

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**PREPARACIÓN DE  
DICETOPIPERAZINAS Y EVALUACIÓN  
DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

---

Autor

XABIER RÍOS ARCEO

Tutor

Dr. CARLOS JAVIER SAAVEDRA FERNÁNDEZ

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Abstract.....   | 3  |
| Resumen .....   | 4  |
| Abreviaturas.....   | 5  |
| Introducción.....   | 6  |
| Objetivos.....  | 9  |
| Resultados y Discusión.....                                   | 10 |
| Proceso Sintético.....  | 10 |
| Screening antimicrobiano .....                                | 22 |
| Materiales y Métodos .....                                    | 24 |
| Técnicas experimentales generales .....                       | 24 |
| Técnicas cromatográficas .....                                | 26 |
| Actividades antimicrobianas .....                             | 26 |
| Procedimiento sintético.....                                  | 27 |
| Procedimiento experimental del Screening antimicrobiano ..... | 28 |
| Conclusiones.....   | 31 |
| Bibliografía.....   | 32 |
| Anexos.....   | 35 |

## Abstract

Due to the increasing emergence of antibiotic resistance, there is a need to find new compounds to which these microorganisms are susceptible. 2,5-diketopiperazines are involved in various biological processes, and display from antimicrobial effects to anticancer activity. In this work, the synthesis of DKP derivatives from commercial alpha-amino acids such as ornithine, valine, leucine, alanine, serine and phenylalanine has been carried out by forming linear dipeptides and then cyclising them. The antimicrobial activities of the obtained DKPs were studied, using bacteria of high sanitary importance such as *Escherichia coli* (Gram -) and *Staphylococcus aureus* (Gram +).

The deprotection step of the amine group of the amino acid ornithine could not be carried out, so the biological tests were performed with the compounds with the protected amine group. None of the compounds tested as antimicrobials had relevant activity, perhaps because a free amine group of ornithine is required for antimicrobial activity.

## Resumen

Dado que la aparición de resistencias a antibióticos es cada vez mayor, se requiere encontrar más compuestos nuevos a los que sean sensibles estos microorganismos. Las 2,5-dicetopiperazinas han demostrado a lo largo de los años intervenir en diversos procesos biológicos, presentando desde efectos antimicrobianos hasta actividad contra el cáncer. En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de derivados de DKP a partir de  $\alpha$ -aminoácidos comerciales como ornitina, valina, leucina, alanina, serina y fenilalanina; primero combinándolos y posteriormente ciclándolos. Las actividades antimicrobianas de las DKPs obtenidas fueron estudiadas, empleando bacterias de alta importancia sanitaria como *Escherichia coli* (Gram -) y *Staphylococcus aureus* (Gram +).

La etapa de desprotección del grupo amina del aminoácido ornitina no se pudo llevar a cabo, por lo que las pruebas biológicas se hicieron con los compuestos con el grupo amina protegido. Ninguno de los compuestos evaluados como antimicrobianos tuvieron actividad relevante, posiblemente debido a que el grupo amina de la ornitina no se encontraba libre sino protegido con un grupo bencil carbamato.

