



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FARMAZIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE FARMACIA

**AMINOAZIDOEN DERIBATU DIREN γ -LAKTAMEN
SINTESIA, FUNTZIONALIZAZIOA ETA AKTIBITATE
ANTITUMORALAREN EBALUAZIOA**

– Gradu Amaierako Lana –

Amaia González Melero

Farmazia Gradua

2020/2021 ikasturtea

AURKIBIDEA

LABURPENA

SARRERA.....	1
HELBURUAK.....	6
EMAITZAK ETA EZTABAIDA	7
1. Laktamen sintesia.....	7
2. Funtzionalizazioa	10
3. Aktibitate zitotoxikoaren ebaluazioa	12
ONDORIOAK	14
ATAL ESPERIMENTALA	15
<i>ATAL KIMIKOA</i>	<i>15</i>
1. Teknikak eta materialak.....	15
2. Osagai anitzeko 1,5-dihidro-2 <i>H</i> -pirrol-2-onen sintesia	16
3. 4a Laktamaren funtzionalizazioa.....	19
<i>ATAL BIOLOGIKOA.....</i>	<i>20</i>
1. Teknikak eta materialak.....	20
2. Zitotoxikotasun probak.....	20
BIBLIOGRAFIA.....	21

LABURDUREN ZERRENDA

Ar	Aromatikoa
DCM	Diklorometanoa (Dichloromethane)
d	Dobletea
dd	Doblete bikoitza
ddd	Doblete bikoitzaren bikoitza
FPR1	<i>Formyl Peptide Receptor 1</i>
GIB	Giza Inmunoeskasiaren Birusa
gt	Giro tenperatura
HRMS	Erresoluzio handiko masa espektrometria
IC ₅₀	%50eko inhibiziorako kontzentrazio maximoa
IRTF	Fourier transformatuaren bidezko infragorria
J	Akoplamendu konstantea
LDA	Litio diisopropilamiduroa
MCR	Osagai anitzeko erreakzioa (<i>MultiComponent Reaction</i>)
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NMR	Erresonantzia Magnetiko Nuklearra (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NSZ	Nerbio sistema zentrala
OME	Osasunaren Mundu Erakundea
s _z	Singlete zabala
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i>
t	tripletea
TLC	Geruza fineko kromatografia (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
VEGF-R	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
δ	Lerrakuntza kimikoa
λ	Uhin luzera

LABURPENA

Gaixotasun garrantzitsua bihurtu da minbizia gure gizartean, heriotzen lehenengo kausa izatera heldu delarik. Farmako berriak beharrezkoak dira, eskuragarri dauden tratamenduak nahiko ez direlako hain aldagarria eta kaltegarria den gaixotasuna tratatzeko.

Nitrogenodun heterozikloak unitate farmakoforo ezagunak dira eta erabilera ezberdinak dituzten hainbat farmakoetan agertzen dira. Pirrola, pirrolidina eta honen deribatuak, natural zein sintetikoak, aktibitate antitumoral edo zitotoxikoa duten molekulen artean aurki daitezke. Bilaketa bibliografikoa eginez gero, *N*-heterozikloen sintesi bideak oso ikertuak izaten ari direla ikus daiteke, eta produktuen *in vitro* saiakuntzak zelula tumoraletan ugariak direla ere bai. Orokorrean laborategian lortzen diren aurreneko emaitzak positiboak izaten dira, eta badaude entsegu klinikoetan frogatuak izatera heldu diren konposatuak.

3-Amino-1,5-dihidro-2*H*-pirrol-2-ona deribatu batzuen aktibitate zitotoxikoa aurretiaz frogatua izan da eta honen ikerketarekin jarraitu nahi izan da Gradu Amaierako Lan honetan. Orain arte sintetizatu ez diren γ -laktamak prestatu eta karakterizatu dira, eraztunaren laugarren eta bosgarren karbonoetan ordezkatzailerik ez dituztenak. Honetarako, osagai anitzeko erreakzioa (MCR – *MultiComponent Reaction*) erabili da aldehido bat, etil pirubatoa eta anilina aromatikoak baliatuz. Ondoren, laktama hauen funtzionalizazioa saiatu da 4. karbonoan funtzio talde ezberdinak sartuz.

Amaitzeko, γ -laktama baten *in vitro* aktibitate zitotoxikoa frogatu da A594 birika zelula tumoraletan. Honen aktibitatea aurretik ikertuak izan diren beste γ -laktama batzuekin alderatu ahal izan da, eta honekin batera, molekulan erantzitako talde funtzionalen eragina ebaluatu.

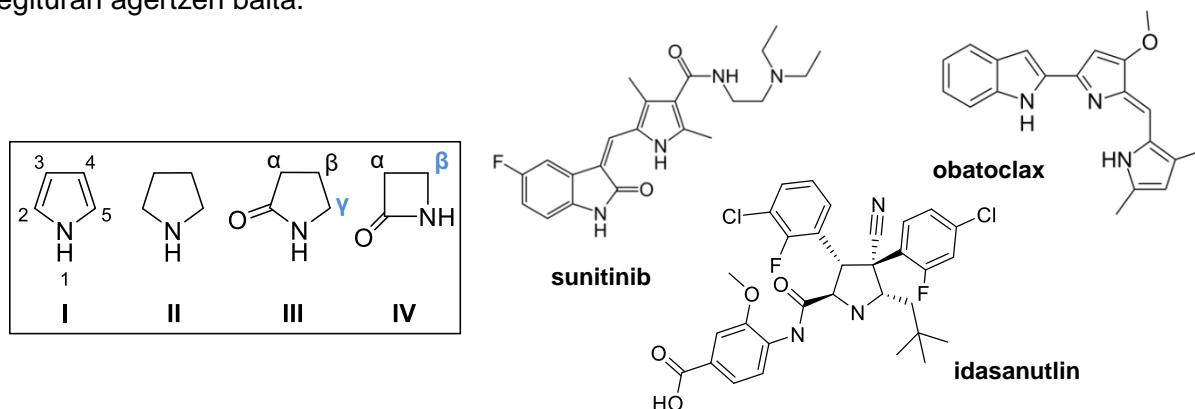
SARRERA

Antzinako gauza da naturaz baliatzea gizakiak pairatzen dituen patologiak tratatzeko. Landare, animali zein mikroorganismoetatik konposatuen erauzketa aspaldiko teknika da. Praktika hau gaur egun ere mantentzen den arren, ikerkuntzan egin diren aurrerapenek ezaugarri fisiko-kimiko, farmakozinetiko eta farmakodinamiko hobeak dituzten konposatuen garapena ahalbidetu dute. Jarduera honetan, Kimika Farmazeutikoak esku hartze handia izan du, konposatuen optimizazioan, baita molekula farmakologiko berrien diseinuan ere, lan eginez.

Minbizia kimioterapia, radioterapia edota ebakuntza bidez tratatzen da, eta azken aldian aurrerapen handiak egin izanagatik ere, tratamendu berrien beharra nabaria da oraindik. Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) heriotzen eragile nagusien artean sailkatzen du minbizia: 2020. urtean ia 10 milioi heriotzen kausa izan zen. Birika eta bular-minbiziak maizen agertzen direnak dira eta birikakoa zehazki, heriotza gehien eragiten dituen neoplasia gaiztoa da (1,8 milioi heriotza 2020. urtean).¹

Tumoreek gorputzeko edozein ataletan agertzeaz gain, mutazioak garatzeko ahalmen handia dutenez, aukera terapeutikoak ere anitzak izan behar dira. Gainera, gaixoek tratamendu ezberdinak behar izan ohi dituzte intolerantziak edota eraginkortasun falta direla eta. Zenbat eta medikamentu mota ezberdin gehiago eduki, orduan eta tratamendu aproposagoak erabili ahalko dira neoplasia bakoitzaren aurka. Gaixoek oso prozesu gogorak eta luzeak jasan behar dituzte, eta tratamenduen optimizazioan lan eginez gero, pertsona askoren bizi kalitatea hobetu ahalko litzateke.

Helburu horretarako, bai natura, bai kimika oinarritzkoak dira, Kimika Farmazeutikoan egin diren aurkikuntzek erakutsi duten moduan. Honen adibide da lan honetan aztertuko den γ -laktama eraztuna (1. irudia, III), pirrolidin-2-ona edo azolidin-2-ona izenekin ere ezagutua, interes biologikoko aktibitatea aurkezten duten hainbat konposatu natural zein sintetikoan egiturari agertzen baita.²



1. irudia. N-Heterozikloak, eta pirrola eta pirrolidina duten konposatu bioaktiboan adibideak.

Hauek bezalako nitrogenodun heteroziklikoetaz baliatzea ez da gauza berria. Kontuan hartu behar da alkaloideak isolatu eta aztertu ziren lehenengotariko konposatuak izan zirela, eta hauen artean mota anitzeko egiturak eta eragin biologikoak identifikatu direla.³ Gaur egun, egitura *N*-heteroziklikoak pisu molekular txikiko farmakoen artean gehien errepikatzen diren egiturak izatera heldu dira.⁴ Horrez gain, afinitate eta potentzia handiagoko farmakoen sintesia ahalbidetzen dutenez, farmako seguruagoen diseinurako aukera estrategiko interesgarriak bihurtzen dira heteroziklo mota hauek.⁵

N-Heteroziklo hauen artean, farmako ugarietan agertzen diren pirrol eraztun aromatikoa (1. irudia, **I**) eta honen deribatu asetua, pirrolidina (1. irudia, **II**) daude. Pirrola funtzio antibakteriano, antibiral edo antiinflamatorioa duten konposatuetan agertzeaz gain, erabilera antitumoralak duten zenbait molekuletan ere badago.^{6,7,8,9} Azken hauen adibide dira komertzializatua dagoen sunitinib (1. irudia) osagai aktiboa¹⁰, edo entsegu klinikoan III fasean heldu den obatoclox (1. irudia).¹¹

Pirrolidina (1. irudia, **II**) unitate farmakoforo garrantzitsua da ere bai, funtzio ezberdin betetzen dituzten osagai aktibo askotan agertzen baita. Hau ere eragin zitotoxikoa duten molekulen garapenean erabili da^{12,13,14} eta adibide lez indasanutlin osagai aktiboa (1. irudia) aipa daiteke, entsegu klinikoan III fasean frogatua izan dena terapia konbinatu bezala, emaitza positiboak lortuz.^{15,16}

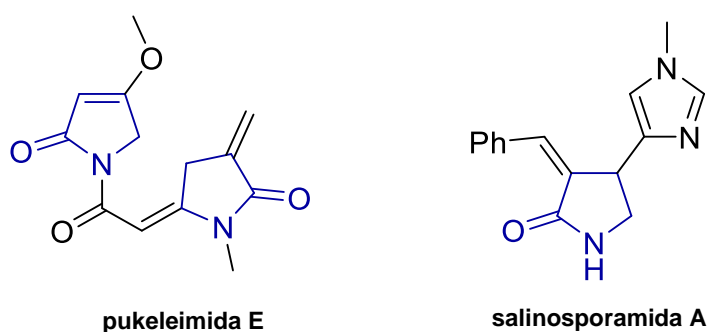
Gehiago sakonduz, pirrolidinaren deribatua den γ -laktama (1. irudia, **III**) dago. Aurreko egiturei bezala, eragin biologiko anitz atxiki zaizkio molekula honi, haien artean eragin zitotoxikoa tumore zelulen aurka. Konposatu bioaktibo natural zein sintetikoetan agertzen da² eta farmako berrien sintesirako duen potentzialagatik Kimika Farmazeutikoan oso egitura interesgarria da.

