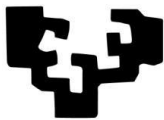


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FARMAZIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE FARMACIA

1,2-DIHIDROKINOLINA/HIDANTOINA
HIBRIDOEN SINTESIA ETA AKTIBITATE
ZITOTOXIKOAREN EBALUAZIOA

———— GRADU AMAIERAKO LANA ————

Ainara Pellicer Rivera

Farmaziako Gradua

2022/2023 ikasturtea

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1
2. HELBURUAK	6
3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	7
3.1 1,2-DIHIDROKINOLINEN SINTESIA	7
3.2 1,2-DIHIDROKINOLINA/HIDANTOINA HIBRIDOEN SINTESIA	12
3.3 AKTIBITATE ANTIPROLIFERATIBOAREN EBALUAZIOA	14
4. ONDORIOAK	15
5. ATAL ESPERIMENTALA	16
5.1 ATAL KIMIKOA.....	16
5.1.1 TEKNIKAK ETA MATERIALA	16
5.1.2 1,2-DIHIDROKINOLIA DERIBATUEN SINTESIA	17
5.1.3 1,2-DIHIDROKINOLINA/HIDANTOINA HIBRIDOEN SINTESIA....	19
5.2 ATAL BIOLOGIKOA	21
5.2.1 TEKNIKAK ETA MATERIALA	21
5.2.2 ZITOTOXIKOTASUN PROBAK	21
6. BIBLIOGRAFIA	22

LABURDUREN ZERRENDA

Ar	Aromatikoa
CCK8	Cell Counting Kit-8
d	Dobletea
dd	Doble bikoitza
DEPT	Distortsio gabeko gehikuntza polarizazioaren transferentzia
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfoxidoa
EMA	Sendagaien Europako erakundea
FDA	Elikagaien eta sendagaien administrazioa
F.p.	Fusio-puntua
HRMS	Erresoluzio handiko masa espektrometria
IC₅₀	Inhibiziorako kontzentrazio maximoaren erdia
IR	Espektroskopia infragorria
J	Akoplamendu konstantea
m	Multipletea
NMR	Erresonantzia Magnetiko Nuklearra
p	<i>para</i>
ppm	Milioiko zatiak
s	Singletea
t	Tripletea
THF	Tetrahidrofuranoa
TLC	Geruza fineko kromatografia
δ	Desplazamendu kimikoa
λ	Uhin luzera

LABURPENA

Azken urteetan, terapia klasikoen eraginkortasun mugatuaren ondorioz, polifarmakologia izeneko konbinazio terapien inguruko ikerketen kopurua handitu egin dela ikusi da. Arlo honen barruan, hainbat iturri terapeutiko modulatzen diren molekula hibridoaren sintesiak garrantzi handia hartu du.

Farmakologia arloan, heteroziklo nitrogenatuak garrantzi handia daukate, izan ere, farmako anitzen unitate farmakoforo moduan ageri dira. Hidantoinak eta kinolinek, aktibitate biologiko ugari erakusten dituztenez haien kabuz, beraien arteko deribatu hibrido desberdinen sintesia proposatu da. Horretarako, lehenik eta behin, ingurune azidoan katalizatutako etil pirubatoaren eta *p*-metoxianilinaren arteko aza-Povarov erreakzioa optimizatu da 1,2-dihidrokinolinak lortzeko. Ondoren, fenil isoziato erreaktiboa gehitu zaio erreakzioari, aurreko pausuan lortutako biziklo egituraren hidantoina nukleoa txertatzeko.

Azkenik, 1,2-dihidrokinolinaren eta 1,2-dihidrokinolina/hidantoina deribatu hibridoaren *in vitro* jardueraren zitotoxikoa aztertu da giza biriketako (A549) eta giza obulutegiko (SKOV3) minbizi zelula-lerroetan, bizikloen eta trizikloen emaitzak alderatuz, hibridoaren sintesiaren aktibitate antiproliferatiboa onurarik dakarren aztertzeko.

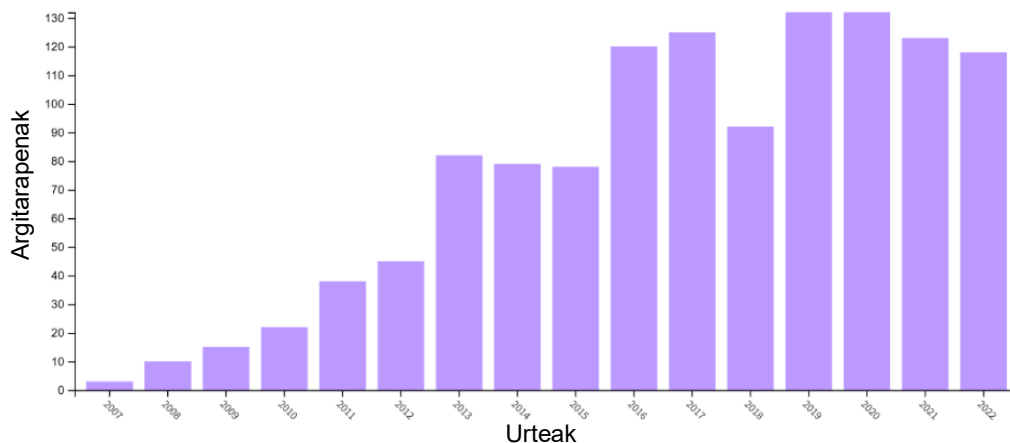
1. SARRERA

Antzintatik, hainbat zibilizaziok, sendagai gisa erabili zitezkeen produktu naturalen bildumak egin zituzten, baina, XIX. mendearen amaieran, hain toxikoak ez ziren sendagaiak behar izatearen ondorioz, substantzia sintetikoak erabiltzen hasi ziren agente terapeutiko gisa.^[1] Ondorioz, gaur egungo ikerlarien helburu nagusienetako bat molekula berriak diseinatzea eta lortzea da, alde batetik, dauden edo identifikatu berri diren gaixotasunen tratamenduak hobetzeko, eta bestetik, tratamendu seguruagoak eta eraginkorragoak ezartzeko.

Aipatu beharra dago, orain dela gutxi arte, farmakoak diana espezifiko bat modu selektiboan modulatzeko disenatuak izan direla, beste itu batzuetan eraginik ez izatea nahitaezko ezaugarria izanik. Ikuspegi tradizional hau soilik faktore bakarreko alterazioekin lotutako gaixotasunak tratatzeko egokia da, izan ere, ez da kontuan hartzen sistema biologikoen atal desberdinak beraien artean erlazionatuta daudenik.^{[2],[3]} Hain zuzen ere, ikerkuntza ugari erakutsi dute patologia konplexuak multifaktorialak direla, eta hainbat prozesu fisiologikoren deserregulazioa jasaten dutela, hala nola, sindrome metabolikoa, nerbio-sistema zentralaren gaixotasun psikiatrikoak edo endekapenezkoak (NSZ) eta minbizia.^[3] Gaixotasun hauetan, normalean, bide baten inhibizioa beste bide batzuen aktibazioaren bidez konpentsatzen denez, sendagai dosi altuagoak behar dira erresistentzia egoera horiei aurre egiteko, albo-ondorioen arriskua areagotuz.^[4] Horregatik, gaixotasun konplexu horiek tratatzeko polifarmakologia izeneko konbinazio-terapia behar izaten da, "farmako bat, helburu bat, gaixotasun bat" paradigma klasikoa bertan behera uzten duena.^[5]

Polifarmakologia kontzeptuak, farmako batek itu terapeutiko ezberdinetan aldi berean jarduteko duen gaitasuna adierazten du. Ezaugarri horri esker, farmakoak hainbat bidetatik eraso diezaioke gaixotasunari, eta ez bakar batetik, tratamenduen eraginkortasuna hobetuz.^[6] Gainera, jadanik erabiltzen diren farmakoentzako erabilera eta indikazio berriak identifika daitezke, bai eta ekintza espezifiko bat duten molekulen eragina indartu, beraien egiturari beste molekula bat gehitzean.

Hortaz gain, "web of science" datu-basetik lortutako erreferentziek agerian uzten dute polifarmakologiarekin zerikusia duten ikerketak gero eta gehiago argitaratzen ari direla. Izan ere, izenburuan, laburpenean edo gako-hitzetan termino hau duten kaleratutako artikuluen eta berrikuspenen kopuruak etengabe gora egin du azken 15 urteetan (1. irudia).^[4]

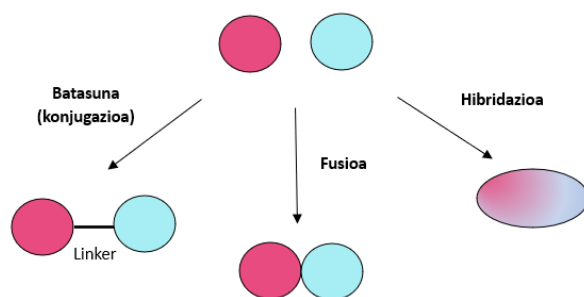


1. Irudia. Azken 15 urteetan "polifarmakologia" terminoa duten argitarapenen kopuruen grafikoa.

Gaur egun, sendagai anitzeko terapiarako hiru ikuspegi nabarmenenak, farmako bi edo gehiago aldi berean hartzea (sendagaien konbinazioa), bi agente aktibo edo gehiago konprimitu bakarrean koformulatzea (sendagaien elkarketa) eta itu terapeutiko ugari modulatzeko gai diren molekula hibridoak garatzea dira.^[7]

Itu anitzeko farmakoek, molekula bakar batez osatuta daudenez, hainbat abantaila erakusten dituzte batera baina molekula ezberdinetan administratzen diren printzipio aktiboekin aldaratuta. Ondo diseinatutako eta orekatutako itu anitzeko molekula batek medikamentu batzuk ordezkatu ditzake terapia konbinatuan, eta, ondorioz, tratamenduaren konplexutasuna, sendagaien albo-ondorioak, konplexutasun farmakozinetikoa eta interakzio farmakologikoak gutxitu daitezke. Halaber, argi dago, paziente batek sendagai gutxiago hartu behar dituzenean errazagoa dela posologia egokia betetzea.^{[5],[8]} Hortaz gain, estrategia honen bidez errazagoa da gaitza kontrolpean izatea, gaixotasunerako garrantzitsuak diren ituak aldi berean blokeatzen direlako eta sendagaia beharrezkoa den ehun guztietan aldi berean egotea bermatzen duelako.^[5] Oro har, printzipio aktibo bati beste molekula bat txertatzean bere eraginkortasun terapeutikoa areagotu daiteke sinergien bidez. Azkenik, itu terapeutiko anitz dituzten farmakoak aurkitzeak abantaila ekonomikoak ere eskaintzen ditu; izan ere, molekula mota hauen garapen klinikoak saiakuntza kliniko gutxiago eskatzen ditu farmako espezifiko askok baino.^{[4],[5]}

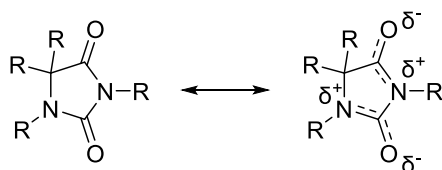
Itu anitzeko molekulen diseinu arrazionala hiru estrategia nagusitan oinarritzen da: konjugazioa, fusioa eta hibridazioa (2. irudia).



