpenoid Derivatives and Uses Thereof. WO 2020068689 A1, April 2, 2020.
85. Zhao, W., Zhang, H., Wang, H., Tang, X., Wu, J., Ruan, Z., Li, J., Fu, Y. Caffeoyl Substituted Pentacyclic Triterpene Derivative and Use Thereof. WO 2014154131 A1, October 2, 2014.
86. Coomer, C. E., Benhamou, L., Bučar, D. -K., Smith, P. D., Porter, M. J., Sheppard, T. D. Silver-Free Palladium-Catalyzed C(sp³)-H Arylation of Saturated Bicyclic Amine Scaffolds. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 2495.
87. Sun, W. -W., Cao, P., Mei, R. -Q., Li, Y., Ma, Y. -L., Wu, B. Palladium-Catalyzed Unactivated C(sp³)-H Bond Activation and Intramolecular Amination of Carboxamides: A New Approach to β -Lactams. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4880.
88. He, G., Zhao, Y., Zhang, S., Lu, C., Chen, G. Highly Efficient Syntheses of Azetidines, Pyrrolidines, and Indolines via Palladium Catalyzed Intramolecular Amination of C(sp³)-H and C(sp²)-H Bonds at γ and δ Positions. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3.
89. Nadres, E. T., Daugulis, O. Heterocycle Synthesis via Direct C-H/N-H Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7.
90. Antermite, D., White, A. J. P., Casarrubios, L., Bull, J. A. On the Mechanism and Selectivity of Palladium-Catalyzed C(sp³)-H Arylation of Pyrrolidines and Piperidines at Unactivated C4 Positions: Discovery of an Improved Dimethylaminoquinoline Amide Directing Group. *ACS Catal.* **2023**, *13*, 9597–9615.
91. Krasutsky, A. P., Carlson, R. M., Nesterenko, V. V. PCT/US2001007908-A1. January 16, **2001**.
92. Patil, R. D., Gupta, M. K. Production of Nitrogen-Containing Compounds via the Conversion of Natural Microalgae from Water Blooms Catalyzed by ZrO₂. *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 3987.
93. Ju, M., Huang, M., Vine, L. E., Dehghany, M., Roberts, J. M., Schomaker. Tunable catalyst-controlled syntheses of β - and γ -amino alcohols enabled by silver-catalysed nitrene transfer. *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 899.
94. Espino, C. G., Wehn, P. M., Chow, J., Du Bois, J. Synthesis of 1,3-Difunctionalized Amine Derivatives through Selective C-H Bond Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6935.
95. Kasal, P., Jindřich, J. Kinetics of Nucleophilic Substitution of Compounds Containing Multiple Leaving Groups Bound to a Neopentyl Skeleton. *ACS Omega* **2022**, *7*, 20137.



Vladislavs Kroškins dzimis 1996. gadā Gusj Hrustalnijā, Krievijā. Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU) ieguvis bakalaura (2019) un maģistra (2021) grādu ķīmijas tehnoloģijā. Patlaban ir RTU Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātes Ķīmijas un ķīmijas tehnoloģijas institūta pētnieks. Zinātniskās intereses saistītas ar jaunu bioloģiski aktīvu dabasvielu atvasinājumu sintēzi, kā arī procesu ķīmiju un patentbrīvu farmaceitisko preparātu sintēzes metožu izstrādi.

Vladislavs Kroškins was born in 1996 in Gus Khrustalny, Russia. He received his Bachelor's (2019) and Master's (2021) degrees in Chemical Technology from Riga Technical University (RTU). He is currently a researcher at the Institute of Chemistry and Chemical Technology, Faculty of Natural Sciences and Technology, RTU. His scientific interests are related to the synthesis of new biologically active derivatives of natural products, as well as process chemistry and the development of synthetic methods for off-patent drugs.