γ -Laktamei buruz hitz egin ahal izateko, aurretik zer diren azaldu beharra dago. Laktama izenak egitura *N*-heteroziklikoa duten konposatuei egiten die erreferentzia, amida talde funtzionalaren ziklaziaz eratutako konposatuei hain zuzen ere. Laktama izena aski ezaguna da hain garrantzitsuak diren antibiotiko β -laktamikoak direla eta, baina β -laktamak (1. irudia, **IV**) lau atomotako eraztunak diren bitartean, γ -laktamak (1. irudia, **III**) bost kideetakoak dira.

Hasiera batean, γ -laktama nukleoarekiko zegoen interesa eraztun β -laktamikoekin duen antzekotasunetik zetorren, antibiotiko β -laktamikoekiko erresistentzien arazoari aurre egiteko aukera bat izango zelakoan. Izan ere, mikrobio aurkako ekintza amida loturan, eta ez eraztunaren tamainan, oinarritzen dela frogatu zen.¹⁷ Hala ere, laster konturatu ziren egitura honi atxiki zatzaizkiokeen efektuak beste hainbat direla, γ -laktama biologikoki aktiboak diren

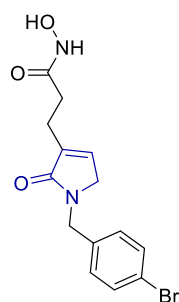
produktu naturalen zein farmako sintetikoaren egitura ohikoa baita.² Aurkezten duten aktibitate biologikoa epilepsiaren¹⁸, Alzheimer gaixotasunaren¹⁹ eta infekzioen (GIB²⁰ edo bakterianoa^{21,22}) tratamenduetan eraginkortasuna erakutsi dute, adibidez. Lan honetan, berriz, interesekoa izango den eragin antitumoral eta zitotoxikoa dira.^{23,24}

γ -Laktama zatia aurkezten duten farmako naturalei dagokienez, hainbat molekula bioaktibo aurkitu dira mekanismo ezberdinen bitartez eragin zitotoxikoa erakutsi dutenak.^{2,25,26} Honen adibide dira anantine eta isoanantina,²⁷ baita pukeleimida E²⁸ (2. irudia) ere. α -Metilen- γ -laktama egitura agertzen duten konposatuak dira, eta eragin zitotoxikoa ez ezik, aktibitate antitumoral eta antiinflamatorioa ere erakutsi dute. Beste agente kimioterapeutiko posible bat onddo batetik erauzitako UCS1025A izeneko antibiotiko antitumoral da, telomerasaren inhibizioari esker, zelula tumoral mota ezberdinen aurkako aktibitatea aurkeztu duena *in vitro* saiakuntzetan.²⁹ Minibiziaren aurkako eragina duen molekula naturalen adibideekin amaitzeko, jada entsegu klinikoetan frogatua izaten ari den salinosporamida A (2. irudia) aipatu beharra dago, 20S proteosomen inhibitzailea den konposatua. Honek Minbizi Institutu Nazionaleko (NCI) 60 zelula lerroetan (kolon, biriki, NSZ, bular eta melanoma zeluletan, besteak beste) eragin inhibitzailea erakutsi du.^{2,30}

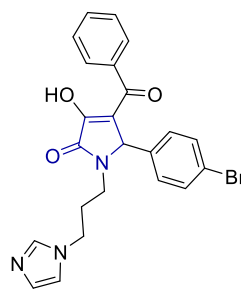


2. irudia. Aktibitate antitumoral duten γ -laktama naturalen egiturak.

Konposatu sintetikoak bestalde, konposatu bioaktibo naturalak oinarri bezala hartuta diseinatu dira askotan. Modu honetan, aktibitate antiproliferatiboa duten molekulen sintesia posible izan da; hala nola, ziklazio intramolekular bidez (C-C lotura berria eratuz) sintetizatutako **V** konposatua (3. irudia). Konposatu honek eragin antitumoral duen deribatu γ -laktamiko sintetikoa da, zelula neoplasikoen hazkuntza geldiarazten duena histonen deazetilasaren inhibitzailea delako.³¹ [3+2] Anulazioz sintetizatutako **VI** konposatuak (3. irudia) ere erabilera antitumoral agertzen du, nutlin-3-k³² jarraitzen duen mekanismo berari esker, alegia, p53-MDM2 proteina-proteina interakzioaren inhibizioaz.³³



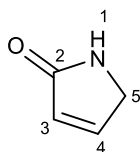
V



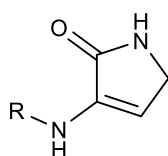
VI

3. irudia. Aktibitate antitumoralak duten γ -laktama sintetikoaren adibideak.

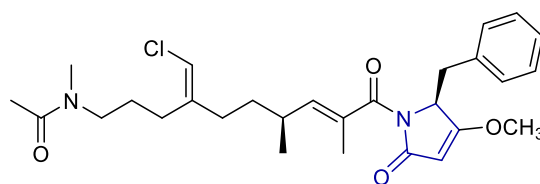
Azken molekula honetan 1,5-dihidro-2*H*-pirrol-2-ona zatia (4. irudia, VII) agertzen da. Hau da, zikloko lotura bikoitzari esker π elektroien sistema konjugatu bat agertzen duen γ -laktamen deribatu asegabea da. Hainbat deribatu sintetiko daude egitura hau dutenak, eta FPR1 antagonista³⁴, GIB-1 antibiral³⁵, antitumoral³⁴, edo VEGF-R inhibitzaile³⁶ bezalako aktibitate farmakologikoak atxiki zaizkie. Smenamida A (4. irudia) eta haren deribatuek, γ -laktama asegabea dute haien egituran eta mieloma zelulen gain aktibitate antiproliferatiboa erakutsi dute.³⁷



VII



VIII



Smenamida A

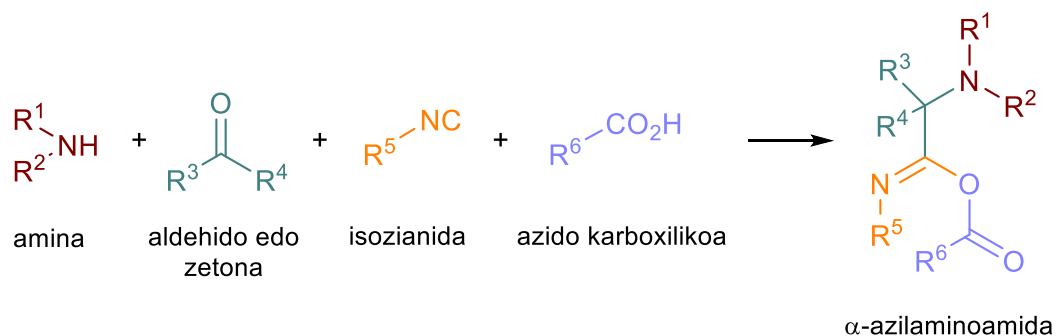
4. irudia. 1,5-Dihidro-2*H*-pirrol-2-ona (VII) eta 3-amino-1,5-dihidro-2*H*-pirrol-2-ona (VIII) egiturak eta Smenamida A.

Deribatu laktamiko hauetan amina talde bat zikloko 3 karbonoan gehituz gero (4. irudia, VIII), konjugazioa agertzeaz gain, egituran enamina talde funtzionala izango genuke, oso talde aproposa sintesi organikoan bitartekari moduan erabiltzeko, bi hortzetako nukleozalea baita.³⁸ Bestalde, 3-amino-1,5-dihidro-2*H*-pirrol-2-onak α -dehidro α -aminoazido ziklikoak ere badira.^{39,40} Deribatu zikliko hauek antiobiofilm antibiotikoetan⁴¹ edo kaspasa-3 inhibitzaileetan⁴² agertzeaz gain, aktibitate zitotoxikoa ere izan dezakete, ikerketa taldean frogatu den bezala.⁴³

Sintesi metodo anitz deskribatu dira deribatu γ -laktamikoaren lorpenerako, hauen artean ziklazio intramolekularrak eta zikloadizioak ugariak izanik.² Metodo hauek pausu anitzez osatuak egon ohi dira eta horrenbestez, luzeak eta zailak izateaz gain, hondakin asko eta etekin baxuagoak izaten dituzte. Horregatik, sintesi protokolo berriak diseinatzerako orduan, osagai anitzeko erreakzioen (MCR) bidezko sintesia nagusitzen ari da.⁴⁴

Erreakzio bat MCR bezala definitu ahal izateko, matrize bakarren erreaktibo guztiak aldi berean nahasteaz gain, amaierako produktuan hasierako osagai guztien zatiak agertu behar dira. Matrize bakarren burututako erreakzioak, molekula organiko konplexuen eraketa modu sinple eta eraginkor batean lortzea ahalbidetzen du, aldi berean purifikazio prozesuak errazten dituelarik.⁴⁵ Honek esan nahi du denbora, lehengaiak eta disolbatzaileak aurrezten direla, eta hondakinak murrizten direla ere bai.

MCR erreakzio mota ezagunen artean, Passerini edo Ugi erreakzioak aurkitzen dira. Ugi erreakzio klasikoan adibidez, lau erreaktibo konbinatzen dira matrize berean: amina, aldehidoa edo zetona, azido karboxilikoa eta isozianida, α -azilaminoamida produktuak lortzen dira (1. eskema). Lau osagaiko Ugi erreakzioa (U-4CR – *Ugi four-component reaction*) deritzo honi eta sintesi organikoan oso erabilia da eskaintzen dituen abantailengatik.⁴⁶



1. eskema. Lau osagaiko Ugi erreakzioaren (U-4CR) eskema orokorra.