2. Irudia. Itu anitzeko molekulen diseinurako estrategiak.^[3]

Alde batetik, konjugazio estrategian linker deituriko "kate molekularrak" erabiltzen dira bi molekula beraien artean konektatzeko. Metodo honen bidez, jatorrizko molekulak elkartu egiten dira bakoitzak banaka duen aktibitatea eta iturarekin elkar egiteko modua mantenduz.^[5] Bestetik, fusioan, bi molekula fusionatuko dira, kasu honetan beraien egituran dituzten talde funtzionalen bidez. Azkenik, hibridazioari dagokionez, molekula aktiboen talde farmakoforoen konbinazioan oinarrituta dago, jatorrizko farmakoekin alderatuta eraginkortasun hobea duen konposatu hibrido berri bat sortzeko asmoarekin. Estrategia honen bidez, selektibitate profil desberdinak, ekintza-mekanismo desberdinak (edota dualak), eta albo-ondorio deziragaitz murriztuak dituzten molekula berriak lor daitezke.^[9]

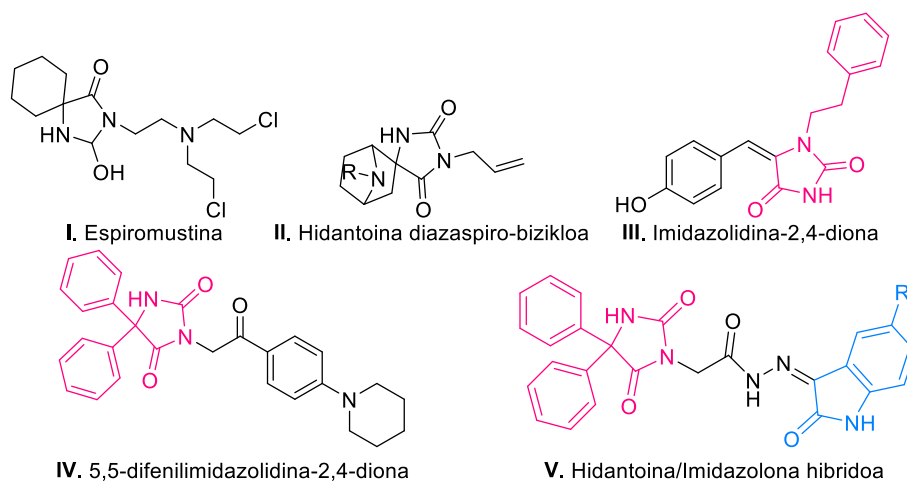
Heteroziklo nitrogenatuak, zalantzarik gabe, konposatu organikoen familiarik zabalenetakoa da, eta hauek, oso erabiliak dira medikuntzako eta osasun-arlo askotan,^[10] izan ere, FDAk eta EMAk onartutako pisu molekular baxuko bost farmakoetatik hiruk nitrogenodun heteroziklo egituraren bat daukate,^[11] eta gainera, oso ugariak dira produktu naturalen eta material funtzionalen molekuletan.^[12] Familia honen barruan, hidantoinak heteroziklo oso interesgarriak dira, molekula hibridoak diseinatzeko erabili daitezkeenak. Hidantoina edo imidazolina-2,4-diona egitura, bi nitrogeno eta bi karbonilo talde dituen bost kideko eraztun batez osatuta dago. Egonkortasun handia duenez baldintza azido zein basikoen aurrean, eta gainera, organismoan sartzean erraz deskonposatzen denez, hidantoina nukleoa ezin hobea da prestakin farmazeutikoetan erabiltzeko. Horrez gain, hidantoina eraztuna laua denez, beste molekula batean egitura hau txerutzen denean, zurruntasun hobea lortuko da. Zikloaren planaritatea molekularren erresonantzia-egituren bidez azal daiteke, izan ere, 1-2 eta 3-4 posizioetan lotura bikoitz izaera antzeman daiteke (3. irudia).^[13]



3. Irudia. Hidantoina eraztunaren erresonantzia.^[13]

Hidantoina egitura duten konposatuek aktibitate farmakologiko eta biologiko anitz dituzte, izan ere, minbiziaren aurkako, hanturaren aurkako, antidiabetiko, mikrobioen aurkako, antikonbultsibo, antiagregatzaile plaketario eta GIBaren aurkako aktibitateak dituzten molekula deskribatu dira. Minbiziari dagokionez, hidantoinek aktibitate antiproliferatiboa dutela frogatu da, besteak beste, sirtuin proteinen, bcl-2 proteinen eta NADPH oxidasaren inhibizioen eta androgeno hartzaileen modulazioaren ondorioz.^[14] Hauen artean, espiromustina (**I**) eta hidantoina diazaspiro-biziklo (**II**) sintetikoak aurki ditzakegu (4. irudia).^[15]

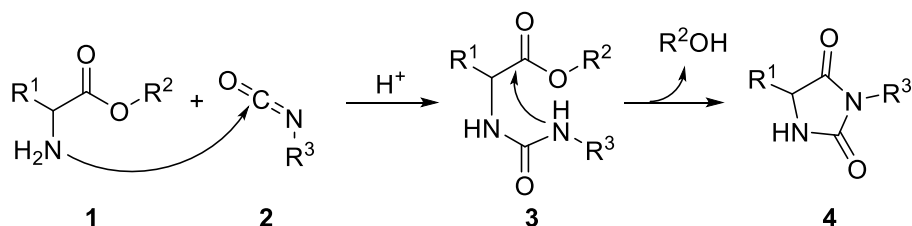
Adibide horiez gain, 5,5-difenilimidazolidina-2,4-diona (**IV**) deribatuak zelulaz hazkuntzaren inhibizio jardura oparoa erakutsi zuen minbizi zelula-lerro desberdinetan, hazkunde epidermikoaren faktorearen (EGFR) kinasaren inhibizioaren ondorioz (4. irudia). Halaber, imidazolidina-2,4-dionatik eratorritako **III** hidantoinak jardura antiproliferatibo ona erakutsi zuen A549 biriketako minbizi zelula-lerroaren aurka, eta gainera, EGFR hartzailearen autofosforilazioa inhibitzeko gaitasuna erakutsi zuen zelula-lerro berean (4. irudia). Minbiziaren aurkako jarduerarekin jarraituz, isatina eta Schiff baseak dituzten konposatuak oso erabilgarriak dira ere. Adibiderik aipagarriena, FDAk onartutako sunitinib farmakoa da, giltzurruneko zelulen kartzinoma (RCC) eta urdail-hesteetako estromaren tumorea tratatzeko erabiltzen dena. Azkenik, literaturan, ikerlari batzuek agente zitotoxiko eraginkorragoak bilatzeko asmoarekin deribatu hibrido berriak sintetizatu zituztela aurki daiteke, 5,5-difenilimidazolidina-2,4-diona eta 5-ordezkatutako isatinaren konjugazioaren bidez hain zuzen ere (**V**) (4. irudia).^[16]



4. Irudia. Hidantoina deribatuen adibideak eta hidantoina/imidazolona hibridoak.

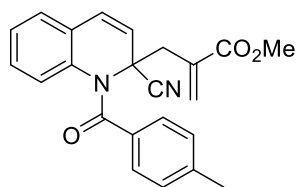
Hidantoina nukleoa sintetizatzeko metodo anitz deskribatu dira historian zehar, baina aipagarrienak, Urech/Read, Bucherer-Bergs eta Biltz metodoak dira.^[17] Hauen artean, Urech/Read metodoa sinpleena, errazena eta eraginkorrenetakoa da.^[18] Mekanismoari dagokionez, lehenik eta behin, baldintza azidoetan **1** aminoazido deribatuaren amina taldearen eta **2** isozianatoaren sp karbonoaren arteko eraso nukleozale bat emango da, eta

ondoren, eratu berri den **3** bitartekariak erreakzio intramolekular bat jasango du, urearen aminaren eta ester taldearen artean, eraztuna itxiz eta, **4** hidantoina eratzuz (1. eskema).

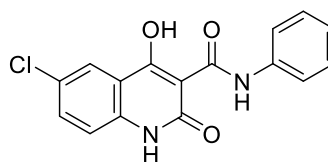


1. Eskema. Hidantoina eraztunaren sintesia Urech/Read metodoaren bidez.

Hidantoinen kasuan bezala, kinolina deribatuak oso erabilgarriak dira ere heterozikloetan oinarritutako molekula hibridoak diseinatzeko.^[19] Hauen artean, 1,2-dihidrokinolinak aurki ditzakegu, hau da, bigarren posizioiko lotura bikoitza erreduzituta duten kinolinaren analogoak. Konposatu heterozikliko nitrogenatu hauek, jarduera terapeutikoak dituzten deribatu ugarietan aurkitzen dira, hala nola, mikrobioen aurkako,^[20] birusen aurkako,^[21] minaren aurkako^[22] eta tuberkulosiaren aurkako^[23] aktibitatea duten molekuletan. Era berean, minbiziaren aurkako eraginkortasuna duten 1,2-dihidrokinolina batzuk deskribatu dira. Esate baterako, *in vitro* lortutako emaitzek erakutsi dute EEDQ2 (**VI**) molekula etorkizunean minbiziaren aurkako farmako batean bihur daitekeela (5. irudia).^[24] Bestetik, fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K α) entzimaren aktibazio anormalaren ondorioz, zelulak kontrolik gabe hazi eta ugaltzen dira eta **VII** molekula entzimaren aminoazido desberdinetara lotzen dela ikusi da (5. irudia).^[25]



VI. EEDQ2

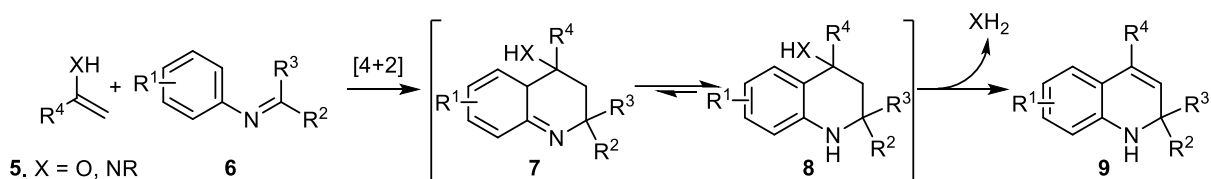


VII. 4-hidroxi-6-kloro-2-oxo-N-fenil-1,2-dihidrokinolina-3-karboxamida

5. Irudia. Minbiziaren aurka eraginkorrak diren 1,2-dihidrokinolinak.

Ikuspuntu sintetikoari begira, 1,2-dihidrokinolina eraztuna duten molekulak isolatzea bereziki zaila da, produktu hauek haien deribatu aromatikoetara espontaneoki oxidatzeko joera erakusten dutelako. Substratu hauek modu erraz eta eraginkor batean lortzeko estrategia bat heterozikloaren 2. karbonoaren ordezkapen bikoitza burutzea da. Orain arte, estrategia hau erabiltzen duten hainbat adibide deskribatu dira biziklo hauen sintesia burutzeko, esate baterako, Skraup erreakzio eraldatuak,^[26] Michael-aldol erreakzioak^[27] eta alkinoak dituzten amina aromatikoaren tandemeko erreakzioak.^{[28],[29]} Kasu hauetan, azido korrosibo indartsuak eta katalizatzaile metaliko garestiak edo hainbat urrats sintetikoaren bidez lortutakoak erabiltzen dira, horregatik, molekula hauek lortzeko metodologia sinpleagoak

garatzea guztiz beharrezkoa da.^[30] Orain arte aipatu diren metodoen alternatiba bat, aza-Povarov erreakzioaren erabilera da. Erreakzio hau, **5** enol edo enamina deribatu baten eta 4π sistema moduan funtzionatzen duen **6** imina *N*-aromatiko baten arteko [4+2] zikloadizioan oinarritzen da. Zikloadizio erreakzio honek, **7** konposatu ezegonkorra sortzen du, **8** egitura erresonante aromatikora tautomerizatzen dena. Azkenik, **5** lehengaitik eratorritako amina edo alkohol taldea galdu egiten da 1,2-dihidrokinolina sortuz. Mekanismo honen bidez lortutako produktuek 2. karbonoa guztiz ordezkatuta daukate, eta horrela, molekularen bat-bateko oxidazioa ekiditen da (2. eskema).