## Abreviaturas

|                           |  |                          |                                    |
|---------------------------|--|--------------------------|------------------------------------|
| <b>Aa</b>                 | Aminoácido   | <b><sup>1</sup>H-RMN</b> | Resonancia magnética nuclear       |
| <b>AcOEt</b>              | Acetato de etilo                                     |                          | de protón                          |
| <b>AcOH</b>               | Ácido acético  | <b>Hz</b>                | Hertzios                           |
| <b>Ala</b>                | Alanina  | <b>IR</b>                | Infrarrojo                         |
| <b>Boc</b>                | Terc-Butiloxicarbonilo                               | <b>J</b>                 | Constante de acoplamiento          |
| <b>Cbz o (Z)</b>          | Benciloxicarbonil                                    | <b>Leu</b>               | Leucina                            |
| <b>CDCI<sub>3</sub></b>   | Cloroformo deuterado                                 | <b>LB</b>                | Luria-Bertani                      |
| <b>cm</b>                 | Centímetro   | <b>m</b>                 | Multiplete                         |
| <b><sup>13</sup>C-RMN</b> | Resonancia magnética nuclear<br>de carbono           | <b>Me</b>                | Metilo                             |
| <b>d</b>                  | Doblete  | <b>MeOH</b>              | Metanol                            |
| <b>dd</b>                 | Doble doblete  | <b>MHz</b>               | Megahertzios                       |
| <b>ddd</b>                | Doble doble doblete                                  | <b>μL</b>                | Micro litro                        |
| <b>dddd</b>               | Doble doble doble doblete                            | <b>μM</b>                | Micromolar                         |
| <b>DCM</b>                | Diclorometano  | <b>mL</b>                | Mililitro                          |
| <b>δ</b>                  | Desplazamiento químico en<br>RMN (ppm)               | <b>mmol</b>              | Milimol                            |
| <b>DIPEA</b>              | Diisopropylethyl-amine                               | <b>nm</b>                | Nanómetro                          |
| <b>DKP</b>                | Dicetopiperazina                                     | <b>p.f.</b>              | Punto de fusión                    |
| <b>DMSO</b>               | Dimetilsulfóxido                                     | <b>Phe</b>               | Fenilalanina                       |
| <b>EMAR</b>               | Espectroscopia de masas de<br>alta resolución        | <b>ppm</b>               | Partes por millón                  |
| <b>ESI</b>                | Espectrometría de masas de<br>tipo electrospray      | <b>Pro</b>               | Prolina                            |
| <b>°C</b>                 | Grados Celsius                                       | <b>RMN</b>               | Resonancia magnética nuclear       |
| <b>g</b>                  | Gramos   | <b>s</b>                 | singulete                          |
| <b>h</b>                  | Hora/s   | <b>Ser</b>               | Serina                             |
| <b>HBTU</b>               | O-(benzotriazol-1-il)-<br>N,N,N',N'-tetrametiluronio | <b>TLC</b>               | Cromatografía en capa fina         |
| <b>Hex</b>                | Hexano   | <b>UFC</b>               | Unidades formadoras de<br>colonias |
|                           |  | <b>UV</b>                | Ultravioleta                       |
|                           |  | <b>Val</b>               | Valina                             |
|                           |  | <b>vmáx</b>              | Frecuencia máxima                  |

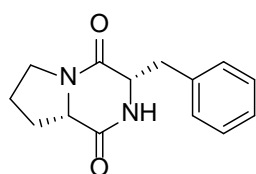
## Introducción

Durante el siglo XX se han incorporado muchos compuestos peptídicos como agentes terapéuticos. Destaca el aislamiento de la insulina de tejidos animales en 1920 y la obtención en 1950 de oxitocina y vasopresina sintéticas<sup>1</sup>, así como el descubrimiento de las endorfinas y su papel biológico en nuestro organismo<sup>2</sup>

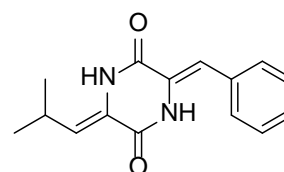
El reconocimiento de las 2,5-dicetopiperazinas como grupo especial de compuestos se produjo en torno a 1900<sup>3</sup>. Se forman fácilmente en la degradación de péptidos, o en la síntesis de estos. Se han encontrado en la naturaleza estos compuestos en organismos como plantas, hongos y bacterias, describiendo variedad de papeles en procesos biológicos como quimiotaxis entre organismos fúngicos y bacterias para mejorar la actividad antifúngica frente a nemátodos<sup>4</sup>, como agentes contra la respuesta inflamatoria endotelial mediada por lipopolisacáridos<sup>5</sup>, hasta su empleo como transportadores de membrana para el transporte de fármacos contra el cáncer<sup>6</sup>.