Ikerketa biomedikoan MCR motako erreakzioak oso baliogarriak dira dibertsitate handiko molekulen sintesia posible egiten dutelako. Halaber, Kimika Farmazeutikoan aktibitate farmakologikodun konposatu berrien bilaketan aurrerapen bat suposatzen du. γ -Laktamen sintesirako deskribatu diren MCR metodoen artean⁴⁶, lan honetan amina aromatiko bat, aldehido bat eta etil pirubatoa baliatzen dituen erabiliko da. Horrela, 3-amino-1,3-dihidro-2H-pirrol-2-ona deribatuen sintetizatuko dira, gero funtzionalizatuak izan ahal daitezkeenak ordezkatzailerik elektroizale ezberdinekin erreakzionaraziz.

Modu honetan, zelula tumoralen hazkuntza eragin inhibitzailea izan dezaketen laktamen deribatuen bilketan konposatu berriak gehituko dira. Horrez gain, deribatuen arteko aktibitate zitotoxikoaren ezberdintasunak ikusi ahal izango dira. Bestalde, laktamak ordezkatzailerik ezberdinekin funtzionalizatu daitezke, eta gero talde funtzional bakoitzaren eragina positiboa edo negatiboa izan den ebaluatu *in vitro* aktibitate biologikoa aztertuz.

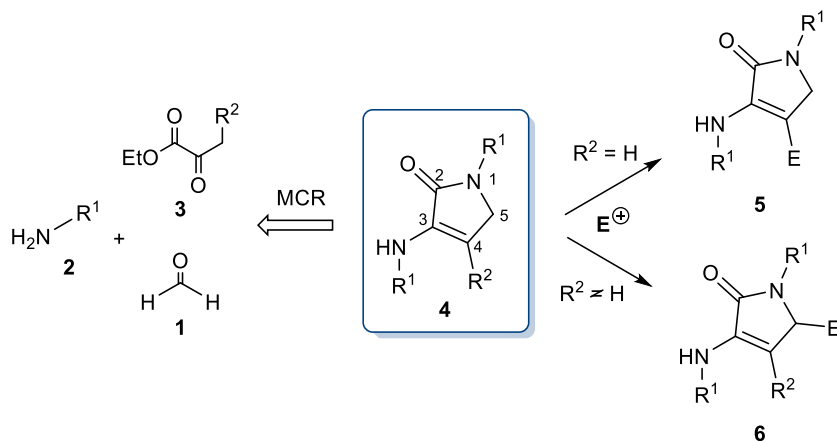
HELBURUAK

Lan esperimental honen helburu nagusia pirrolidin-2-onen deribatu berrien sintesia da, aktibitate farmakologikoa izan dezaketen molekula berrien bilaketan aurrera egin ahal izateko.

Helburu honetarako, MCR erreakzioaren bidez **1** formaldehidoa, **2** anilina aromatikoa ezberdinak eta **3** etil pirubatoa (2. eskema) erreakzionaraziko dira, 4 eta 5 C-etan ordezkatzailerik ez duten laktamak lortzeko (2. eskema, **4**: $R^2 = H$). Anilinan ordezkatzailerik ez duten laktamak jartzean, erreaktibitatean eta aktibitate biologikoan izan dezaketen eragina aztertu ahalko da.

γ -Laktamak sintetizatu ondoren, hauek funtzionalizatzea izango da hurrengo pausua. Aurretiaz ikertutakoaren arabera, laktamek aktibitate zitotoxiko hobeak dute funtzionalizatuak izan ostean. Enaminaren erreaktibitateari esker, laktamaren laugarren karbonoan talde funtzional elektroizaleak gehituko dira (1. eskema, **5** eta **6**).

Halaber, etil pirubatoaren deribatu bat erabiliz, laugarren karbonoa ordezkatzeko laktama prestatuko da (2. eskema, **4**, $R^2 = CH_3$) haren erreaktibitatea nolakoa den aztertzeko. Izan ere, laugarren posizioa blokeatuta egonda, 5. karbonoan enolatoa sortu eta funtzionalizazioa gertatuko ote den ikusiko da (2. eskema, **6**).



2. eskema. Anilina, aldehidoa eta pirubatoaren arteko MCR erreakzioa, eta ondorengo funtzionalizazioa elektroizaleekin (E^+).

Amaitzeko, sintetizatutako deribatuen aktibitate antiproliferatiboa aztertuko da. Lehendabizi, konposatuen disoluzio ezberdinak prestatuko dira giza zelula tumoralen hazkuntza medioetara gehitzeko. Zelulen hazkuntzan inhibizioa antzemanaz gero, konposatuak giza zelula osasuntsuekin jarriko dira kontaktuan. Entsegu honetan, zelula osasuntsuetan inhibiziorik ez ematea bilatzen da, honek konposatuek zelula tumoralerikiko selektibitatea dutela adieraziko lukeelako.

Orohar, ordezkatzaille ezberdinak dituzten γ -laktamen prestatzearekin bat, sintesi prozedurak optimizatzeaz gain, bioaktibitatean garrantzitsuak izan daitezkeen molekula zatiak identifikatu ahalko dira. Hau da, laktama ordezkatuaren aktibitateak alderatuz egitura-aktibitate erlazio ikerketak (SAR ikerketak) egin ahalko dira.

EMAITZAK ETA EZTABAIDA

Hasieran esan bezala, farmako berrien bilaketa garrantzi handikoa da. Azken urteotan aurrerapen handiak egin izanagatik ere, oraindik ez dago minbizia sendatzeko tratamendu ziurrik. Gainera, minbizia hain gaixotasun aldakorra izanik, tratamenduak anitzak ere izan behar dira.

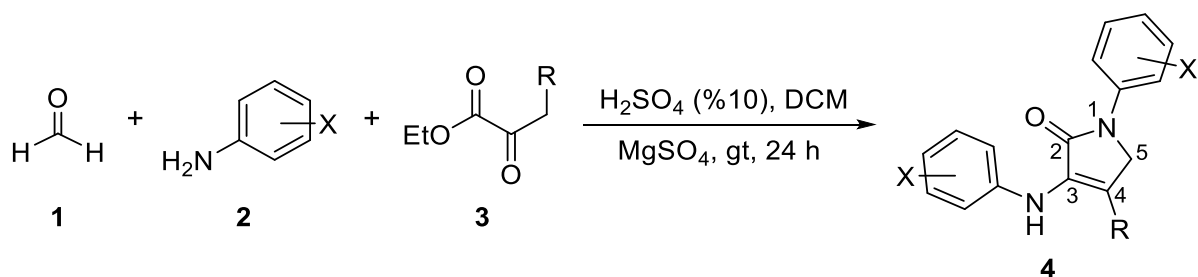
Kimika Farmazeutikoaren helburua, konposatu kimioterapiko berriak lortzeaz gain, hauen sintesi prozedurak optimizatzea izango litzateke. Aukera terapeutiko ezberdinak behar dira, baina hauen lorpena erraza eta jasangarria izatea garrantzitsua da ere bai. Horregatik, guztiz justifikatua dago molekula berrien sintesi sistematikoa; bai molekula berrien aurkikuntza arintzen delako, baita sintesi prozesuak optimizatzen direlako ere.

MCR prozedurek eginkizun honetan aurrerapen handiak ekarri dituzte eta horregatik honetaz baliatu behar gara ahalik eta molekula gehien lortzeko eta sintesi prozesu eraginkorrek eta jasangarriak diseinatzeko, azken helburua tratamendu terapeutikoen hobekuntza izanda.

1. Laktamen sintesia

Lehenik eta behin, ikerketaren oinarri diren laktamak prestatu dira osagai anitzeko sintesiaren bidez, saileko ikerketa lan-taldean aurretiaz deskribatu izan den osagai anitzeko sintesi prozesua jarraituz.³⁸ Erreakzio mota honetan, aldehido bat, anilina ordezkatuak eta pirubato deribatuak nahasten dira γ -laktama ezberdinak prestatzeko.

Lan honetan, zehazki, etil pirubatoa, anilina halogenatu ezberdinak eta formaldehidoa gehitu dira matrizean, azido sulfurikoaren kantitate katalitikoekin batera (3. eskema). Formaldehidoa erabiltzen da bosgarren karbonoan ordezkatzailerik ez duten laktamak lortzeko. Bestalde, 4. karbonoan metilo ordezkatzaillea agertzen duen laktamaren prestaketarako etil pirubatoa erabili beharrean, metil 2-oxobutanoato deribatua erabili da (3. eskema, **3**: R = CH₃).



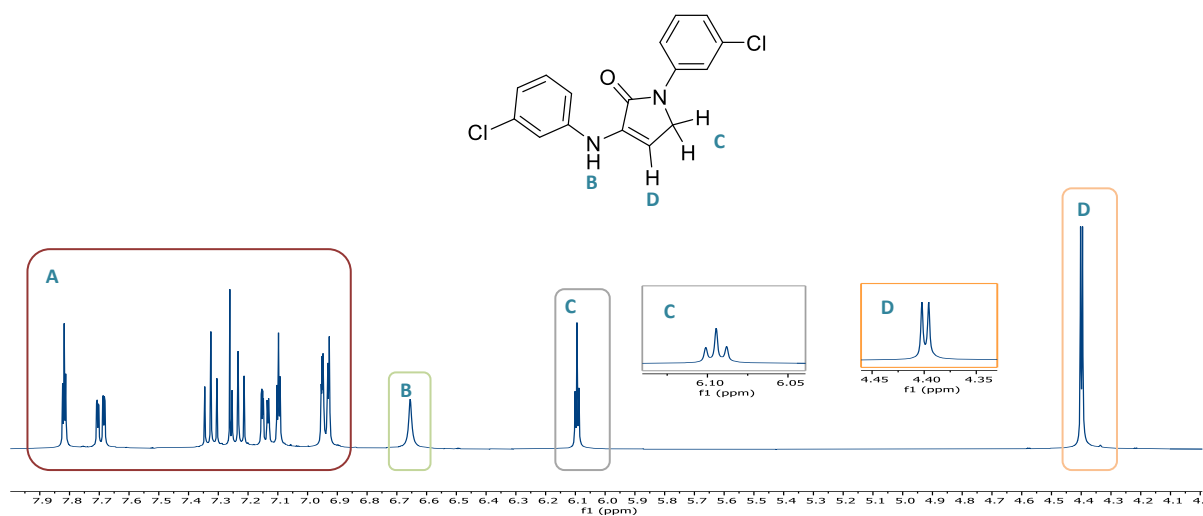
a: X = 3-Cl, R = H (% 28) c: X = 3-Br, R = H (% 43)
 b: X = 2-F, R = H (% 14) d: X = 3-Cl, R = CH₃ (% 17)

3. eskema. γ -Laktamen MCR bidezko sintesiaren eskema orokorra.