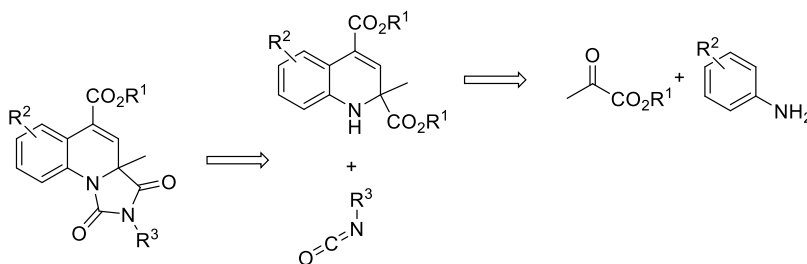
2. Eskema. aza-Povarov erreakzioaren bidez burututako 1,2-dihidrokinolinen sintesia.

2. HELBURUAK

Literaturan deskribatutako hidantoina eta dihidrokinolina deribatuen aplikazio biologikoak kontuan hartuta, Gradu Amaierako Lan honetarako proposatutako helburu orokorrak 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoen sintesia burutzea, eta minbizi zelula-lerro desberdinetan duten aktibitate antiproliferatiboa neurtzea izango dira.

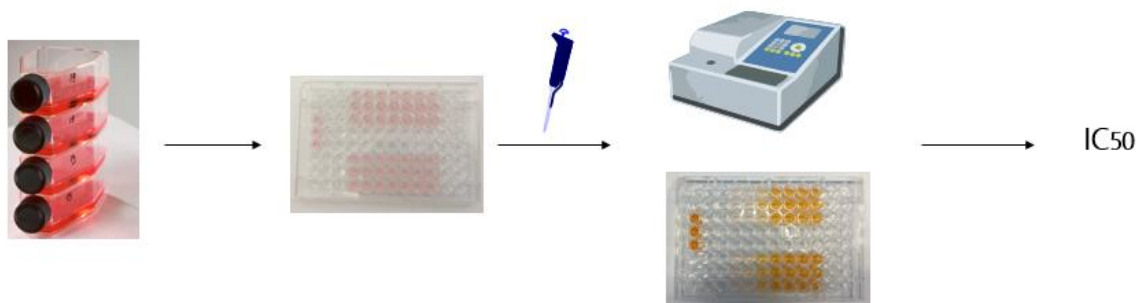
Alde batetik, ikuspuntu sintetikoari dagokionez, pirubato eta anilina ezberdinak erabiliko dira, aza-Povarov erreakzio organokatalitikoaren bidez ordekatzaile ezberdinak dituzten 1,2-dihidrokinolinak lortzeko. Behin bizikloak sortu direnean, isozianato molekula gehituko zaio erreakzioari 1,2-dihidrokinolina/hidantoina trizikloak eskuratzeko (3. eskema). Lan honen helburu nagusia hibridoen sintesia izan arren, 1,2-dihidrokinolinak isolatu eta karakterizatuko dira ere (RMN, IR, etab.), bi konposatuen arteko ezberdintasunak aztertzeko.

[30], [31]



3. Eskema. 1,2-Dihidrokinolina/hidantoina hibridoen erretrosintesia.

Bestalde, lan honen bigarren zatian, lehenengo fasean lortutako substratuen *in vitro* aktibitate zitotoxikoa ebaluatuko da minbizi zelula-lerro ezberdinetan. Gainera, bizikloekin eta trizikloekin lortutako IC₅₀ balioak alderatuko dira, hibridoen sintesiak aktibitate antiproliferatiboan onurarik dakarren aztertzeko (6. irudia).

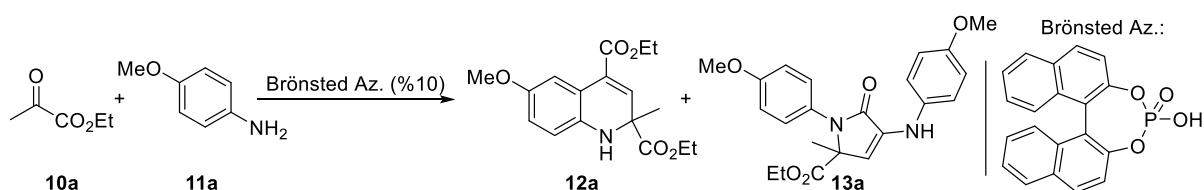


6. Irudia. Aktibitate zitotoxikoaren ebaluazioaren prozedura.

3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

3.1 1,2-DIHIDROKINOLINEN SINTESIA

Aztertutako aza-Povarov erreakzioa burutzen denean, 1,2-dihidrokinolinaz gain, **4** laktama azpiproduktua eratzen denez, lehenik eta behin, erreakzioa optimizatu egin zen. Horretarako, erreakzio baldintza optimoenak identifikatzeko, erreakzioa disolbatzaile, temperatura eta denbora ezberdinetan burutu zen (7. irudia). Ereduek erreakzio gisa, Brönsted azido katalizatzailearen presentzian, etil pirubato (**10a**) eta *p*-metoxianilina (**11a**) nahastu ziren **12a** 6-metoxi-2-metil-1,2-dihidrokinolina-2,4-dikarboxilato bizikloa sortzeko, **13a** laktamarekin batera (4. eskema).



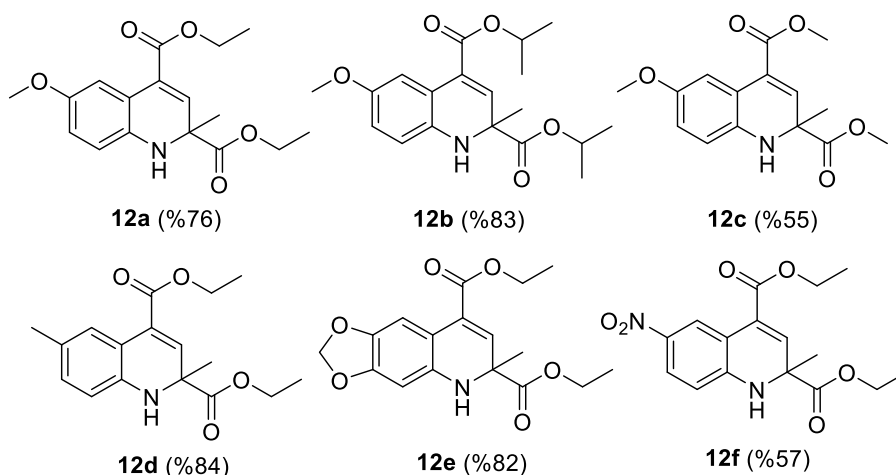
4. Eskema. Aza-Povarov erreakzioaren eskema orokorra.

1. **Taula.** Disolbatzaile, tenperatura eta denbora ezberdinen frogak.

Sarrera	Disolbatzailea	Temperatura (°C)	Denbora (h)	Dihidrokinolina/Laktama
1	CDCl ₃	25	0.5	75:25
2	CDCl ₃	25	24	34:66
3	CDCl ₃	65	18	70:30
4	Toluenoa	25	0.5	44:56
5	Toluenoa	25	24	22:78
6	THF	25	24	65:35
7	DMF	25	24	75:25
8	MeCN	25	24	86:14
9	MeCN	65	24	98:2

Lehenik eta behin, erreakzioa kloroformoan eta giro tenperaturan (25°C) burutu zen, laktama agerpenaren kantitatea denborarekiko zuzenki proportzionala zela behatuz (1. taula, 1 eta 2 sarrerak). Halaber, erreakzioa 65°C-tan irakin zenean 18 orduz, %30eko laktama-proportzioa lortu zen (1. taula, 3 sarrera). Toluenoa frogatu zenean disolbatzaile gisa, aurreko kasuan bezala, laktama-proportzioa denbora handitu ahala areagotzen zela ikusi zen, baina kasu honetan proportzio handiagoan, beraz, disolbatzaile hau baztertu egin zen (1. taula, 4 eta 5 sarrerak). Era berean, THF disolbatzailea baztertu zen, erreakzioa 25°C-tan ordu erdiz irabiatu zenean %35-ko laktama lortu zelako (1. taula, 6 sarrera). Erreakzioa, DMF disolbatzailean eta giro tenperaturan burutu zenean %25-eko laktama-proportzioa eskuratu zen (1. taula, 7 sarrera). Azetonitriloa disolbatzaile gisa erabili zenean, 25°C-tan eta 24 orduz, %14-ko laktama-proportzioa lortzen zela neurtu zen (1. taula, 8 sarrera). Azkenik, disolbatzaile honen tenperatura 65°C-tara igotzean soilik %2-ko laktama lortu zenez, baldintza hauek aukeratu ziren gainontzeko 1,2-dihidrokinolinak sintetizatzeke (1. taula, 9 sarrera).

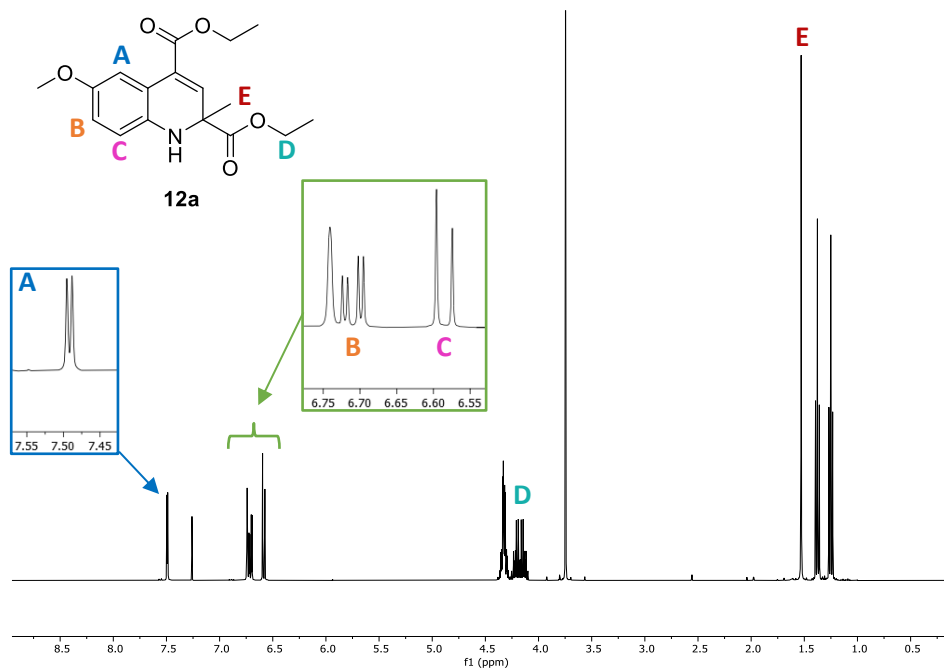
Eredu-erreakzioa optimizatu ondoren, sei 1,2-dihidrokinolina (**12a-f**) sintetizatu ziren pirubato deribatu eta amina aromatiko desberdinak erabiliz. Alde batetik, etil pirubatoaren ordeztu, isopropil eta metil pirubatoak erabili ziren **12b-c** produktuak lortzeko, isopropiloaren kasuan produktua etekin hobeagoarekin eskuratuz. Horrez gain, elektroietan aberatsak diren beste anilina batzuen erabilera aztertu zen, hala nola, *p*-toluidina eta 3,4-metilendioxianilina, **12d-e** substratuak etekin onetan lortuz. Azkenik, elektroietan urria den *p*-nitroanilina erabili zenean lehengai gisa **12f** bizikloa lortu zen etekin baxuagoan (7. irudia).