La diversidad estructural de las DKP resulta de la incorporación de distintas cadenas de  $\alpha$  y N-sustituyentes. Se obtiene un anillo de DKP que contiene 4 lugares de formación de puentes de hidrógeno, 2 aceptores y 2 dadores, los cuales pueden ser importantes para potenciales interacciones con sitios de unión a receptores<sup>7</sup>.

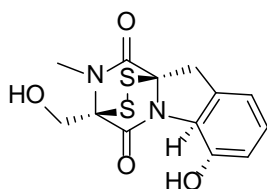
Muchas poseen bioactividades potentes como la señalización [ciclo(L-Phe-L-Pro)]<sup>8</sup> (**1**), antimicrobiano (albonoursin)<sup>9</sup> (**2**), y actividades anticancerígenas (gliotoxina)<sup>10,11</sup>(**3**). Otro ejemplo es la biciclomicina (**4**), un antibiótico bicíclico de amplio espectro que es el único compuesto conocido como inhibidor selectivo del factor de terminación Rho de la transcripción bacteriana.<sup>12</sup> (**Figura 1**)



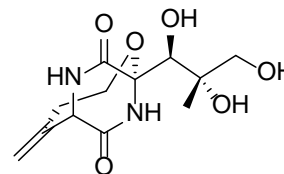
Ciclo (L-Phe-L-Pro) **1**



Albonoursin **2**



Gliotoxina **3**



Biciclomicina **4**

**Figura 1** Ejemplo de dicetopiperazinas con actividad biológica

Estudios han demostrado la capacidad anti-biofilm y anti-adherencia de distintas DKPs contra patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* arrojando buenos resultados para compuestos con residuos de Tyr y Phe<sup>13</sup>.

También se ha descubierto que es crítica la presencia de grupos altamente polares en las cadenas laterales como, por ejemplo, un residuo de serina para conseguir actividad antioxidante<sup>14</sup>

Desde la aparición de la penicilina se han descubierto muchos compuestos con actividad antibiótica. Hoy en día contamos con una gran cantidad de antimicrobianos, pero la aparición de cepas resistentes a dichos medicamentos hace más complicada la tarea de abordar terapéuticamente estas enfermedades. Por ello, la investigación de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana se ha convertido en algo primordial en la salud humana y animal. Según la OMS, de no dar respuesta a la continua aparición de resistencias a antibióticos, para el año 2050 las infecciones, será la principal causa de muerte en los países desarrollados, por delante del cáncer y las enfermedades cardiovasculares<sup>15</sup>.

Así, se ha escogido la ornitina por ser un aminoácido catiónico; esta característica permite que el grupo sea atraído por fuerzas electrostáticas hacia la membrana bacteriana, ya que esta presenta una carga negativa en su superficie debido a la cantidad de componentes lipídicos aniónicos, que en combinación con un grupo hidrofóbico presente en la

molécula podría facilitar un efecto de permeación.<sup>16</sup> La serina presenta un grupo polar (hidroxilo); mientras que la fenilalanina es un aminoácido hidrofóbico aromático. La valina, leucina y alanina son aminoácidos hidrofóbicos no aromáticos de distintos volúmenes, siendo estos menos investigados que los anteriores.



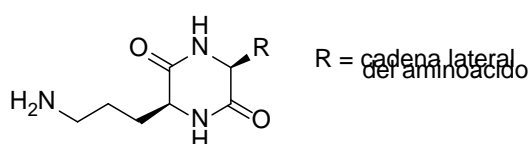
## Objetivos

1. Preparación de 2,5-dicetopiperacinas (DKP) empleando distintas combinaciones de pares de  $\alpha$ -aminoácidos comerciales. Para llevar a cabo esta síntesis se utilizarán técnicas y procedimientos habituales en un laboratorio de química orgánica, tales como reacciones a temperatura ambiente y a reflujo, procesos de extracción, así como el seguimiento de reacciones por cromatografía de capa fina, y purificación de compuestos por cromatografía en columna.
2. Confirmación de la estructura de los compuestos obtenidos y caracterización de estos mediante: resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY y HSQC), espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas de alta resolución, actividad óptica y/o punto de fusión.
3. Breve evaluación de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Escherichia coli* (Gram -) de algunas DKP y establecimiento de las relaciones preliminares de estructura-actividad.