Horrela, lau laktama berri prestatu ahal izan dira (3. eskema, **4a-d**). Hauen isolamendu eta purifikaziorako, kristalizazioa edo, hau posible izan ez denean, zutabe kromatografikoak erabili dira. Lortutako produktuak karakterizatzeko berriz, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IRFT eta HRMS teknika espektroskopikoak baliatu dira.

Adibidez, **4a** konposatuaren ¹H-NMR espektroan, molekularen ziklazioa gertatu dela baieztatzen duten seinalek agerian dira (5. irudia): $\delta_H = 4.40$ ppm-tan agertzen den dobletea eta $\delta_H = 6.09$ ppm-tan agertzen den tripletea, haien artean akoplatuak daudenak $^3J = 2.69$ Hz-ko akoplamendu konstantearekin. Dobletea zikloko CH₂ taldeko protoiei dagokio (3. irudia, **D** seinalea) eta tripletea aldiz, ondoko protoi binilikoaren seinalea da (3. irudia, **C** seinalea). Gainerako seinaleak, amina taldearenak (3. irudia, **B** seinalea), ur deuteratuz desagertzen dena, eta protoi aromatikoarenak (3. irudia, **A** seinale multzoa) dira.

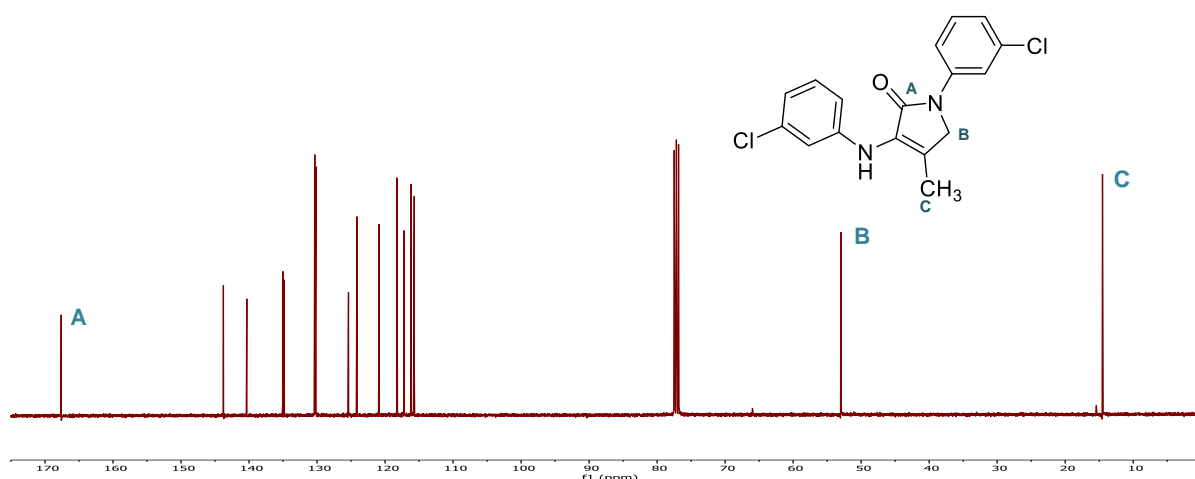
4d Laktamaren espektroan berriz, protoi binilikoaren seinalea desagertu eta haren ordeztan $\delta_H = 1.93$ ppm-tan metil taldearen singletea agertzen da, CH₂ taldeko seinalea singletea den bitartean.



5. irudia. **4a** Molekularen ¹H-RMN espektroa.

^{13}C -NMR espektroari dagokionez, aurrekoan bezala, eraztuneko karbonoak dira adierazgarrienak. **4d** Laktamaren kasuan, adibidez, eraztunaren karbonilo taldearen seinalea amidetan ohikoa den desplazamendu kimikoan agertzen da, $\delta_{\text{C}} = 167.6$ ppm izanik (6. irudia, **A** seinalea). $\delta_{\text{C}} = 52.9$ ppm-tan, zikloko CH_2 -ko karbonoa (6. irudia, **B** seinalea) antzeman daiteke. Laktama honen kasuan (**4d**), gainerakoetan agertzen ez den seinalea ikus daiteke ^{13}C -NMR espektroan: metilo taldearen karbonaren seinalea, $\delta_{\text{C}} = 14.5$ ppm-tan (6. irudia, **C**).

Asignazio hauek baieztatzeko, DEPT esperimentua erabili da. Bertan, karboniloaren seinalea (**A**) desagertzen da **4a-d** laktametan, eta zikloko 4. atomoaren seinalea positiboa da (gorantz agertzen da) **4a-c** konposatuetan, **4d**-ren kasuan desagertzen den bitartean. **B** karbonoen seinalea negatiboa da (beherantz agertzen da) DEPT espektro guztietan.

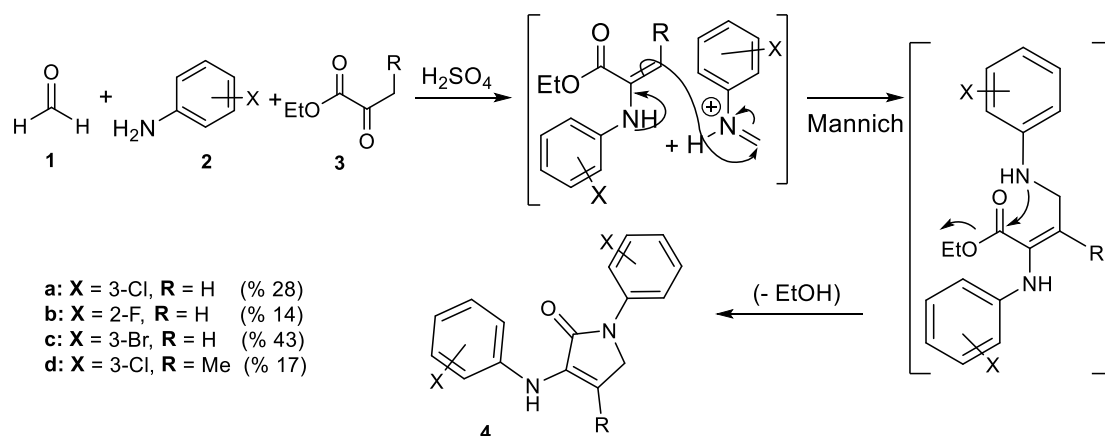


6. irudia. **4d** Laktamaren ^{13}C -NMR espektroa.

2-Fluoroanilina lehengaia erabili den kasuan, egituran bi fluor atomo duen **4b** laktama prestatzeko asmoz, aurreko analisi espektroskopikoez gain, ^{19}F -NMR espektroa ere burutu da. Hala, bi fluor atomoak ezberdinak izanda, bi seinale ezberdin ageri dira $\delta_{\text{F}} = -121,5$ eta $-132,1$ ppm-tan, **4b** laktama fluorodunaren prestaketa arrakastaz egin dugunaren seinale.

Karakterizazioa osatze aldera, IR espektroa ere aztertu da talde funtzional bereizgarrienak identifikatzeko. Horrela, $\nu = 3350 \text{ cm}^{-1}$ -ean N-H taldearen tentsio bibrazioaren seinalea ikus daiteke, $\nu = 3100 \text{ cm}^{-1}$ -ean agertzen diren $=\text{C}-\text{H}$ -en seinaleetatik gertu. Azken hauek sp^2 hibridaziodun karbonoen eta hauei loturiko hidrogenoen arteko tentsio bibrazioari dagozkie; hau da, fenil taldekoen eta laktama barneko alkenoaren C-H lotutaren seinaleak dira. Bestalde, sp^3 hibridazioko C-H loturaren tentsio bibrazioak $\nu = 2910 \text{ cm}^{-1}$ aldera antzeman daitezke. Azkenik, talde funtzional bereizgarrietarikoa $\nu = 1595 \text{ cm}^{-1}$ -tan agertzen den seinalea da; amidaren karbonilo lotura bikoitzaren tentsio bibrazioaren seinale zorrotza, hain zuzen ere.

Laktama guztiak sintetizatu eta karakterizatu direnean, MCR erreakzio honen mekanismoa proposatu ahal da. Hasteko, anilinarene baliokide bana etil pirubatoarekin eta formaldehidoarekin kondentsatzen dira aldi berean, enamina eta imina bat emanez, hurrenez hurren (4. eskema). Ondoren, H_2SO_4 katalizatzaile azidoaren eraginez iminarene protonazioari esker, Mannich erreakzio bat gertatzen da bitartekari irekia emanez. Amaitzeko, aminak karboxilatoaren karbonoa erasotzean molekula barneko ziklazioa gertatzen da, etanola askatzearekin batera (4. eskema).



4. eskema. 4a-d Laktamen sintesirako erreakzio mekanismoa eta etekinak.

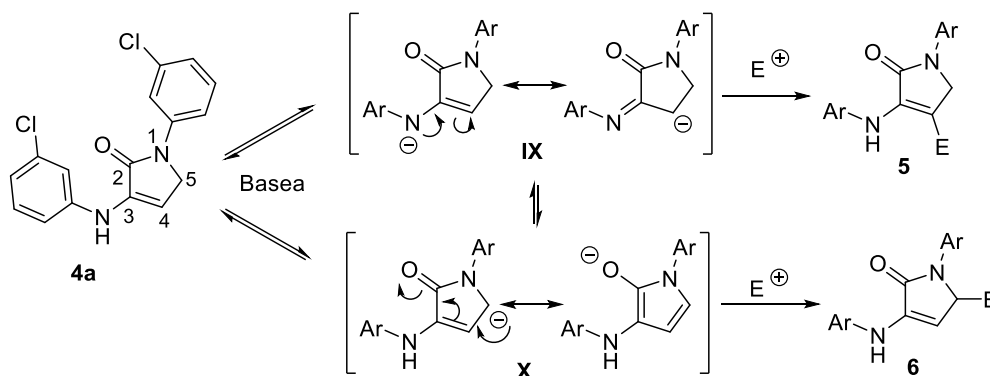
Sintesiaren emaitzak aztertzerakoan, ikusi ahal izan da anilinarene ordezkatzailer den halogeno motaren arabera, baita kokapenaren arabera ere, erreaktibitatea aldagarria den. Lortutako etekinetan antzeman daiteke hau, 3-bromoanilina erreaktibo lez daukan erreakzioak etekin hobereana eskaini duen bitartean, 2-fluoranilina etekin baxuena eman baitu. Horren arrazoia erreakzioaren mekanismoari erreparatuta aurkitu ahal dugu. Izan ere, alde batetik, fluor atomoa elektronegatiboena izanda, bitarteko aminarene erreaktibitatea murrizten du Mannich erreakzioan (4. eskema). Bestetik, tamaina txikieneko halogenoa izan arren, *orto* posizioan dagoenez, hau da, erreakzio guneetatik oso gertu, oztopo esterikoa egongo da eta erreaktiboaren arteko hurbilketa zailduta. Honek guztiak azaldu zitekeen ezberdintasunak erreaktibitatean

2. Funtzionalizazioa

Behin laktamen sintesia eginda, hauetan talde funtzional gehigarriak txertatzea da hurrengo helburua. Horretarako, laktaman dagoen enaminarene berezko erreaktibitatea aprobetxatuz, laugarren karbonoaren bitartez eraldaketa kimikoak saiatu dira (5. Eskema).