7. Irudia. Sintetizatu diren 1,2-dihidrokinolina deribatuak.

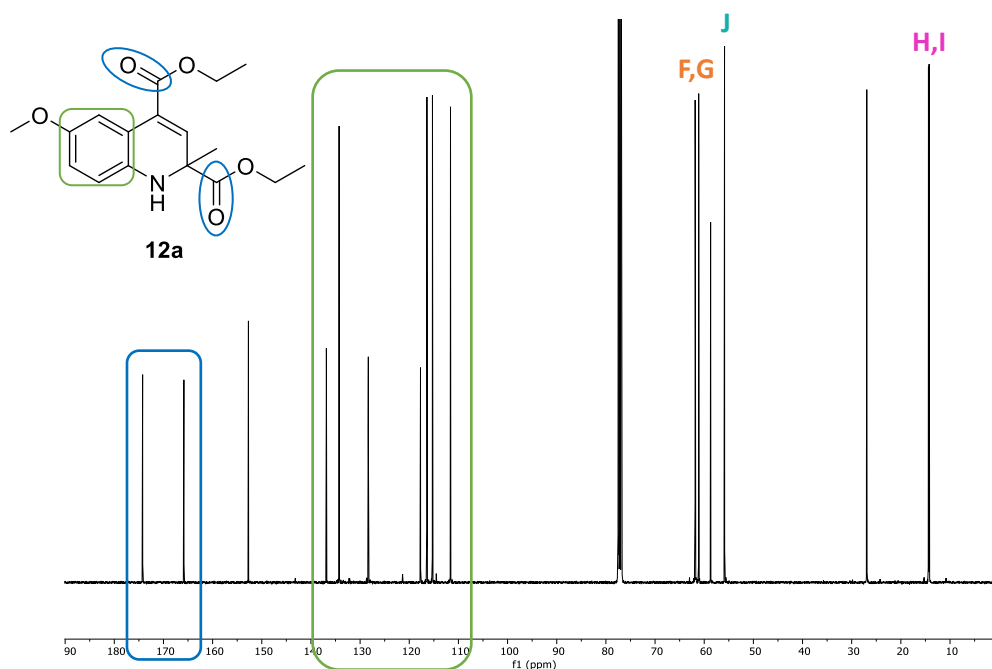
Aipatutako produktuak lortzeko prozedura berdina jarraitu da: erreakzioa martxan jarri eta 24 ordura ^1H NMR-ren bidez egiaztatzen da helburu den produktuaren presentzia. Behin 1,2-dihidrokinolina deribatua identifikatu egin denean, zutabe kromatografikoaren edo kristalizazioaren bidez isolatu eta purifikatzen da, azpiproduktuak baztertuz. Azkenik, lortutako produktua karakterizatzeko, NMR eta IR espektroskopia eta HRMS espektrometria teknikak erabiltzen dira.

Lortutako produktuen artean, **12a** bizikloa eredu gisa hautatu da, eta bere ^1H NMR espektroaren seinale adierazgarrienak ondoren aurkezten dira (8. irudia). Alde batetik, eraztun aromatikoaren protoiei dagozkien hiru seinale daude: **A** protoia doblete bezala agertzen da ($\delta_{\text{H}} = 7.49$ ppm, $^4J_{\text{HH}} = 2.9$ Hz), soilik B protoiarekin akoplatuta dagoelako. **B** protoiak aldiz, doblete bikoitz seinalea ematen du ($\delta_{\text{H}} = 6.71$ ppm, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.9$ Hz), aldi berean A eta C protoiekin akoplatuta dagoelako, eta, **C** protoia doblete bezala agertzen da ere ($\delta_{\text{H}} = 6.59$ ppm, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz), soilik B-rekin akoplatuta dagoelako. Bestetik, 1,2-dihidrokinolina egituraren karbono asimetriko bat dagoenez, bi CH_2 -ren protoiak diastereotopikoak izango dira, eta ondorioz, seinale desberdinak emango dituzte. Adibidez, karbono asimetrikotik gertuen dagoenaren seinalea, kuadrupletea izan beharrean, multiplete bezala agertzen da $\delta_{\text{H}} = 4.25 - 4.11$ ppm-tan (**D**). Azkenik, zikloari lotuta dagoen metil taldea $\delta_{\text{H}} = 1.53$ ppm-tan azaltzen da (**E**) (8.irudia).



8. irudia. 12a molekularen ^1H NMR espektroa eta seinaleen identifikazioa.

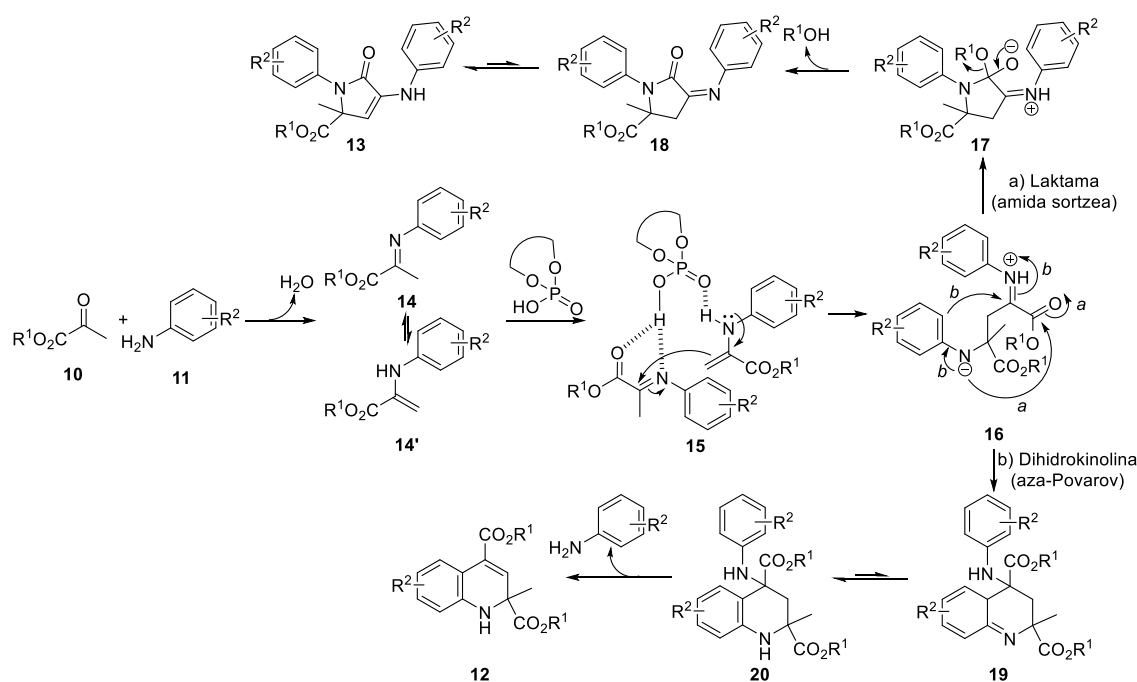
Lortutako produktuaren egitura are gehiago zehazteko, ^{13}C NMR espektroskopia erabili da (9. irudia). Seinale adierazgarrienak, alde batetik, bi karbonilo taldeenak dira, $\delta_{\text{C}} = 174.2$ eta $\delta_{\text{C}} = 165.8$ ppm-tan azaltzen direnak, eta bestetik, eraztun aromatikoaren karbonoei dagozkien seinaleak $\delta_{\text{C}} = 140\text{-}110$ ppm tartean agertzen dira. Seinale horiez gain, etil taldeei dagozkien CH_2 karbonoen seinaleak $\delta_{\text{C}} = 61.8$ eta $\delta_{\text{C}} = 61.1$ ppm-tan agertzen dira (**F,G**), eta ordea, CH_3 karbonoei dagozkienak $\delta_{\text{C}} = 14.4$ eta $\delta_{\text{C}} = 14.2$ ppm-tan azaltzen dira (**H,I**). Azkenik, $\delta_{\text{C}} = 55.9$ ppm-tan $-\text{OCH}_3$ (**J**) karbonoari dagokion seinalea identifikatu daiteke (9. irudia).



9. irudia. 12a molekularen ^{13}C NMR espektroa eta seinaleen identifikazioa.

^{13}C NMR espektroaren bidez burututako karbono seinaleen esleipena baieztatzeko DEPT espektroskopia erabili da. Bertan, karboniloen, eta karbono kuarternarioen seinaleak ez dira agertzen, ordea, eraztun aromatikoaren CH-ak, metil eta metoxi taldeen seinaleak gorantz agertzen dira (positibo bezala), eta azkenik, CH_2 taldeak beherantz agertzen dira (negatibo bezala).

Erreakzio mekanismoari dagokionez, **10** pirubatoaren eta **11** anilinarekin arteko kondentsazioarekin hasten da, orekan dauden **14** imina eta **14'** enamina espezieak sortuz. Ondoren, azido fosforikoak bi substratu hauen aktibazioa burutuko du; batetik, katalizatzaileak **14** imina elektrofiloa aktibatuko du, bere unitate azidoaz baliatuz, ester taldeko oxigeno eta nitrogeno iminikoarekin sortutako hidrogeno-zubi bikoitz baten bidez, eta bestetik, azido fosforikoak **14'** enamina nukleofiloa aktibatuko du, NH-arekin sortutako hidrogeno-zubi baten bidez, **15** aktibazio-ereduan erakusten den bezala. Proposatutako aktibazio ereduaren arabera, iminak enaminarekin eraso nukleozalea pairatuko du **16** bitartekaria eratuz. Ondoren, erreakzioak bi bide desberdin har ditzake. Lehenengo aukera, nitrogenoaren eraso nukleozalea ester taldearen gainean gertatzea da (5. eskema, a bidea). Kasu honetan, bost kideko **18** amida endozikliko bat eratuko litzateke, **17** bitartekariaren alkoholaren eliminazioaren bidez. Ondoren, **18** egiturak imina/enamina tautomeria jasango luke **13** γ -laktama deribatua lortzeko. Bigarren aukerari dagokionez, **19** espeziea sortuko litzateke **16** bitartekariak imonio taldearen gain jasaten duen ordezkapen elektroizale aromatikoaren ondorioz (5. eskema, b bidea). Ostean, **19** espeziearen tautomeroa den **20** bitartekariak amina aromatikoaren β -eliminazio espontanea jasango du, **12** 1,2-dihidrokinolinak emanez.