## Resultados y Discusión

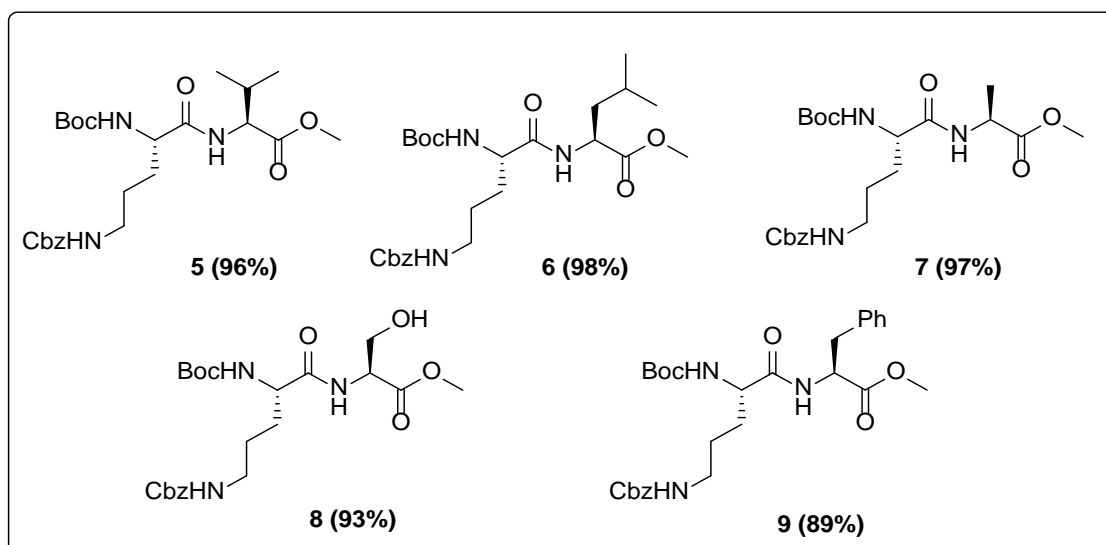
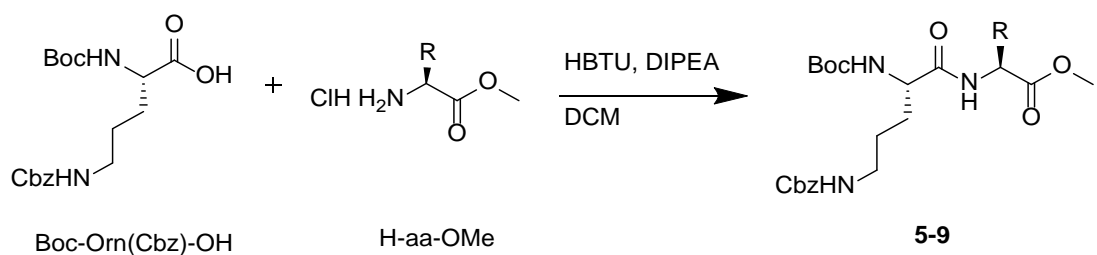
### Proceso Sintético

En este trabajo fin de grado se detalla el proceso de síntesis de compuestos derivados de 2,5-dicetopiperazinas a partir de  $\alpha$ -aminoácidos comerciales. El estudio se hizo usando el aminoácido ornitina como base de todas las dicetopiperazinas, y se prepararon diversas combinaciones de dicetopiperazinas formadas por ornitina y otros aminoácidos comerciales. (**Figura 2**).