Adibidez, **4a** laktama base batekin tratatzerakoan, enaminarene desprotonazioa gertatu ahal da eta **IX** azaenolatoa sortu. Ondoren, bitartekari nukleozale honek erreakzioa eman

dezake errektibo elektroizale batekin eta 4. karbonoan funtzionalizatutako **5** laktama berria eratu.



5. Eskema. 4a Laktamaren erreakzio posibleak elektroizaleekin.

Halaber, azaenolatoaz gain, **X** enolato binilogoia ere era daiteke eta orduan, espezie elektroizale batekiko ondorengo erreakzioak, 5. karbonoan ordezkaturako **6** laktama sortuko luke.

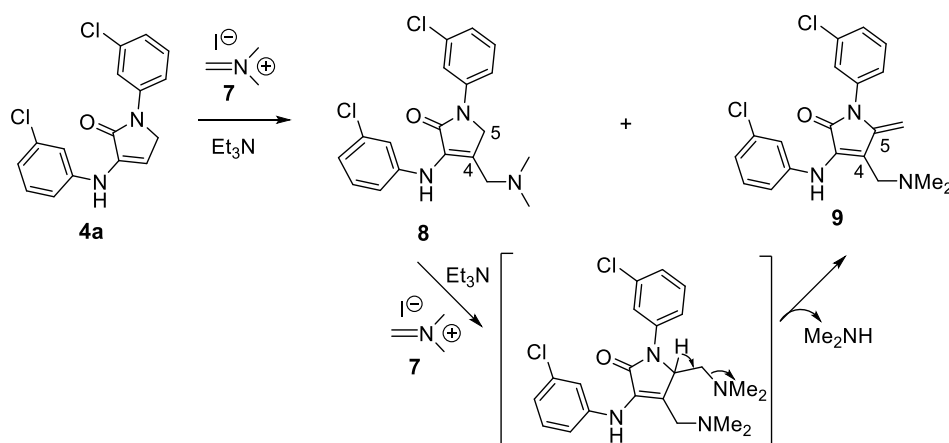
Lehenengo saiakeran, **4a** laktama metil propiolato errektiboarekin erreakzionarazi genuen, LDA base sendo bezala erabiliz. Modu horretan, eta adizio konjugatuaren bitartez, 4. posizioan ester konjugatua izango zuen molekula lortzea zen helburua. Erreakzioa 24 orduz izan ondoren, hasierako laktama desagertu zela ikusi zen TLC-ren bitartez. Hala ere, erreakzioaren emaitza gordina tratatu ostean, produktu ugariz osotutako nahastea lortu zen, eta ezin izan zen konposatua isolatu ezta identifikatu ere.

Bigarren saiakera batean, eta laktamaren laugarren posizioan aminometil talde bat txertatzeko asmoz, Eschenmoser errektiboa ((*N,N*-dimetil) metilenamonio ioduroa) (6. eskema, **8**) erabili da. Erreakzioa trietilamina basearekin eta tenperatura aplikatuz (60 C°), 72 orduz mantendu zen. Kasu honetan lehengai bezala erabilitako **4a** laktamak ez du guztiz erreakzionatu, baina proportzio handi batean konposatu berri bat antzeman da TLC-an. Zutabe kromatografikoa egin ostean, banaezina diren bi produktuen nahastea dela ikusi da.

Izan ere, frakzio horren $^1\text{H-RMN}$ espektroa aztertzean, funtzionalizazioa laugarren karbonoan ez ezik, bosgarrenean ere gertatu dela ondorioztatu da (6. eskema). Modu honetan, bi deribatu nagusi lortu dira: **8** konposatua, ordezkatzaila 4. karbonoan duena, eta hortaz gain, **9** konposatua, 4. karbonoan dimetilaminometil taldea eta 5. karbonoan metilen talde bat dituena.

Bi konposatu hauen eraketa azaltzeko, 6. eskeman azaltzen den portaera proposatzen da. Honen arabera, base baten presentzian laktamak enamina bezalako portaera kimikoa du (5. eskema, **IX** bitartekaria). Hortaz, hasiera batean Eschenmoser gatz elektroizaleak

enaminaren erreaktibilitatea baliatuz 4. karbonoaren bidez erreakzionatu, eta ondorioz **5** deribatua sortuko da. Konposatu hau, beraz, enaminaren enolatoaren adizio nukleozalearen produktu zuzena da. Jarraian, molekula honek haren enolato binilogoaren bitartez (5. eskema, **X** anioiaren analogoa), Eschenmoser gatzaren bigarren mol batekin erreakzionatzen du eta 5. zein 4. karbonoetan funtzionalizatutako bitarteko molekula eratuko da, nahiz eta hau ezin identifikatu (6. eskema). Azkenik, baseak lagunduta, dimetilamina talde ateragarri onaren eliminazio erreakzio bat gertatu, eta horren ondorioz metilen talde bat eratuko da, **9** konposatua sortuz.



6. Eskema. 4a Laktamaren eta dimetilmетенamонийо ioduroaren (**8**) arteko erreakzioa.

Horrenbestez, laktama funtzionalizatzea lortu dugun arren, erreakzioa ez da ez erabatekoa, ez selektiboa izan. Izan ere, laktamaren frakzio batek ez du erreakzionatu, nahiz eta denbora luzez eragin eta Eschenmoser erreaktiboa soberan jarri. Bestalde, 5. eskeman aurreikusi diren portaera biak antzeman dira laktama honekin, hau da, enaminaren azaenolatoaren bidezko erreakzioa eta, jarraian, karboniloaren enolato binilogoarena. Sortu diren bi konposatuen nahastea banandu ezin izan den arren, ¹H-espeketroan **8** zein **9** konposatuen seinale adierazgarrienak identifikatu ahal izan dira.

3. Aktibitate zitotoxikoaren ebaluazioa

Azken urteotan, gure ikerketa taldean mota honetako γ -laktamen sintesia eta ebaluazio biologikoa burutu da, minbizi zelula-lerro ezberdinen aurrean.⁴³

Hala ere, zikloko 5. karbonoan ordezkatu gabeko laktama oso gutxi ebaluatu dira. Horregatik, ordezkapen patroi hori duten konposatu berriak prestatu eta haien aktibitatea neurtzea interesgarri iruditu zaigu. Beraz, Gradu Amaierako Lan honetan laktamen aktibitate antitumoralaren frogapenerako *in vitro* saiakuntzak egiteari ekin genion giza biriketako kartzinoma zeluletan (A-594).

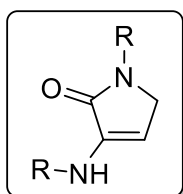
Lehenik eta behin, **4a** laktamaren aktibitate biologikoa aztertu da, 50 μM baino gehiagoko IC_{50} balioa lortuz. Horrek esan nahi du laktama honez ez duela zitotoxikotasunik erakutsi zelula-lerro honen gainean.

Minbizi zeluletan aktibitate antitumoralak aurkitu balitz, hurrengo urratsa konposatuaren selektibitatea aztertzea izango litzateke, alegia, tumore-zeluletan inhibizioa eragiten eta zelula osasuntsuetan, aldiz, eraginik ez duela ikertzea.

Gure kasuan, minbizi-zeluletan eraginik ez dagoenez, **4a** ez da biriketako fibroblastoetan, hau da, MRC-5 zelula ez tumoraletan, frogatu.

Emaitza hau testuinguruan jartzeko, 1. taulan **4a** molekularen eta analogo batzuen zitotoxikotasuna erakusten da. Bada, **10** eta **11** laktamek aktibitate antitumoralak erakutsi dute A594 zelulen aurka, eta ez MRC5 zelula osasuntsuen aurrean. Hortaz, selektiboak dira aktibitate txikia izan arren. Nabarmentzekoa da **11** konposatuak IC_{50} balio hobek eman dituela eta halogeno (fluor) duela bere egitura. Horrenbestez, pentsa zitekeen halogenoen presentziak aktibitatearen erantzulea dela, baina kloroa duen **4a** konposatua ez da zitotoxikoa suertatu zelula hauetan. Presatu ditugun gainontzeko **4b** eta **4c** laktamek fluor eta bromo halogenoak dute ziklo aromatikoan, eta hauek frogatzea interesekoa izango litzateke halogenoek aktibitate zitotoxikoa izan ditzaketen eragina aztertzeko. Jakina da fluorak molekulei ezaugarri fisiko-kimiko eta biologiko bereziak eman ahal dietela.⁴⁸

1. taula. γ -Laktamen IC_{50} balioak A594 (tumoralak) eta MRC5 (osasuntsuak) zeluletan.



10: R = 4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$

11: R = 4- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$

4a: R = 3- ClC_6H_4

Sarrera	Konposatua	IC_{50} (μM)	
		A594	MRC5
1	10	38,25 \pm 3,35	> 50
2	11	22,94 \pm 1,13	> 50
3	4a	> 50	---

Hurrengo urratsa, beraz, **4b** eta **4c** laktamen ebaluazioa burutzea da, baita laugarren karbonoan ordezkaturako **4d** konposatuarena ere. Horrela eraztun aromatikoko halogeno ezberdinen eta heterozikloko metil talde gehigarriaren eragin biologikoa ezagutu eta alderatzeko. Modu honetan, egitura-aktibitate azterketa burutu ahalko da eta farmakoforoaren egitura ezaugarriak zehaztu. Dena den, Gradu Amaierako Lan honetan ez da horretarako denbora nahikorik egon eta etorkizun hurbilean egin beharreko lana izango da.

ONDORIOAK

Ikerketa lan honetan lau 3-amino-1,5-dihidro-2*H*-ona deribatu berri lortu ahal izan dira MCR sintesiaren bidez eta haien ondorengo karakterizazioa burutu da teknika ezberdinak baliatuz.