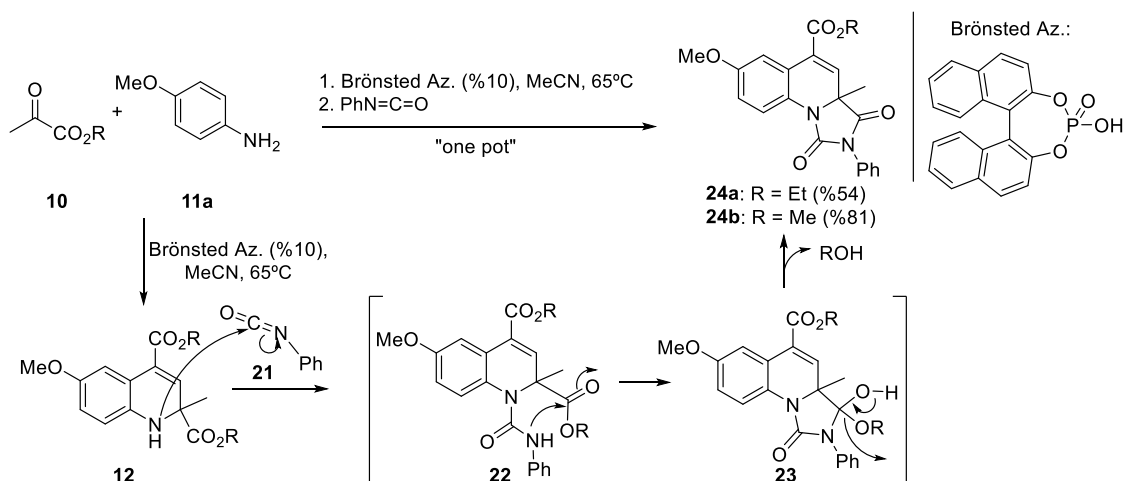


5. Eskema. aza-Povarov erreakzioaren eta γ -laktama sintesiaren mekanismoak.

3.2 1,2-DIHIKROKINOLINA/HIDANTOINA HIBRIDOEN SINTESIA

Behin 1,2-dihidrokinolinen sintesia burutu zenean, hurrengo pausoa hidantoina zikloa txertatzea izan zen. Konposatu triziklikoak lortzeko, pirubato eta *p*-metoxianilina lehengaiak nahastu egin ziren berriz, eta ¹H NMR bidez erreakzioa kontrolatu zen 1,2-dihidrokinolinaren seinale bereizgarriak agertu ziren arte. Behin bizikloa eratu zenean, erreakzio matrize berdinari fenil isozianatoa gehitu zitzaion. Erreakzioa **12** bizikloaren aminak isozianatoaren sp karbonoaren gain egindako eraso nukleozalearekin hasten da. Ondoren, eratu berri den **22** bitartekariak eraso nukleozale intramolekular bat pairatuko du, eraztuna itxiz. Kasu honetan, isozianato lehengaitik datorren aminak ester taldeari eraso egiten dio **23** bitartekaria eskuratzeko, zeinek elektroien lekualdaketa eta alkoholaren galera jasan ondoren, hidantoina eraztuna ematen du, **24** 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoak eskuratzuz (10. irudia).

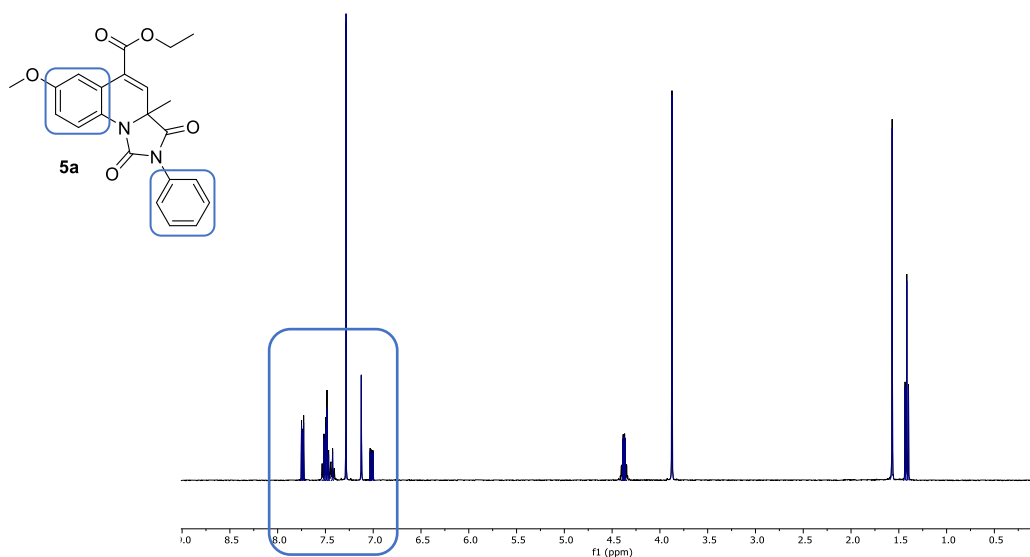
Erreakzio hau ontzi bakarreko prozedura baten bidez burutzen denez, hau da, ez direnez bitartekariak isolatzen eta erreakzioaren pauso guztiak matrize berdinean burutzen direnez, lehenengo pausoa sortzen den laktama azpiproduktua baztertzeko, eta lan honetan helburu diren hibridoak isolatzeko eta purifikatzeko, zutabe kromatografikoak beharrezkoak izan ziren. Metodologia honen bidez bi hibrido desberdin sintetizatu ziren, etil eta metil pirubatotik eratorritakoak, bigarrena etekin hobekoarekin lortuz.



10. Irudia. 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoaren sintesiaren eskema orokorra.

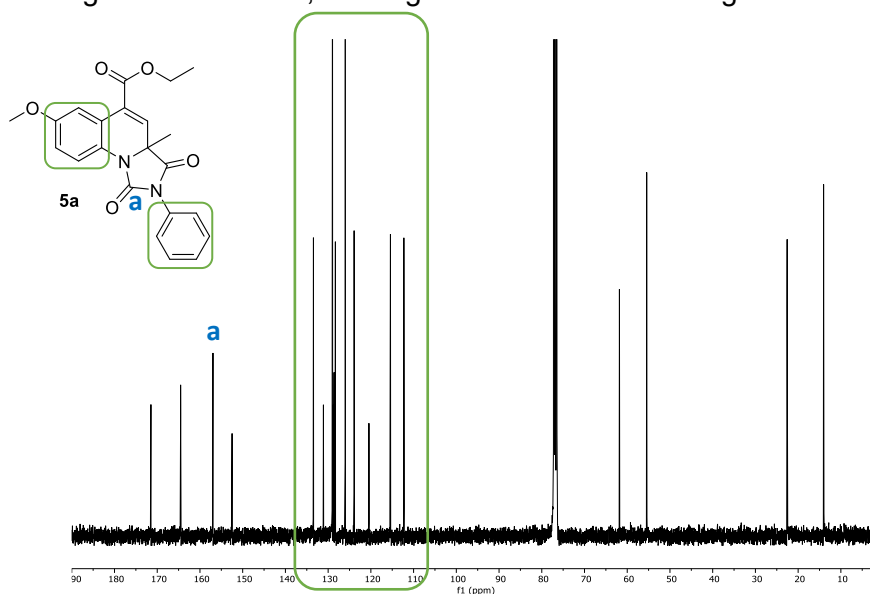
Lortutako 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoak RMN, IR eta HRMS bidez erabat karakterizatu ziren. Lortutako produktuen artean **24a** substratua eredu gisa hautatu da, eta ¹H NMR espektroan ageri diren seinale adierazgarrienak, eta trizikloa sortu dela frogatzen dutenak, ondoren aurkeztzen dira (11. irudia). Hidantoina nukleoa eratu dela erraz igarri daiteke, bizikloaren karbono asimetrikotik gertuen dagoen etoxi taldea eliminatzen delako, beraz, ¹H NMR espektroskopian CH₂ taldeari dagokion multipletea ($\delta_{\text{H}} = 4.24 - 4.11$ ppm) eta

metil taldeari dagokion tripletea ($\delta_{\text{H}} = 1.25$ ppm) desagertzen dira. Horrez gain, $\delta_{\text{H}} = 7-8$ ppm tartean ageri diren seinaleen kopurua handitu egin da, fenilo talde bat gehitu delako. Kasu honetan, zoritxarrez, ezin da NH-ari dagokion seinalea ikusi, hala ere, IR espektroskopia bidez bere presentzia baieztatu zen.



11. Irudia. 24a molekularen ^1H NMR eta seinaleen identifikazioa.

Kasu honetan ere, ^{13}C NMR espektroa aztertu da molekularen egitura are gehiago zehazteko (12. irudia). Aurreko kasuan bezala, ester ordezkatzailer bati dagokion karbonoen seinaleak desagertzen dira, hau da, espektroan soilik etoxi talde baten presentzia igarri daiteke, $\delta_{\text{C}} = 14.0$ (CH_3 , OEt) eta $\delta_{\text{C}} = 61.8$ (CH_2O). Horrez gain, $\delta_{\text{C}} = 110-140$ ppm tartean agertzen diren seinaleek, bi eraztun aromatikoaren presentzia adierazten dute. Azkenik, $\delta_{\text{C}} = 157.1$ ppm-tan ageri den seinalea, urea egituraren karboniloari dagokio.



12. Irudia. 24a molekularen ^{13}C NMR eta seinaleen identifikazioa.

3.3 AKTIBITATE ANTIPROLIFERATIBOAREN EBALUAZIOA

Gradu Amaierako Lan hau egin den ikerketa taldean, orain arte, ez zen 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoen sintesirik burutu, beraz, oso interesgarria da beraien aktibitate biologikoa aztertzea. Horrengatik, 1,2-dihidrokinolina eta 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoen ahalmen antiproliferatiboaren azterketarako *in vitro* saiakuntzak egin dira giza biriketako (A549) eta giza obulutegitako (SKOV3) kartzinoma zeluletan.

Lehenik eta behin, 1,2-dihidrokinolina deribatuen (**12a-f**) eta hibridoen (**24a,b**) zitotoxikotasuna aztertu zen A549 birika-minbizi zelula-lerroan. Alde batetik, bizikloei dagokionez, ez zen aktibitate zitotoxikorik antzeman entseguak egin ziren kontzentrazioetan, 50 μ M-etik gorako IC₅₀ balioak lortu zirelako (2. taula). Bestalde, hibridoen aktibitatea ikertu egin zenean, **24a** konposatuak 3,74 \pm 0,47 μ M-eko IC₅₀ balioa eman zuen. Emaitza hauek ikusita, birika-minbizi zelula-lerroan hidantoina-zikloaren presentziak aktibitate antiproliferatiboa hobetzen duela ondorioztatu daiteke.

Ostean, konposatuen aktibitate antitumoralaz aztertu zen SKOV3 obulutegi-kartzinoma zeluletan. Kasu honetan, neurtutako IC₅₀ balio guztiak 50 μ M-tik gorakoak izan ziren (2. taula). Horrek adierazten du, sintetizatu diren 1,2-dihidrokinolina deribatuek eta 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoek ez dutela aktibitate antiproliferatiborik giza obulutegiko kartzinomaren aurka.