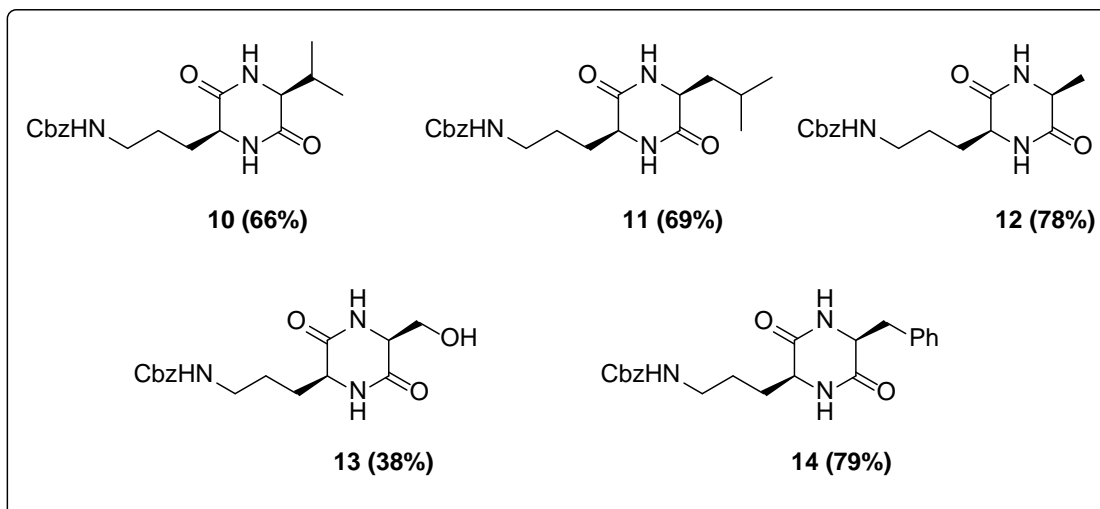
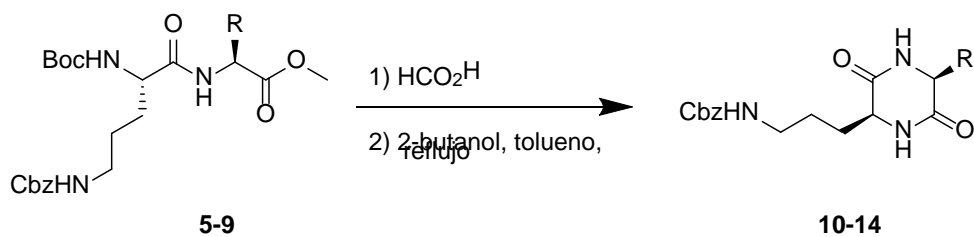
**Figura 2** Modelo de 2,5-dicetopiperazinas con unidades de ornitina.

Para la síntesis de las 2,5-dicetopiperazinas, mostrada en **Esquema 1**, primero se sintetizaron los dipéptidos lineales (**5-9**), protegidos de manera adecuada. Para la unión de los dos  $\alpha$ -aminoácidos se empleó el reactivo de acoplamiento HBTU y la base DIPEA. La elección de este reactivo de acoplamiento, para la formación del enlace amida, se debe a su buen rendimiento<sup>17</sup>.