Erabilitako MCR erreakzioa aurretik deskribatua izanagatik ere, 4. eta 5. karbonoetan ordezkatzailerik ez duten laktama berriak sintetizatzeko erabili ahal izan da. Gainera, laktama eratzeko erabili den anilinaren halogeno ordezkatzailearen arabera, 3-bromoanilina erreaktiboa aproposena dela esan daiteke, harekin etekin hoberenak lortu baitira.

Laktamen ondorengo funtzionalizazioari dagokionez, **4a** konposatua erabili da substratu gisa erreaktibo elektroizale ezberdinekin. Eschenmoser gatza erabili denean, erreakzioa ez da erabatekoa izan baina bi produktu berrien nahastea lortu da. Produktu hauek identifikatu ahal izan dira, nahiz eta banandu ezin izan diren.

Sintetizatutako **4a** laktamaren aktibitate zitotoxikoa aztertu da *in vitro* eta emaitza negatiboa izan da, hots, molekula honek ez du A594 zelula tumoralen proliferazioa inhibitzen. Posiblea da, hala ere, prestatu diren beste laktamak bioaktiboak izatea, fluor eta bromo halogenoak dituztenak, alegia.

Horregatik, interesgarria izango litzateke sintetizatutako laktama guztien aktibitatea aztertzea, honela halogeno ezberdinen presentziak aktibitate biologikoan izan dezaketen eragina alderatu ahal izateko. Era berean, funtzionalizazio erreakzio aproposen bilaketa ere interesekoa izango litzateke. Laburbilduz, atera genezake ondorio nagusia ikertzen jarraitzeko beharra da, aktibitate zitotoxiko eraginkorra duen laktama aurkitzeko eta hauen MCR bidezko sintesia eta funtzionalizazioa optimizatzeko.

ATAL ESPERIMENTALA

ATAL KIMIKOA

1. Teknikak eta materialak

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

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.

Produktuak purifikatuak izateko *flash* zutabeak erabili dira: fase geldikor bezala silika gela (Scharlab, *gel de silice* 60 Å) eta fase mugikorra hexano/etil azetato nahaste ezberdinak izanik.

Konposatuen karakterizaziorako egin diren espektroak (¹H-RMN, ¹³C-RMN eta ¹⁹F-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 eta erreferentzia bezala disolbatzaile deuteratua ezarri da (7,26 ppm-tan ¹H-aren kasuan, eta 77.0 ppm-tan ¹³C-an). Akoplamendu konstanteak (J) Hertzioetan (Hz) adierazi dira. Azkenik, ¹³C-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 ekipamenduz (ionizazio iturra: ESI Agilent Jet Stream, serie zenbakia: US93620455) baliatuz.

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

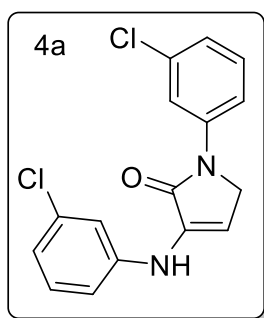
2. Osaqai anitzeko 1,5-dihidro-2H-pirrol-2-onen sintesia

Prozedura orokorra

Anilina baliokide bi aldehidoaren 1.1 baliokideekin eta etil pirubatoaren 3 baliokideekin nahastu dira nitrogeno atmosferapean 100 mL-ko matrazean, DCM disolbatzaile moduan erabiliz (3 mL errektiboko 1 mmol bakoitzeko). Azido sulfurikoaren 0.1 baliokide gehitu dira katalizatzaile lez, eta magnesio sulfato anhidroa (MgSO_4) erreakzioan askatzen den ura xurgatzeko (3 g). Irabiagailu magnetikoaren laguntzaz, erreakzioa 72 orduz martxan eduki da giro tenperaturan.

Erreakzio gordina Büchner inbutua erabiliz iragazi da, eta bertan DCM-rekin bi aldiz garbitu. Kitasatoan bildutako iragazkina lurrungailu birakarian presio negatiboan kontzentratu da. Lortutako olio hexano : DCM nahastea edo etil eterra erabiliz kristalizatu da edo zutabe kromatografikoaren bidez purifikatu da, fase mugikor moduan hexano eta etil azetato nahaste ezberdinak erabiliz.

1-(3-Klorofenil)-3-((3-klorofenil)amino)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona (4a)



Prozedura orokorra jarraituz, formaldehidoa (16.5 mmol, 1.23 mL), 3-kloroanilina (30 mmol, 3.17 mL) eta etil pirubatoa (45 mmol, 4.99 mL) nahastean eta ondoren kristalizazioa Et_2O -an eginez, solido zuri-horixka den **4a** konposatuaren 1.36 g (%28) lortu dira.

Fusio puntua: 157 - 159 °C

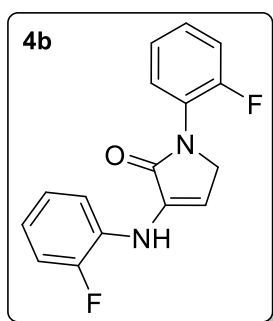
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3). δ (ppm): 7.82 (dd, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 7.69 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 0.9$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 7.32 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 7.23 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 7.14 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 0.9$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 7.10 (dd, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 6.96-6.92 (m, 2H, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 6.66 (sz, 1H, NH), 6.09 (t, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, 1H, =CH), 4.40 (d, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, 2H, CH_2).

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 166.3 (C=O amida), 142.6 (C_{kuat}), 140.1 (C_{kuat}), 135.2 (C_{kuat}), 135.1 (C_{kuat}), 133.6 (C_{kuat}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 124.7 (CH_{Ar}), 121.4 (CH_{Ar}), 118.7 (CH_{Ar}), 116.6 (CH_{Ar}), 116.4 (CH_{Ar}), 115.0 (CH_{Ar}), 102.1 (=CH), 49.6 (CH₂).

IRFT. ν (cm⁻¹): 3350 (N-H, st), 3128 (sp² C-H, st), 2910 (sp³ C-H, st), 1595 (C=O, st).

HRMS (Q-TOF). m/z: [C₁₆H₁₂Cl₂N₂O + H]⁺ = 318,0327; masa zehatz esperimentalala 318,0341 izanik.

1-(2-Fluorfenil)-3-((2-fluorfenil)amino)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona (4b)



Prozedura orokorra jarraituz, formaldehidoa (16.5 mmol, 1.23 mL), 2-fluoranilina (30 mmol, 2.89 mL) eta etil pirubatoa (45 mmol, 4.99 mL) nahastean eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez (Hexano:AcOEt 9:1), solido zurixka den **4b** konposatuaren 0.60 g (% 14) lortu dira.

Fusio puntua: 120 - 121 °C

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 7.62 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.36-7.09 (m, 6H, 6 x CH_{Ar}), 6.91 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.78 (s_z, 1H, NH), 6.18 (t, ³J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, =CH), 4.44 (d, ³J_{HH} = 2.5 Hz, 2H, CH₂).

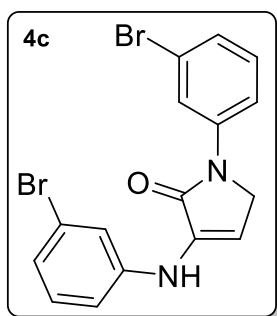
¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 166.8 (C=O amida), 156.8 (d, ¹J_{FC} = 250.1 Hz, C-F), 152.4 (d, ¹J_{FC} = 243.5 Hz, C-F), 133.0 (C_{kuat}), 130.3 (d, ²J_{FC} = 12.7 Hz, C_{kuat}), 128.3 (d, ³J_{FC} = 8.0 Hz, CH_{Ar}), 127.4 (d, ⁴J_{FC} = 1.7 Hz, CH_{Ar}), 125.8 (d, ²J_{FC} = 12.4 Hz, C_{kuat}), 124.7 (d, ³J_{FC} = 3.7 Hz, CH_{Ar}), 124.6 (d, ³J_{FC} = 3.8 Hz, CH_{Ar}), 121.2 (d, ³J_{FC} = 7.1 Hz, CH_{Ar}), 116.9 (d, ²J_{FC} = 20.2 Hz, CH_{Ar}), 116.5 (d, ⁴J_{FC} = 1.8 Hz, CH_{Ar}), 115.5 (d, ²J_{FC} = 18.7 Hz, CH_{Ar}), 103.6 (=CH), 51.4 (d, ⁴J_{FC} = 5.6 Hz, CH₂).

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃). δ (ppm) -121.5, -132.1.

IRFT. ν (cm⁻¹): 3370 (N-H, st), 3051 (sp² C-H, st), 2914 (sp³ C-H, st), 1684 (C=O, st).

HRMS (Q-TOF). m/z: [C₁₆H₁₂F₂N₂O + H]⁺ = 286,0918; masa zehatz esperimentalala 286,0931 izanik.

1-(3-Bromofenil)-3-((3-bromofenil)amino)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona (4c)



Prozedura orokorra jarraituz, formaldehidoa (16.5 mmol, 1.23 mL), 2-kloroanilina (30 mmol, 3.27 mL) eta etil pirubatoa (45 mmol, 4.99 mL) nahastean eta ondoren zutabe kromatografikoa eginez hexano:DCM nahastean kristalduz, solido laranja den **4c** konposatuaren 2.64 g (%43) lortu dira.

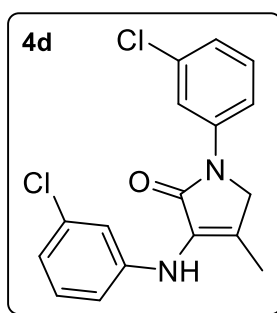
Fusio puntua: 138 - 141 °C

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 7.94 (dd, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.75 (ddd, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.29 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.27-7.24 (m, 2H, 2 x CH_{Ar}), 7.17 (dd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.09 (ddd, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.98 (ddd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.63 (sz, 1H, NH), 6.09 (t, ³J_{HH} = 2.6 Hz, 1H, =CH), 4.39 (d, ³J_{HH} = 2.6 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 166.3 (C=O amida), 142.7 (C_{kuat}), 140.3 (C_{kuat}), 133.5 (C_{kuat}), 130.8 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 124.3 (CH_{Ar}), 123.3 (C_{kuat}), 123.1 (C_{kuat}), 121.5 (CH_{Ar}), 119.2 (CH_{Ar}), 117.1 (CH_{Ar}), 115.5 (CH_{Ar}), 115.5 (d, ²J_{FC} = 18.7 Hz, CH_{Ar}), 102.1 (=CH), 49.6 (CH₂).