2. Taula. Aktibitate zitotoxikoaren *in vitro* entseguen emaitzak. (IC₅₀).

Sarrera	Konposatua	IC ₅₀ (μ M)	
		A549	SKOV3
1	12a	>50	>50
2	12b	>50	>50
3	12c	>50	>50
4	12d	>50	>50
5	12e	>50	>50
6	12f	>50	>50
7	24a	3,74 \pm 0,47	>50
8	24b	>50	>50

4. ONDORIOAK

Ikerketa lan honetan sei 1,2-dihidrokinolina deribatu eta bi 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibrido berrien sintesia eta karakterizazioa burutu da teknika desberdinak erabiliz.

Lan honetan erabili den aza-Povarov erreakzioa deskribatuta egon arren, literaturan ez da laktama azpiproduktuaren sorrerari buruz ezerez aipatzen, eta horregatik, optimizatu behar izan da laktama-proportzio baxuen ematen duten baldintzak identifikatzeko. Disolbatzaile, denbora eta tenperatura desberdinak frogatu ondoren, ikusi da erreakzioa azetonitriloan, 65°C-tan eta 24 orduz nahastean, helburu den bizikloa proportzio onean lortzen dela. Erreakzio baldintza horiek erabilita, 1,2-dihidrokinolina desberdinak lortu dira etekin onetan pirubato eta anilina lehengaien ordezkatzailleak aldatuz. Halaber, ontzi bakarreko prozedura batez baliatuz, 1,2-dihidrokinolinak lehengai moduan erabili dira fenil isozianatoarekin batera 1,2-dihidrokinolina/hidantoina hibridoak lortzeko.

Horrez gain, sintetizatutako substratuek A549 eta SKOV3 giza-minbizi zelula-lerroen aurka duten *in vitro* aktibitate antiproliferatiboa ebaluatu da. Lortutako emaitzek adierazi dute **12a** 1,2-dihidrokinolinari hidantoina eraztuna erantsi egiten zaionean, **24a** 1,2-dihidrokinolina/hidantoina lortzeko, A549 birika-minbizi zelula-lerroan aktibitatearen hobekuntza antzematen dela. Izan ere, bizikloek ez dute zelula tumoralen kontrako inolako jarduerarik erakutsi. Emaitza hauek ikusita, egokia izango litzateke lortutako konposatuak beste giza-minbizi zelula-lerroetan frogatzea, eta horrez gain, **24a** hibridoak birika-minbizi zelula-lerroan aktibitatea duenez, giza-birika zelula-osasuntsuetan frogatu beharko litzateke konposatuaren selektibitatea aztertzeko.

Laburbilduz, farmazia arloan hain garrantzitsuak diren kinolina eta hidantoina heterozikloen arteko hibridoaren sintesia ikertzen jarraitu behar da aktibitate antiproliferatibo eraginkorragoak dituzten deribatuak aurkitzeko.

5. ATAL ESPERIMENTALA

5.1 ATAL KIMIKOA

5.1.1 TEKNIKAK ETA MATERIALA

Lan esperimentalak laborategian aurrera eraman ahal izateko material eta tresneria ezberdinak beharrezkoak izan dira, hemen zehaztuta adierazten direnak:

Egitura kimikoak ChemDraw Ultra 12.0.2 programarekin irudikatu egin dira.

Erreakzio kimikoen prestakuntzarako eta ondorengo tratamendurako, purutasun eta kalitate handiko disolbatzaile eta erreaktibo komertzialak erabili dira. Marka ezberdinetakoak izanik (Sigma-Aldrich, Merck, Fluca edota Acros), denak etiketako jarraibideen arabera mantenduak eta erabiliak izan dira.

Erreakzioen jarraipenerako, geruza fineko kromatografiak burutu dira silize-gelezko kromatofolioetatik (Augram, SIL, G/UV254) baliatuz. TLC-en errebelaziorako, VL-6C ultramore argidun ($\lambda = 254 \text{ nm}$) lanparak erabili dira.

Disolbatzaileen eliminazioa lurrunketa bidez egin da Heidolph Laborota 4001 eta Buchi R-3000 lurrungailu birakariak erabiliz.

Produktuen purifikazioa flash zutabeen bidez egin da: fase geldikor bezala silika gela (Scharlab, gel de silice 60 Å) eta fase mugikorra hexano/etil azetato nahaste ezberdinak erabili dira, beharren arabera.

Konposatuen karakterizaziorako egin diren espektroak (^1H -RMN eta ^{13}C -RMN), erresonantzia magnetiko nuklearraren bidez lortu dira Varian Unity Plus (300 MHz) eta Bruker Avance 400 (400 MHz) espektrometroei esker. Esperimentuak 20-25 °C-tara eta disolbatzaile bezala kloroformo deuteratua erabiliz burutu dira. Lerrakuntza kimikoak (δ) ppm-tan adierazita daude, erreferentzia bezala disolbatzaile deuteratuaren seinalea izanez ($\delta = 7,26 \text{ ppm}$ -tan ^1H -aren kasuan, eta 77.0 ppm-tan ^{13}C -an). Akoplamendu konstanteak (J) Hertzioaetan (Hz) adierazita daude. Azkenik, ^{13}C -RMN espektroko karbonoen seinaleak ezberdindu ahal izateko, DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) esperimentuak burutu dira. Hau dena ikusi ahal izateko eta espektroen ediziorako MestReNova 9.0.0. programa erabili da.

Infragorri-espektroen lorpenerako, IRTF Nicolet iS10 Termo Scientific-a erabili da, Smart iTR osagarriarekin. Espektroko tontor esanguratsuen balioak cm^{-1} -tan eman dira.

Masen espektrofotometroaren datu esperimentalak Lucio Lascaray Eraikinean (CIEA) dagoen Analisisirako Zerbitzu Zentralak eskeinitako lanari esker lortu dira. Bertan bidalitako laginen masa zehatza kalkulatu da LC/Q-TOF ekipamenduaz (ionizazio iturra: ESI Agilent Jet Stream, serie zenbakia: US93620455) baliatuz.

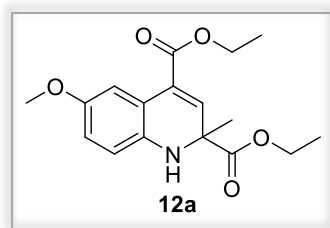
Konposatu solidoen fusio-puntuak BÜCHI MPB-450 aparatuan neurtu dira kapilare-hodi zabaliak erabiliz.

5.1.2 1,2-DIHIDROKINOLIA DERIBATUEN SINTESIA

Prozedura orokorra

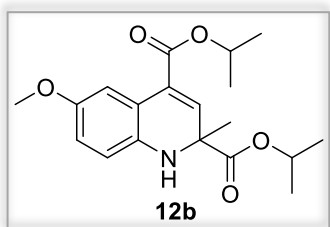
Anilina baliokide bat, pirubato deribatu bi baliokide eta Brønsted azido katalizatzailearen 0.1 baliokide nahastu dira nitrogeno atmosferapean 25 mL-ko matrazean, MeCN (3 mL) disolbatzaile moduan erabiliz. Irabiagailu magnetikoaren laguntzaz, erreakzioa 48 orduz martxan eduki da 65°C-tan. Denbora hau igaro ondoren, erreakzioa lurrungailu birakariaren bidez kontzentratu da, eta azkenik, lortutako erreakzio gordina zutabe kromatografikoaren bidez purifikatzen da (hexano:AcOEt). Beharrezkoa izan den kasuetan, kristalizazioaren bidez ere isolatu da produktua (eter: pentano 1:2).

Dietyl 6-metoxi-2-metil-1,2-dihidrokinolina-2,4-dikarboxilatoa (12a). Prozedura orokorra



jarraituz, etil pirubato (0.667 mL, 6 mmol) eta 4-metoxianilina (0.369 g, 3 mmol) nahastean, eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 9:1), olio horia den **12a** konposatuaren 0,417 g (% 76) lortu dira. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 7.49 (d, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.74 (s, 1H, =CH), 6.71 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.59 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.37 – 4.28 (m, 2H, CH₂), 4.25 – 4.11 (m, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 1.53 (s, 3H, CH₃), 1.38 (t, ³J_{HH} = 2.6 Hz, 3H, CH₃), 1.25 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 174.2 (C=O), 165.8 (C=O), 152.7 (C_{kuat}), 136.9 (C_{kuat}), 134.3 (=CH), 128.8 (C_{kuat}), 117.7 (C_{kuat}), 116.4 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 111.6 (CH_{Ar}), 61.8 (CH₂), 61.1 (CH₂), 58.7 (C_{kuat}), 55.9 (OCH₃), 26.9 (CH₃), 14.4 (CH₃), 14.2 (CH₃). **FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 3372 (N-H_{st}), 1726 (C=O_{st}), 1623 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [C₁₇H₂₁N₁O₅ + H]⁺ = 319.1420; masa zehatz experimentalak 319.1421 izanik.

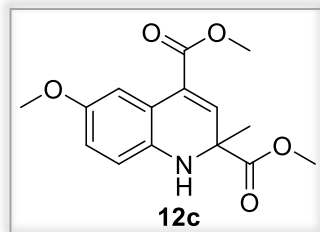
Diisopropil 6-metoxi-2-metil-1,2-dihidrokinolina-2,4-dikarboxilatoa (12b). Prozedura



orokorra jarraituz, isopropil pirubatoa (0.771 mL, 6 mmol) eta 4-metoxianilina (0.369 g, 3 mmol) nahastean, eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 85:15), olio horia den **12b** konposatuaren 0,310 g (% 83) lortu dira. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 7.47 (d, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.75 – 6.67 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.58 (d, 1H, =CH), 5.20 (m, 1H, CH), 5.00 (m, 1H, CH), 4.30 (s, 1H, NH), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 1.51 (s, 3H, CH₃), 1.35 (d, ³J_{HH} = 6.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 6H, (CH₃)₂), 1.23 (d, ³J_{HH} = 6.3 Hz, 6H, (CH₃)₂). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 173.7 (C_{kuat}), 165.5 (C_{kuat}), 152.7 (C_{kuat}), 136.9 (C_{kuat}), 134.2 (=CH), 128.7 (C_{kuat}), 117.9 (C_{kuat}), 116.4 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 111.5 (CH_{Ar}), 69.5

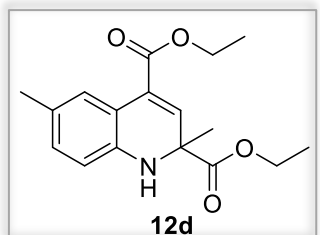
(CH), 68.7 (CH), 58.7 (C_{kuat}), 55.9 (OCH₃), 26.7 (CH₃), 22.0 (CH₃)₂, 21.8 (CH₃)₂). **FTIR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3372 (N-H_{st}), 1721 (C=O_{st}), 1628 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₁₉H₂₅N₂O₅ + H]⁺ = 347.1733, masa zehatz experimentalata 347.1737 izanik.