**Esquema 1** Síntesis de los dipéptidos precursores.

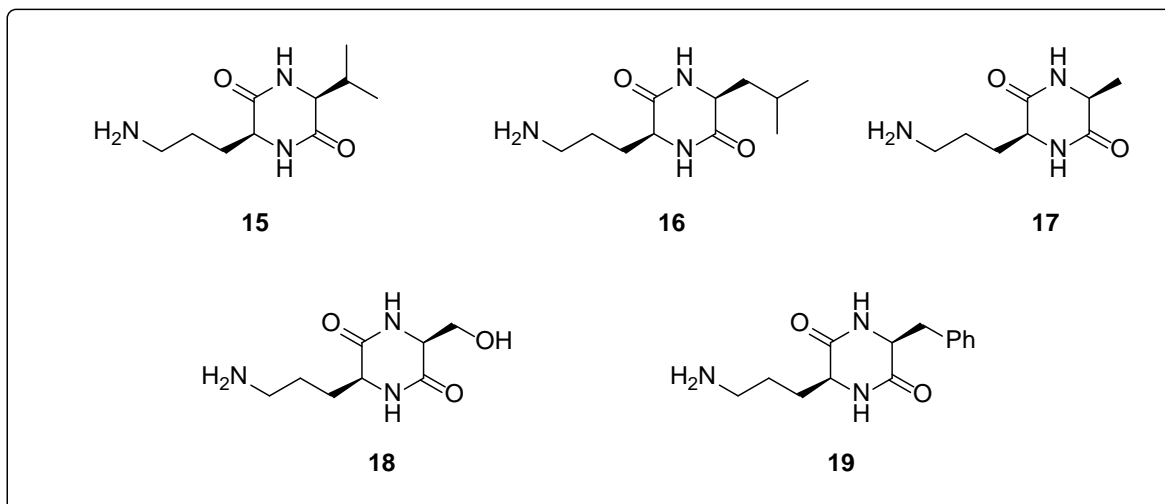
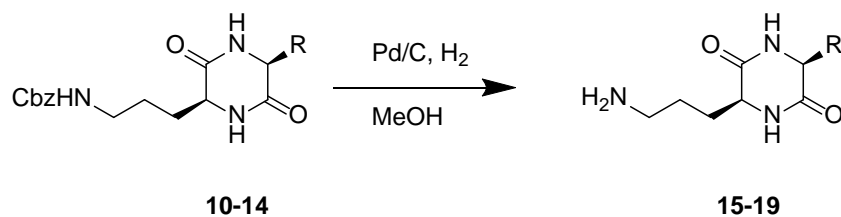
A continuación, se llevó a cabo la desprotección del grupo Boc en medio ácido usando ácido fórmico, se concentró a vacío y posteriormente se cicló intramolecularmente mediante reflujo de tolueno<sup>18,19</sup>, obteniéndose las 2,5-dicetopiperazinas (**10-14**). Se muestra en **Esquema 2**.



### Esquema 2 Síntesis de 2,5-dicetopiperazinas.

Las estructuras de las 2,5-dicetopiperazinas sintetizadas se comprobaron utilizando técnicas de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ , así como experimentos de dos dimensiones (COSY y HSQC). Además, se emplearon espectrometría de masas y espectroscopia de infrarrojo y se determinó el punto de fusión de los compuestos que eran sólidos cristalinos.

El último paso para completar la síntesis propuesta consistía en la eliminación del grupo protector bencil carbamato (Cbz) por una hidrogenación con paladio/carbono, para obtener las 2,5-dicetopiperazinas con la amina libre en la cadena lateral de la ornitina. Se muestra en **Esquema 3**.



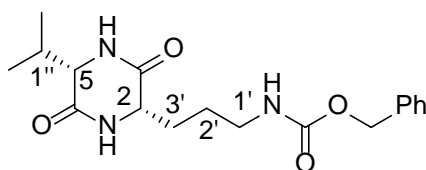
### Esquema 3 Eliminación del grupo protector Cbz.

Las dicetopiperazinas (**10-14**) no se disolvían en MeOH ni en otros disolventes habituales a temperatura ambiente. Así que se llevó a cabo la reacción en metanol a 50 °C obteniéndose los productos deseados, pero desafortunadamente estos productos presentaban impurezas que no pudieron eliminarse con cromatografía o cristalización. Quizás pueda purificarse mediante cromatografía en fase reversa, sin embargo, no se disponía de esa técnica en el laboratorio.

Se propusieron otros disolventes para llevar a cabo la hidrogenación (AcOH, DMF) pero con ninguno de ellos se pudo obtener el producto deseado, por lo que los estudios de actividad antimicrobiana solo se llevaron a cabo con las 2,5-dicetopiperazinas con el grupo amino protegido como bencil carbamato.