IRFT. v (cm⁻¹): 3325 (N-H, st), 3101 (sp² C-H, st), 2921 (sp³ C-H, st), 1612 (C=O, st).

1-(3-Klorofenil)-3-((3-klorofenil)amino)-4-metil-5-dihidro-2H-pirrol-2-ona (4d)



Prozedura orokorra jarraituz, formaldehidoa (16.5 mmol, 1.23 mL), 2-kloroanilina (30 mmol, 2.89 mL) eta metil 2-oxobutanoatoa (45 mmol, 4.99 mL) nahastean eta ondoren kristalizazioa Et₂O-an eginez, solido zuri-horixka den **4d** konposatuaren 0.86 g (%17) lortu dira.

Fusio puntua: 159 - 161 °C

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 7.78 (dd, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.67 (ddd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.30 (dd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.15 (dd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.11 (ddd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.87 (ddd, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 1H,

CH_{Ar}), 6.78 (dd, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.72 (m, 1H, CH_{Ar}), 5.99 (sz, 1H, NH), 4.26 (d, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 2H, CH₂), 1.93 (t, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃). δ (ppm): 167.6 (C=O amida), 143.7 (C_{kuat}), 140.3 (C_{kuat}), 133.0 (C_{kuat}), 134.8 (C_{kuat}), 130.3 (CH_{Ar}), 130.2 (C_{kuat}), 130.1 (CH_{Ar}), 125.4 (C_{kuat}), 124.1 (CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 118.2 (CH_{Ar}), 117.2 (CH_{Ar}), 116.2 (CH_{Ar}), 115.7 (CH_{Ar}), 117.1 (CH_{Ar}), 115.5 (CH_{Ar}), 115.5 (d, ²J_{FC} = 18.7 Hz, CH_{Ar}), 53.0 (CH₂), 14.5 (CH₃).

IRFT. ν (cm⁻¹): 3320 (N-H, st), 3085 (sp² C-H, st), 2975 (sp³ C-H, st), 1610 (C=O, st).

HRMS (Q-TOF). m/z: [C₁₇H₁₄Cl₂N₂O + H]⁺ = 332,0483; masa zehatz esperimentalak 332,0502 izanik.

3. 4a Laktamaren funtzionalizazioa

4a Laktamaren baliokide bat (2 mmol, 0.668 g), (*N,N*-dimetil) metilenamoni ioduroaren 1.5 baliokide (3 mmol, 0.555 g) eta 1.5 baliokide trietilamina (0.418 mL) nahastu dira hoztailea duen matrize batean. Kloroformo (3 mL) disolbatzailea erabili da eta irabiagailu magnetikoarekin irabiatzen mantendu da 60 °C-tan 72 ordutan zehar.

Erreakzioa amaituta, ura (5 mL) eta DCM (10 mL) gehitu eta dekantatzen utzi da. Fase organikoa hiru aldiz garbitu da urarekin (3 x 5 mL), eta amaitzeko MgSO₄ anhidroz tratatu da lurrungailu birakarian disolbatzailea baporatu aurretik.

Lotutako olioak zutabe kromatografikoaren bidez purifikatu da (Hexano:DCM 8:2 nahastearekin hasi eta 1:1-rekin amaitu) eta **8** eta **9** konposatuen nahastea lortu da. ¹H-NMR analisiaren arabera, konposatuak identifikatu dira eta osagai horien arteko proportzioa 1:1 dela zehaztu da.

1. Teknikak eta materialak

Sintetizatu diren laktamen *in vitro*-ko aktibitate zitotoxikoaren ebaluaziorako, komertzialki lortutako A-549 giza albeoloetako epitelio basalaren minbizi-zelulak erabili dira, nitrogeno likido ontzi batean kontserbatuak izan direnak. II-A mailako fluxu-laminarreko kanpailan tratatuak izan dira eta F-12K medioan hazi dira, %10-eko FBS-a eta normozin antibiotikoekin batera.

Zelulak inkubagailuan mantendu dira tenperatura eta hezetasun maila optimoetan (CO₂ %5ean; %95eko hezetasuna; 37°C). 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 kolorimetrico hauek egin ahal izateko CCK-8 erreaktiboa erabili da.

2. Zitotoxikotasun probak

4a Konposatua purifikatuaren kantitate ezberdinak DMSO-n disolbatu dira, beti ere DMSO-aren azken kontzentrazioa %5 baino handiago izan gabe. Disoluzio hauek 5°C-tan gorde dira erabiliak izan arte. A-549 zelulak hazi ondoren, tripsinarekin erauzi dira eta 96 zuloxotako plakan inokulatu dira, hauetako bakoitzean $2,5-3 \times 10^3$ zelula jarritz. 24 orduz inkubagailuan hazkuntzan mantendu ostean, konposatuaren disoluzio ezberdinak gehitu dira: 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 eta 50 µM-eko kontzentrazioak zehazki. 48 orduz inkubatu dira, gero 10 µL CCK-8 gehitzeko eta berriz 2 orduz inkubatzeko. Amaitzeko, zuloxotako bakoitzaren absorbantzia neurtu da (450 eta 620 nm) zelula bizien proportzioa kalkulatu ahal izateko. Zuloxotako bakoitzaren konposatuaren kontzentrazioa eta zelula bizien ehunekoaren arabera, IC₅₀ balioa (µM) lortu ahal izan da, hau da, zenbateko laktama kontzentrazioa behar den zelula hazkuntzaren %50-a inhibitzeko.

4a Laktamaren IC₅₀-ak 50 µM baino balio handiagoa eman du, edo bestera esanda, zelula hazkuntzaren % 50-a inhibitzeko laktamaren kontzentrazioa 50 µM baino handiagoa izan behar da.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Munduko Osasun Erakundea. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (2021ko ekainaren 2an kontsultatua).
- ² Caruano, J.; Muccioli, G. G.; Robiette, R. Biologically Active γ -Lactams: Synthesis and Natural Sources. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*(43), 10134-10156. DOI: 10.1039/C6OB01349J
- ³ Joule, J.A. Chapter Four - Natural Products Containing Nitrogen Heterocycles—Some Highlights 1990–2015. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2016**, *119*, 81-106. DOI: 10.1016/bs.aihch.2015.10.005.
- ⁴ Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles Among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J Med Chem.* **2014**, *57*(24), 10257-10274. DOI: 10.1021/jm501100b.
- ⁵ Patani G.A., LaVoie E.J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147–3176. DOI: 10.1021/cr950066q.
- ⁶ Bhardwaj, V.; Gumber, D.; Abbot, V.; Dhiman, S.; Sharma, P. Pyrrole: a resourceful molecule in key medicinal hetero-aromatics. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 15233-15266. DOI: 10.1039/C4RA15710A
- ⁷ Li Petri, G.; Spanò, V.; Spatola, R.; Holl, R.; Raimondi, M. V.; Barraja, P; Montalbano, A. Bioactive Pyrrole-Based Compounds with Target Selectivity. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112783. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112783.
- ⁸ Gholap, S. S. Pyrrole: An Emerging Scaffold for Construction of Valuable Therapeutic Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *110*, 13-31. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.12.017.
- ⁹ Brasca, M. G.; Gnocchi, P.; Nesi, M.; Amboldi, N.; Avanzi, N.; Bertrand, J.; Bindi, S.; Canevari, G.; Casero, D.; Ciomei, M.; Colombo, N.; Cribioli, S.; Fachin, G.; Felder, E. R.; Galvani, A.; Isacchi, A.; Motto, I.; Panzeri, A.; Donati, D. Novel Pyrrole Carboxamide Inhibitors of JAK2 as Potential Treatment of Myeloproliferative Disorders. *Bioorg Med Chem.* **2015**, *23*(10), 2387-2407. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.03.059.
- ¹⁰ Centro de información online de medicamentos de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. (Ficha técnica SUTENT 12,5 mg cápsulas duras) https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/06347003/FT_06347003.html (2021eko ekainaren 2an kontsultatua)
- ¹¹ Joudeh, J.; Claxton, D. Obatoclox mesylate: pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms. *J. Drug Eval.* **2012**, *21*(3), 363-373. DOI: 10.1517/13543784.2012.652302
- ¹² Kumar, R. S.; Almansour, Al.; Arumugam, N.; Mohammad, F.; Kotresha, D.; Menéndez, J.C. Spirooxindole-Pyrrolidine Heterocyclic Hybrids Promotes Apoptosis Through Activation

of Caspase-3. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*(12), 2487-2498. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.03.011

¹³ Arumugam, N.; Almansour, A.I.; Kumar, R. S.; Govindasami, P.; Al-thamili, D. M.; Krishnamoorthy, R.; Periasamy, V. S.; Alshatwi, A. A.; Mahalingam, S. M.; Thangamani, S.; Menéndez, J.C. Multicomponent Domino Synthesis, Anticancer Activity and Molecular Modeling Simulation of Complex Dispirooxindolopyrrolidines. *Molecules*. **2018**, *23*(5), 1094. DOI: 10.3390/molecules23051094.

¹⁴ Saraswat, P.; Jeyabalan, G.; Hassan, M. Z.; Rahman, M. U.; Nyola, N. K. Review of Synthesis and Various Biological Activities of Spiro Heterocyclic Compounds Comprising Oxindole and Pyrrolidine Moities. *Synthetic Communications*. **2016**, *46*(20), 1643-1664. DOI: 10.1080/00397911.2016.1211704.

¹⁵ National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/idasanutlin> (2021eko ekainaren 2an kontsultatua)

¹⁶ Montesinos, P.; Beckermann, B. M.; Catalani, O.; Esteve, J.; Gamel, K.; Konopleva, M. Y.; Martinelli, G.; Monnet, A.; Papayannidis, C.; Park, A.; Récher, C.; Rodríguez-Veiga, R.; Röllig, C.; Vey, N.; Wei A. H.; Yoo, SS.; Fenaux, P. MIRROS: a randomized, placebo-controlled, Phase III trial of cytarabine ± idasanutlin in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Future Oncology*. **2020**, *16*(13), 1744-8301. DOI: 10.2217/fon-2020-0044

¹⁷ Baldwin, J.E.; Lynch, G.P.; Pitlik, J. γ -Lactam analogues of β -lactam antibiotics. *J. Antibiot.* **1991**, *44*(1), 1881-1469. DOI: 10.7164/antibiotics.44.1

¹⁸ Malykh, A. G.; Sadaie, M.R. Piracetam and Piracetam-Like Drugs. *Drugs*. **2012**, *70*, 287-312 (2010). DOI: 10.2165/11319230-00000000-00000.0

¹⁹ Yang, Z.; Shu, Y.; Ma, L.; Wittmann, M.; Ray, W.J.; Seager, M. A.; Koeplinger, K. A.; Thompson, C. D.; Hartman, G. D.; Bilodeau, M. T.; Kuduk, S. D. Discovery of Naphthyl-Fused 5-Membered Lactams as a New Class of M1 Positive Allosteric Modulators. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*(5), 604-608. DOI: 10.1021/ml500055h.