Dimetil 6-metoxi-2-metil-1,2-dihidrokinolina-2,4-dikarboxilatoa (12c). Prozedura orokorra



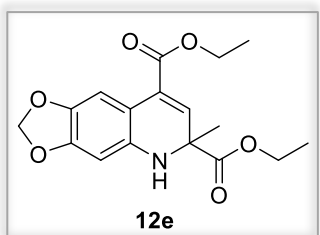
jarraituz, metil pirubatoa (0.952 mL, 10 mmol) eta 4-metoxianilina (0.616 g, 5 mmol) nahastean, eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 8:2), olio horia den **12c** konposatuaren 0,48 g (% 55) lortu dira. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 7.48 (d, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.73 (s, 1H, =CH), 6.70 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.57 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.38 (s, 1H, NH), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 1.53 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 174.8 (C_{kuat}), 166.2 (C_{kuat}), 152.8 (C_{kuat}), 136.8 (C_{kuat}), 134.4 (=CH), 128.0 (C_{kuat}), 117.5 (C_{kuat}), 116.4 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 111.7 (CH_{Ar}), 58.7 (C_{kuat}), 55.9 (OCH₃), 52.8 (OCH₃), 52.1 (OCH₃), 27.1 (CH₃). **FTIR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3372 (N-H_{st}), 1726 (C=O_{st}), 1623 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₁₅H₁₇NO₅ + H]⁺ = 291.1107, masa zehatz experimentalata 291.1100 izanik.

Diisopropil 2,6-dimetil-1,2-dihidrokinolina-2,4-dikarboxilatoa (12d). Prozedura orokorra



jarraituz, etil pirubatoa (0.667 mL, 6 mmol) eta *p*-toluidina (0.321 g, 3 mmol) nahastean, eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 95:5), olio horia den **12d** konposatuaren 0,38 g (% 84) lortu dira. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 7.61 (d, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.90 (dd, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.65 (s, 1H, =CH), 6.55 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.38 – 4.27 (m, 2H, CH₂), 4.29 – 4.09 (m, 2H, CH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃), 1.53 (s, 3H, CH₃), 1.38 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.26 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 174.2 (C_{kuat}), 166.0 (C_{kuat}), 140.4 (C_{kuat}), 132.9 (CH_{Ar}), 130.3 (=CH), 128.7 (C_{kuat}), 127.9 (C_{kuat}), 126.9 (CH_{Ar}), 116.8 (C_{kuat}), 114.3 (CH_{Ar}), 61.8 (CH₂), 61.1 (CH₂), 58.6 (C_{kuat}), 27.2 (CH₃), 20.9 (CH₃), 14.4 (CH₃), 14.3 (CH₃). **FTIR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3372 (N-H_{st}), 1721 (C=O_{st}), 1628 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₁₇H₂₁N₂O₄ + H]⁺ = 303.1471, masa zehatz experimentalata 303.1477 izanik.

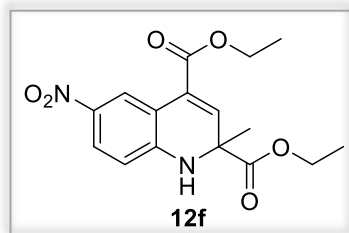
Diethyl 7-metil-6,7-dihydro-[1,3]dioxolo[4,5-f]kinolina-7,9-dikarboxilatoa (12e). Prozedura



orokorra jarraituz, etil pirubatoa (0.667 mL, 6 mmol) eta 4-kloroanilina (0.309 mL, 3 mmol) nahastean, eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 95:5), olio horia den **12e** konposatuaren 0,292 g (% 82) lortu dira. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ** (ppm): 7.39 (d, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.56 (s, 1H, =CH), 6.23 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 5.88 – 5.83 (m, 2H, CH₂), 4.31 (dd, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 2H, CH₂), 4.18 (dd, ³J_{HH} = 17.6 Hz, ⁴J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.51 (s, 3H, CH₃),

1.36 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 3H, CH₃), 1.26 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.4 (C_{kuat}), 166.0 (C_{kuat}), 148.5 (C_{kuat}), 140.8 (C_{kuat}), 138.95 (C_{kuat}), 130.5 (=CH), 128.4 (C_{kuat}), 109.9 (C_{kuat}), 106.7 (CH_{Ar}), 100.9 (CH₂), 96.42 (CH_{Ar}), 61.9 (CH₂), 61.1 (CH₂), 58.6 (C_{kuat}), 26.7 (CH₃), 14.4 (CH₃), 14.3 (CH₃). **FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 3372 (N-H_{st}), 1721 (C=O_{st}), 1628 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₁₇H₁₉NO₆ + H]⁺ = 333.1212, masa zehatz experimentalak 333.1214 izanik.

Dietil 2-metil-6-nitro-1,2-dihidrokinolina-2,4-dikarboxilatoa (12f). Prozedura orokorra



jarraituz, etil pirubatoa (0.667 mL, 6 mmol) eta 4-nitroanilina (0.414 g, 3 mmol) nahastean, eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 8:2), solido horia den **12f** konposatuaren 0,52 g (% 57) lortu dira. **F.p.** = 96-98°C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,84 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.00

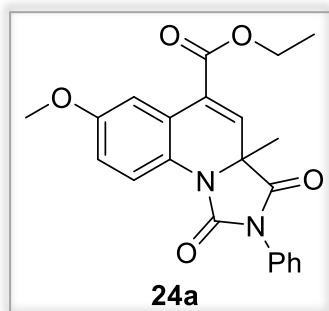
(dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.79 (s, 1H, =CH), 6.58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.9$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 5,14 (s, 1H, NH), 4.44 – 4.33 (m, 2H, CH₂), 4.40 – 4.16 (m, 2H, CH₂), 1.61 (s, 3H, CH₃), 1.41 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 3H, CH₃), 1.31 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.6 (C_{kuat}), 164.9 (C_{kuat}), 147.9 (C_{kuat}), 139.4 (C_{kuat}), 133.38 (=CH), 127.06 (C_{kuat}), 126.17 (CH_{Ar}), 123.69 (CH_{Ar}), 114.79 (C_{kuat}), 113.28 (CH_{Ar}), 62.64 (CH₂), 61.77 (CH₂), 59.38 (C_{kuat}), 28.66 (CH₃), 14.34 (CH₃), 14.25 (CH₃). **FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 3354 (N-H_{st}), 1717 (C=O_{st}), 1628 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₁₆H₁₈N₂O₆ + H]⁺ = 334.1165, masa zehatz experimentalak 334.1171 izanik.

5.1.3 1,2-DIHIDROKINOLINA/HIDANTOINA HIBRIDOEN SINTESIA

Prozedura orokorra

Pirubato deribatu bi baliokide, *p*-anisidina baliokide bat, eta Brønsted azido katalizatzailearen 0.1 baliokide nahastu dira nitrogeno atmosferapean 25 mL-ko matrizean, MeCN (3 mL) disolbatzaile moduan erabiliz. Irabiagailu magnetikoaren laguntzaz, errektzioa 24 orduz martxan eduki da 65°C-tan. Denbora hau igaro ondoren, eta ¹H RMN bidez bizikloa eratu dela egiaztatu ostean, fenil isozianato baliokide bat gehitu zaio errektzioari, eta beste 24 orduz irabiatu da tenperatura berdinean. Ondoren, errektzioa lurrungailu birakariaren bidez kontzentratu da, eta azkenik, lortutako errektzio gordina zutabe kromatografikoaren bidez purifikatu da (hexano:AcOEt). Beharrezkoa izan den kasuetan, kristalizazioaren bidez ere isolatu da produktua (eter: pentano 1:2).

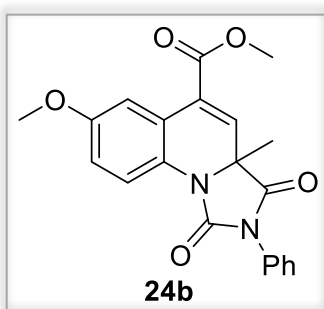
Etil 7-metoxi-3a-metil-1,3-dioxo-2-fenil-1,2,3,3a-tetrahidroimidazo[1,5-a]kinolina-5-karboxilatoa (24a). Prozedura orokorra jarraituz, etil pirubato



(0.667 mL, 6 mmol) eta 4-metoxianilina (0.369 g, 3 mmol) nahasten dira eta ondoren, fenil isozianatoa (0.326 g, 3 mmol) gehitzen zaio. Zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 98:2), olio horia den **24a** konposatuaren 0,199 g (% 54) lortu dira. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.74 (dd, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.58 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.12 (s, 1H, =CH), 7.02 (dd, ³J_{HH} = 8.6

Hz, ⁴J_{HH} = 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.44 – 4.30 (m, 2H, CH₂), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 1.57 (s, 3H, CH₃), 1.41 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (C=O), 164.7 (C=O), 157.1 (C=O), 152.7 (C_{quat}), 133.6 (=CH), 131.3 (C_{quat}), 129.2 (2 x CH_{Ar}), 128.9 (C_{quat}), 128.8 (C_{quat}), 128.5 (CH_{Ar}), 126.2 (2 x CH_{Ar}), 124.1 (CH_{Ar}), 120.6 (C_{quat}), 115.6 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 77.2 (C_{quat}), 62.0 (CH₂O), 55.6 (OCH₃), 22.7 (CH₃), 14.2 (CH₃, OEt). **FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 1779 (N-H_{st}), 1721 (C=O_{st}), 1610 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₂₂H₂₀N₂O₅ + H]⁺ = 392.1372, masa zehatz experimentalak 392.1372 izanik.

Metil 7-metoxi-3a-metil-1,3-dioxo-2-fenil-1,2,3,3a-tetrahidropirrolo[1,2-a]kinolina-5-



karboxilatoa (24b). Prozedura orokorra jarraituz, metil pirubatoa (0.952 mL, 10 mmol) eta 4-metoxianilina (0.616 g, 5 mmol) nahasten dira eta ondoren, fenil isozianatoa (0.326 g, 3 mmol) gehitzen zaio. Zutabe kromatografikoa eginez (hexano:AcOEt 9:1), olio horixka den **24b** konposatuaren 0,299 g (% 81) lortu dira. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.75–7.68 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.67 – 7.24 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.12 (s, 1H, =CH), 7.00 (dd, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ⁴J_{HH}

= 2.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 1.57 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.6 (C=O), 165.2 (C=O), 157.2 (C=O), 152.7 (C_{quat}), 134.0 (=CH), 131.3 (C_{quat}), 129.8 (2 x CH_{Ar}), 129.2 (C_{quat}), 129.0 (C_{quat}), 128.5 (CH_{Ar}), 126.2 (2 x CH_{Ar}), 124.1 (CH_{Ar}), 120.6 (C_{quat}), 115.6 (CH_{Ar}), 112.6 (CH_{Ar}), 62.0 (C_{quat}), 55.6 (OCH₃), 52.5 (OCH₃), 22.7 (CH₃). **FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 1779 (N-H_{st}), 1726 (C=O_{st}), 1610 (C=O_{st}). **HRMS (ESI-TOF) m/z**: [C₂₁H₁₈N₂O₅ + H]⁺ = Ez da detektagarria.

5.2 ATAL BIOLOGIKOA

5.2.1 TEKNIKAK ETA MATERIALA

Sintetizatu diren konposatuen *in vitro* aktibitate zitotoxikoaren ebaluaziorako, komertzialki lortutako A549 giza albeoloetako epitelio basalaren minbizi-zelulak eta SKOV3 giza obulutegietako kartzinoma zelulak erabili dira, nitrogenu likido ontzi batean kontserbatuak izan direnak. Zelula hauek aurretik %10 behi-serum fetal eta %1 Normocin® antibiotikoarekin osatutako hazkuntza medio ezberdinetan kultibatu dira. A549 zelulentzat F-12K media erabili da, eta, ordea SKOV3 zelulentzat McCoy's media erabili da.