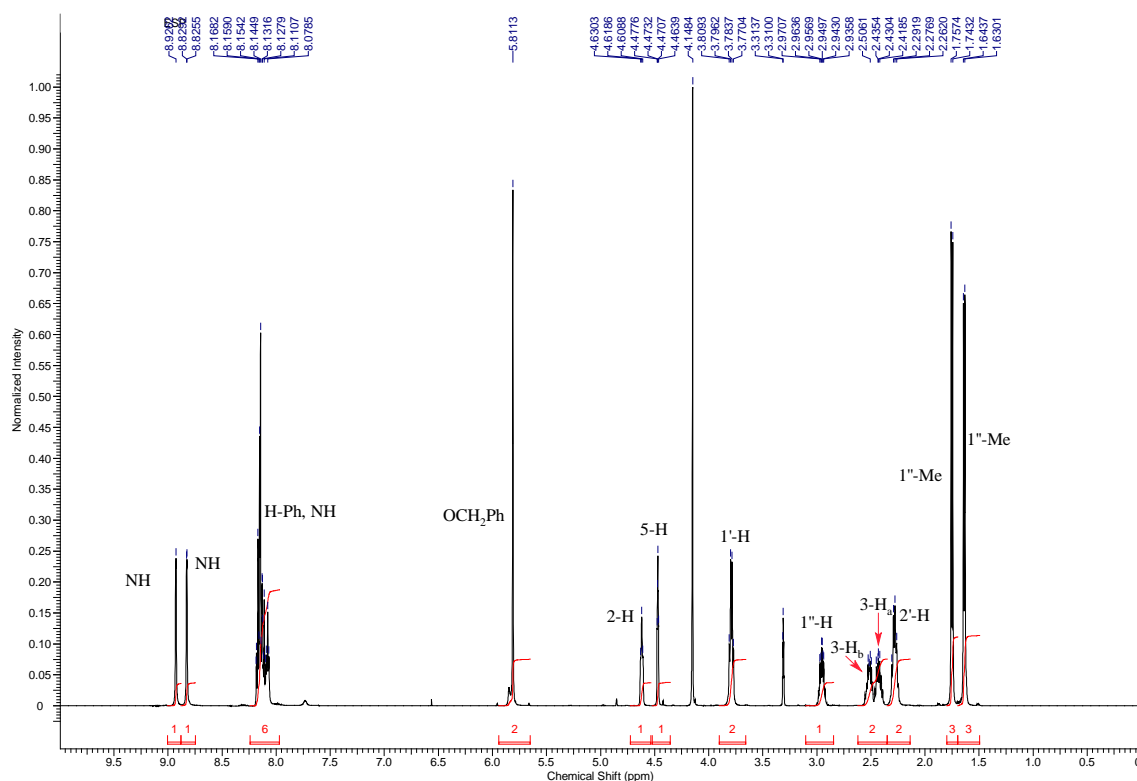
A continuación, se muestra a modo de ejemplo los espectros de  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ , COSY, HSQC, infrarrojo y masas del compuesto **10**.