²⁰ Kazmierski, W. M.; Andrews, W.; Furfine, E.; Spaltenstein, A.; Wright, L. Discovery of Potent Pyrrolidone-Based HIV-1 Protease Inhibitors with Enhanced Drug-Like Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*(22), 5689-5692. DOI: 10.1016/j.bmcl.2004.08.039.

²¹ Goldberg, J. A.; Nguyen, H.; Kumar, V.; Spencer, E. J.; Hoyer, D.; Marshall, E.K.; Cmolik, A.; O'Shea, M.; Marshall, S.H.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Rudin, S. D.; Domitrovic, T. N.; Bethel, C. R.; Papp-Wallace, K. M.; Logan, L. K.; Perez, F.; Jacobs, M. R.; van Duin, D.; Kreiswirth, B. M.; Bonomo, R. A.; Plummer, M. S.; van den Akker, F. A γ -Lactam Siderophore Antibiotic Effective against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*(11), 5990-6002. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00255.

-
- ²² Tan, S. W. B.; Chai, C. L. L.; Moloney, M. G. Mimics of Pramamicin Derived from Pyroglutamic Acid and their Antibacterial Activity. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*(8), 1889-1912. DOI: 10.1039/C6OB02828D.
- ²³ Robinson, R. P.; Laird, E. R.; Blake, J. F.; Bordner, J.; Donahue, K. M.; Lopresti-Morrow, L. L.; Mitchell, P. G.; Reese, M. R.; Reeves, L. M.; Stam, E. J.; Yocum, S. A. Structure-Based Design and Synthesis of a Potent Matrix Metalloproteinase-13 Inhibitor Based on a Pyrrolidinone Scaffold. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*(12), 2293-2296. DOI: 10.1021/jm0001368.
- ²⁴ Robinson, R. P.; Laird, E. R.; Blake, J. F.; Bordner, J.; Donahue, K. M.; Lopresti-Morrow, L. L.; Mitchell, P. G.; Reese, M. R.; Reeves, L. M.; Stam, E. J.; Yocum, S. A. Structure-Based Design and Synthesis of a Potent Matrix Metalloproteinase-13 Inhibitor Based on a Pyrrolidinone Scaffold. *ACS Jour. J. Med. Chem.* **2000**, *43*(12), 2293-2296. DOI: 10.1021/jm0001368.
- ²⁵ Lee, M.; Lin, H.; Cheng, F.; Chiang, W.; Kuo, Y. Isolation and Characterization of New Lactam Compounds that Inhibit Lung and Colon Cancer Cells from Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) Bran. *Food. Chem. Toxic.* **2008**, *46*(6), 1933-1939. DOI: 10.1016/j.fct.2008.01.033.
- ²⁶ Nay, B.; Riache, N.; Evanno, L. Chemistry and biology of non-tetramic g-hydroxy-g-lactams and g-alkylidene-g-lactams from natural sources. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*(8), 1044-1062. DOI:10.1039/b903905h
- ²⁷ Piotrowska, D. G.; Głowacka, I. E.; Schols, D.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Gotkowska, J. Novel Isoxazolidine and γ -Lactam Analogues of Homonucleosides. *Molecules.* **2019**, *24*(22), 4014. DOI: 10.3390/molecules24224014.
- ²⁸ Janecka, A.; Wyrębska, A.; Gach, K.; Fichna, J.; Janecki, T. desing Synthetic α -Methylenelactones and α -Methylenelactams with Anticancer Potential. *Drug. Discov. Today.* **2012**, *17*(11), 561-572. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.01.013.
- ²⁹ Agatsuma, T.; Akama, T.; Nara, S.; Matsumiya, S.; Nakai, R.; Ogawa, H.; Otaki, S.; Ikeda, S.; Saitoh, Y.; Kanda, Y. UCS1025A and B, New Antitumor Antibiotics from the Fungus *Acremonium* Species. *Organic Letters*, **2002**, *4*(25), 4387-4390. DOI: 10.1021/ol026923b
- ³⁰ Fenical, W.; Jensen P.R.; Palladino, M. A.; Lam, K. S.; Lloyd, G. K.; Potts, B. C. Discovery and Development of the Anticancer Agent Salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem*, **2009**, *17*(6), 19022674. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.10.075
- ³¹ Lee, C.; Choi, E.; Cho, M.; Lee, B.; OH, S. J.; Park, SK.; Lee, K.; Kim, H. M.; Han, G. Structure and property based design, synthesis and biological ecaluation of γ -lactam based HDAC inhibitors: Part II. *Bioorg. Med. Chem Letters*, **2012**, *22*(12), 4189-4192. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.045

-
- ³² Shangary, S.; Wang, S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *49*(1), 223-241. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723
- ³³ Zhuang, C.; Miao, Z.; Zhu, L.; Dong, G.; Guo, Z.; Wang, S.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Yao, J.; Sheng, C.; Zhang, W. Discovery, Synthesis, and biological evaluation of Orally Active Pyrrolidone Derivatives As Novel Inhibitors of p53–MDM2 Protein–Protein Interaction. *J Med Chem.* **2012**, *55*(22), 9630-9642. DOI: 10.1021/jm300969t.
- ³⁴ Kirpotina, L. N.; Schepetkin, I. A.; Khlebnikov, A. I.; Ruban, O. I.; Ge, Y.; Ye, R. D.; Kominsky, D. J.; Quinn, M. T. 4-Aroyl-3-hydroxy-5-phenyl-1H-pyrrol-2(5H)-ones as N-formyl peptide receptor 1 (FPR1) antagonists. *Biochem. Pharmacol.*, **2017**, *142*, 120–132. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.07.004
- ³⁵ Ma, K., Wang, P., Fu, W., Wan, X., Zhou, L., Chu, Y., & Ye, D. Rational design of 2-pyrrolinones as inhibitors of HIV-1 integrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*(22), 6724–6727. DOI:10.1016/j.bmcl.2011.09.054.
- ³⁶ Peifer, C.; Selig, R.; Kinkel, K.; Ott, D.; Totzke, F.; Schächtele, C.; Heidenreich, R.; Röcken, M.; Schollmeyer, D.; Laufer, S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 3-Aryl-4-(1H-indole-3yl)-1,5-dihydro-2H-pyrrole-2-ones as Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF-R) Inhibitors. *J Med Chem*, **2008**, *51*(13), 3814–3824. DOI:10.1021/jm8001185
- ³⁷ Caso, A.; Laurenzana, I.; Lamorte, D.; Trino, S.; Esposito, G.; Piccialli, V.; Costantino, V. Smenamide A Analogues. Synthesis and Biological Activity on Multiple Myeloma Cells. *Mar Drugs.* **2018**, *16*(6), 206. DOI: 10.3390/md16060206.
- ³⁸ Del Corte, X.; Martinez de Marigorta, E.; Palacios, F.; Vicario, J. A brønsted acid-catalyzed multicomponent reaction for the synthesis of highly functionalized γ -lactam derivatives. *Molecules*, **2019**, *24*(16), 2951. DOI: 10.3390/molecules24162951.
- ³⁹ Geranurimi, A.; Lubell, W. D. Diversity-Oriented Syntheses of β -Substituted α -Amino γ -Lactam Peptide Mimics with Constrained Backbone and Side Chain Residues. *Org. Lett.* **2018**, *20*(19), 6126-6129. DOI: 10.1021/acs.orglett.8b02575.
- ⁴⁰ Ganesh Kumar, M.; Veeresh, K.; Nalawade, S.A.; Nithun, R. V.; Gopi, H. N. Direct Transformation of N-Protected α,β -Unsaturated γ -Amino Amides Into γ -Lactams Through a Base-Mediated Molecular Rearrangement. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*(23), 15145-15153. DOI: 10.1021/acs.joc.9b01936.
- ⁴¹ Ye, Y.; Fang, F.; Li, Y. Synthesis and Anti-Biofilm Activities of Dihydro-pyrrol-2-one Derivatives on *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*(3), 597-601. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.010.

-
- ⁴² Zhu, Q.; Gao, L.; Chen, Z.; Zheng, S.; Shu, H.; Li, J.; Jiang, H.; Liu, S. A novel class of small-molecule caspase-3 inhibitors prepared by multicomponent reactions. *Euro J Med Chem*, **2012**, *54*, 232–238. DOI:10.1016/j.ejmech.2012.05.001.
- ⁴³ Del Corte, X.; López-Francés, A.; Maestro, A.; Villate-Beitia, I.; Sainz-Ramos, M.; Martínez de Marigorta, E.; Pedraz, J. L.; Palacios, F.; Vicario, J. A multicomponent protocol for the synthesis of highly functionalized γ -lactam derivatives and their applications as antiproliferative agents. (*Non-published results*)
- ⁴⁴ Sajko, J. S.; Bilić, V.L.; Kosalec, I.; Jerić, I. Multicomponent Approach to a Library of N-Substituted γ -Lactams. *ACS Comb Sci*. **2019**, *21*(1), 28-34. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00147.
- ⁴⁵ Vicario, J.; Palacios, F.; Martínez de Marigorta, E.; de los Santos, J.; Ochoa de Retana, A. Multicomponent Reactions in the Synthesis of γ -Lactams. *Synthesis*, **2018**, *50*, 4539–4554. DOI: 10.1055/s-0037-1611014.
- ⁴⁶ Sajko, J. S.; Bilić, V.L.; Kosalec, I.; Jerić, I. Multicomponent Approach to a Library of N-Substituted γ -Lactams. *ACS Comb Sci*. **2019**, *21*(1), 28-34. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00147.
- ⁴⁷ Taylor, A.P.; Robinson, R.P.; Fobian, Y. M.; Blakemore, D. C.; Jones, L. H.; Fadeyi, O. Modern Advances in Heterocyclic Chemistry in Drug Discovery. *Org Biomol Chem*. **2016**, *14*(28), 6611-6637. DOI: 10.1039/C6OB00936K.
- ⁴⁸ del Corte, X.; López-Francés, A.; Maestro, A.; Martínez de Marigorta, E.; Palacios, F.; Vicario, J. Brønsted Acid Catalyzed Multicomponent Synthesis of Phosphorus and Fluorine-Derived γ -Lactam Derivatives. *J. Org. Chem*. **2020**, *85*(22), 14369-14383. DOI: 10.1021/acs.joc.0c00280.