Zelulak inkubagailuan mantendu dira temperatura eta hezetasun maila optimoetan (CO₂ %5ean; %95eko hezetasuna; 37°C) eta II-A mailako fluxu-laminarreko kanpian tratatuak izan dira prozesu osoan zehar.

Zelulen zenbaketarako Neubauer kamara eta TrypanBlue disoluzioa erabili da. Plaken irakurketarako, 450 eta 620 nm-tan absorbantzia neurketak egiten dituen irakurgailu bat erabili da eta azken balioa bi absorbantzien arteko kenketa eginez lortu da. Entsegu kolorimetriko hauek egin ahal izateko CCK-8 erreaktiboa erabili da.

5.2.2 ZITOTOXIKOTASUN PROBAK

A549 eta SKOV3 zelulak hazi ondoren, tripsinarekin erauzi dira eta 96 putzuetako plakan inokulatu dira, hauetako bakoitzean $2,5-3 \times 10^3$ zelula jarritz, eta 24 orduz inkubagailuan hazkuntzan mantendu ostean. Ondoren, aurretiaz prestatutako konposatuaren disoluzio (DMSO-n) ezberdinak gehitu dira putzuetan 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 eta 50 µM-eko kontzentrazioak lortzeko. Plaka 48 orduz inkubatu eta gero, 10 µL CCK-8 gehitu dira eta beste 2 orduz inkubatu da. Azkenik, putzu bakoitzaren absorbantzia neurtu da (450 eta 620 nm) zelula bizien proportzioa kalkulatu ahal izateko.

Putzu bakoitzaren konposatuen kontzentrazioa eta zelula bizien ehunekoaren arabera, IC₅₀ balioa (µM) lortu ahal izan da, hau da, zenbateko 1,2-dihidrokinolina edo 1,2-dihidrokinolina/hidantoina kontzentrazioa behar den zelula hazkuntzaren %50-a inhibitzeko.

6. BIBLIOGRAFIA

¹ Oliveira, S. M.; Silva, J. B. P.; Hernandez, M. Z.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. da R. Estrutura, reatividade e propiedades biológicas de hidantoínas. *Química Nova*. **2008**, *31*, 614–622. DOI: 10.1590/S0100-40422008000300029.

² Nozal, V.; García-Rubia, A., Pérez, C.; Martínez, A.; Palomo, V. Improved linkage desing for the discovery of multitarget ligands as powerful drugs for Alzheimer’s disease. *RANF*. **2019**, *85*, 260-273.

³ Menéndez, J. C. Multi-target drugs as a new strategy against neurodegenerative diseases. *RANF*. **2022**, *88*, 387-399.

⁴ Anighoro, A.; Bajorath, J.; Rastelli, G. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7874–7887. DOI: 10.1021/jm5006463.

⁵ Papa, A.; Pasquini, S.; Contri, C.; Gemma, S.; Campiani, G.; Butini, S.; Varani, K.; Vincenzi, F. Polypharmacological approaches for CNS diseases: Focus on endocannabinoid degradation inhibition. *Cells*. **2022**, *11*, 471-509. DOI: 10.3390/cells11030471.

⁶ Costa, X. Mi investigación pone el foco en la polifarmacología. ESCI-UPF News. <https://www.esciupfnews.com/2021/06/10/polifarmacologia-science-bits/>

⁷ Shaveta; Mishra, S.; Singh, P. Hybrid Molecules: The Privileged Scaffolds for Various Pharmaceuticals. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 500–536. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.08.039.

⁸ Peters, J.-U. Polypharmacology - Foe or Friend?. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8955–8971. DOI: 10.1021/jm400856t.

⁹ Viegas-Junior, C.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Cur. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829–1852. DOI: 10.2174/092986707781058805.

¹⁰ (a) Pozharskii, A. F.; Soldatenkov, A. T.; Katritzky, A. R. in *Heterocycles in Life and Society: An Introduction to Heterocyclic Chemistry, Biochemistry and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2nd edn., **2011**. (b) Jovtchev, G.; Rao, B. K.; Singh, S.; Valasani, K. R.; Ramu, J. in *Heterocyclic Compounds and Biological Applications*, ed. M. R. Jayapal, Science Publishing Group, New York, **2021**.

¹¹ (a) Heravi, M. M.; Zadsirjan, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 44247-44311. DOI: 10.1039/D0RA09198G; (b) Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDAApproved Pharmaceuticals. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257-10274. DOI: 10.1021/jm501100b.

-
- ¹² Joule, J. A.; Natural Products Containing Nitrogen Heterocycles-Some Highlights 1990-2015. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2016**, *119*, 81-106. DOI: 10.1016/bs.aihch.2015.10.005.
- ¹³ López-López, L. I.; Loera-Carrera, D. A.; Jesús Rivera-Ávalos, E.; Sáenz-Galindo, A. Hidantoína y derivados como estructuras de importancia en la química medicinal: Avances recientes. *Revista de química teórica y aplicada.* **2018**, *75*, 279-289.
- ¹⁴ Cho, S.; Kim, S.-H.; Shin, D. Recent applications of hydantoin and thiohydantoin in medicinal Chemistry. *Eur J Med Chem.* **2019**, *164*, 517-545. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.12.066.
- ¹⁵ Zagórska, A.; Czopek, A.; Jaromin, A.; Mielczarek-Putna, M.; Struga, M.; Stary, D.; Bajda, M. Design, Synthesis, and in Vitro Antiproliferative Activity of Hydantoin and Purine Derivatives with the 4-Acetylphenylpiperazinylalkyl Moiety. *Materials (Basel)* **2021**, *14*, 4156. DOI: 10.3390/ma14154156.
- ¹⁶ Alkahtani, H. M.; Alanazi, M. M.; Aleanizy, F. S.; Alqahtani, F. Y.; Alhoshani, A.; Alanazi, F. E.; Almehezia, A. A.; Abdalla, A. N.; Alanazi, M. G.; El-Azab, A. S.; Abdel-Aziz, A. A.-M. Synthesis, Anticancer, Apoptosis-Inducing Activities and EGFR and VEGFR2 Assay Mechanistic Studies of 5,5-Diphenylimidazolidine-2,4-Dione Derivatives: Molecular Docking Studies. *Saudi Pharm. J.* **2019**, *27*, 682–693. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.04.003.
- ¹⁷ Konnert, L.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. Recent Advances in the Synthesis of Hydantoins: The State of the Art of a Valuable Scaffold. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13757–13809. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00067.
- ¹⁸ Read, W. T. Researches on hydantoins. Synthesis of the soporific, 4,4-phenylethyl-hydantoin (nirvanol). *J. Am. Chem. Soc.* **1922**, *44*, 1746-1755. DOI: 10.1021/ja01429a017
- ¹⁹ Ma, X.; Wu, Y. I.; Yang, X.; Yang, S.; Li, Y.; Huang, Y.; Lee, R. J.; Bai, T.; Luo, Y. A Novel 1,2-Dihydroquinoline Anticancer Agent and Its Delivery to Tumor Cells Using Cationic Liposomes. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 2105–2111.
- ²⁰ He, S.; Dayton, A.; Kuppusamy, P.; Werbovetz, K. A.; Drew, M. E. Induction of Oxidative Stress in Trypanosoma Brucei by the Antitrypanosomal Dihydroquinoline OSU-40. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2428–2434. DOI: 10.1128/aac.06386-11.
- ²¹ Eswaran, R.; Bertani, R.; Sgarbossa, P.; Karuppanan, N.; Nattamai S P, B. Synthesis, Crystal Structure, DNA and Protein Binding Studies of Novel Binuclear Pd(II) Complex of 6-Methoxy-2-Oxo-1,2-Dihydroquinoline-3-Carbaldehyde-4(N,N)-Dimethylthiosemi-carbazone. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *155*, 1–8. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.11.007.
- ²² Bekhit, A. A.; Fahmy, H. T. Y.; Rostom, S. A. F.; El-Din A Bekhit, A. Synthesis and Biological Evaluation of Some Thiazolylpyrazole Derivatives as Dual Anti-Inflammatory Antimicrobial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 6027–6038. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.10.001.

-
- ²³ Gomes, C.; Moreth, M.; Facchinetti, V.; De Souza, M.; Junior, V.; Lourenco, S. Synthesis and Antimycobacterial Activity of 2-Aryl-3-(Arylmethyl)-1,3-Thiazolidin-4-Ones. *Let. Drug Des. Discov.* **2010**, *7*, 353–358. DOI: 10.2174/157018010791163451.
- ²⁴ Wang, M.; Lee, R. J.; Bi, Y.; Li, L.; Yan, G.; Lu, J.; Meng, Q.; Teng, L.; Xie, J. Transferrin-Conjugated Liposomes Loaded with Novel Dihydroquinoline Derivatives as Potential Anticancer Agents. *PLoS One.* **2017**, *12*, e0186821. DOI: 10.1371/journal.pone.0186821.
- ²⁵ Sabbah, D. A.; Haroon, R. A.; Bardaweel, S. K.; Hajjo, R.; Sweidan, K. N-Phenyl-6-Chloro-4-Hydroxy-2-Quinolone-3-Carboxamides: Molecular Docking, Synthesis, and Biological Investigation as Anticancer Agents. *Molecules.* **2020**, *26*, 73. DOI: 10.3390/molecules26010073.
- ²⁶ Kamiguchi, S.; Takahashi, I.; Kurokawa, H.; Miura, H.; Chihara, T. Vapor-Phase Synthesis of 1,2-Dihydro-2,2,4-Trimethylquinolines from Anilines and Acetone over Group 5–7 Metal Halide Clusters as Catalysts. *Appl. Catal. A Gen.* **2006**, *309*, 70–75. DOI: 10.1016/j.apcata.2006.04.034.
- ²⁷ Selig, P.; Raven, W. A. Convenient Allenoate-Based Synthesis of 2-Quinolone-2-Yl Malonates and β -Ketoesters. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5192–5195. DOI: 10.1021/ol502554e
- ²⁸ Liu, X.-Y.; Ding, P.; Huang, J.-S.; Che, C.-M. Synthesis of Substituted 1,2-Dihydroquinolines and Quinolines from Aromatic Amines and Alkynes by Gold(I)-Catalyzed Tandem Hydroamination-Hydroarylation under Microwave-Assisted Conditions. *Org. Lett.* **2007**, *9* (14), 2645–2648. DOI: 10.1021/ol070814l.
- ²⁹ Hu, X.-Y.; Zhang, J.-C.; Wei, W.; Ji, J.-X. Brønsted Acid (HNO₃)-Catalyzed Tandem Reaction of α -Ketoesters and Arylamines: Efficient Synthesis of 1,2-Dihydroquinoline Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2903–2905. DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.03.134.
- ³⁰ Zhang, B.-Q.; Luo, Y.; He, Y.-H.; Guan, Z. Highly efficient synthesis of polysubstituted 1,2-dihydroquinolines via cascade reaction of α -ketoesters with arylamines mediated by iodine. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1961-1966. DOI: 10.1002/chin.201434179.
- ³¹ Luo, C.; Huang Y. A Highly Diastereo- and Enantioselective Synthesis of Tetrahydroquinolines: Quaternary Stereogenic Center Inversion and Functionalization. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8193-8196. DOI: 10.1021/ja4040945.