# <sup>1</sup>H-RMN (10)



10

## (3'-((2S,5S)-5-isopropil-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo

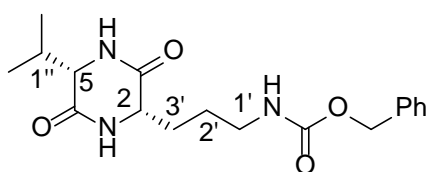


| Señal <sup>1</sup> H-RMN (ppm)        | Explicación   |
|---------------------------------------|---|
| 1.64<br>(3H, d, $J = 6.8$ Hz, 1''-Me) | Señal doblete que integra por 3 protones. Su desplazamiento químico indica que son protones alifáticos que no están unidos a grupos atractores de electrones. Corresponde con 1''-Me. En el COSY hay correlación con el protón 1''-H ( $J = 6.8$ Hz)  |
| 1.75<br>(3H, d, $J = 7.1$ Hz, 1''-Me) | Señal doblete que integra por 3 protones. Su desplazamiento químico indica que son protones alifáticos que no están unidos a grupos atractores de electrones. Corresponde con 1''-Me. En el COSY hay correlación con el protón 1''-H. ( $J = 7,1$ Hz) |
| 2.25-2.31<br>(2H, m, 2'-H)            | Señal multiplete que integra por 2 protones. Por su desplazamiento se trata de protones alifáticos no unidos a grupos atractores de electrones, 2'-H. En el COSY hay correspondencia con 1'-H.  |

|   |  |
|---|--|
| 2.43<br>(1H, m, 3'-H <sub>a</sub> )                               | Señal multiplete que integra por un protón, correspondiente a 3'-H <sub>a</sub> . En el experimento COSY hay correlación con 3'-H <sub>b</sub> , 2-H y 2'-H.   |
| 2.52<br>(1H, m, 3'-H <sub>b</sub> )                               | Señal multiplete que integra por un protón, correspondiente a 3'-H <sub>a</sub> . En el experimento COSY hay correlación con 3'-H <sub>a</sub> , 2-H y 2'-H.   |
| 2.95<br>(1H, dddd, <i>J</i> = 10.4, 6.9, 6.9, 3.6, 3.6 Hz, 1''-H) | Señal dddd que integra por un protón. Por el desplazamiento se trata de un protón alifático y su acoplamiento indica que corresponde a 1''-H. En el COSY hay correlación con los metilos 1''-Me y 5-H.   |
| 3.79<br>(2H, ddd, <i>J</i> = 6.6, 6.6, 6.6 Hz, 1'-H)              | Señal cuadruplete que integra por dos protones. Por su desplazamiento es un protón alifático cuyo carbono está unido a un heteroátomo cercano a su entorno. Se trata de 1'-H. En el COSY se observa correlación con 2'-H y con un NH ( $\delta_H$ 8.07-8.16) |
| 4.47<br>(1H, m, 5-H)  | Señal multiplete que integra por un protón. En COSY hay correlación con 1''-H y con NH ( $\delta_H$ 8.83). Se trata de 5-H.  |
| 4.62<br>(1H, dd, <i>J</i> = 5.4, 5.4 Hz, 2-H)                     | Señal triplete que integra por un protón. ( <i>J</i> = 5.4 Hz). En el experimento COSY se correlaciona con NH ( $\delta$ 8,93), con 3'-H <sub>a</sub> y con 3'-H <sub>b</sub> . Se trata de 2-H.   |
| 5.81<br>(2H, s, OCH <sub>2</sub> Ph)                              | Señal singulete que integra por 2 protones. Su desplazamiento sugiere que su carbono está unido a heteroátomo, por tanto, se trata del CH <sub>2</sub> bencílico. En el experimento COSY no correlaciona con ninguna señal.                                  |
| 8.08<br>(1H, dd, <i>J</i> = 5.7, 5.8 Hz, NH)                      | Señal dd que integra por un protón. En el experimento COSY se correlaciona con 1'-H y en el HSQC no correlaciona con ningún carbono. Se trata del NH del carbamato.  |
| 8.10-8.18<br>(5H, m, H-Ph)  | Señal multiplete que integra por 5 protones. Por el desplazamiento se deduce que son los 5 protones aromáticos.  |
| 8.83<br>(1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz, NH)                            | Señal doblete que integra por un protón. En el experimento COSY correlaciona con el 5-H y en el HSQC no correlaciona con ningún carbono. Se trata de un NH amida del anillo DKP. ( <i>J</i> = 1.8 Hz).   |
| 8.93<br>(1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz, NH)                            | Señal doblete que integra por un protón. En el experimento COSY correlaciona con el 2-H y en el HSQC no correlaciona con ningún carbono. Se trata de un NH amida del anillo DKP. ( <i>J</i> = 1.8 Hz).   |

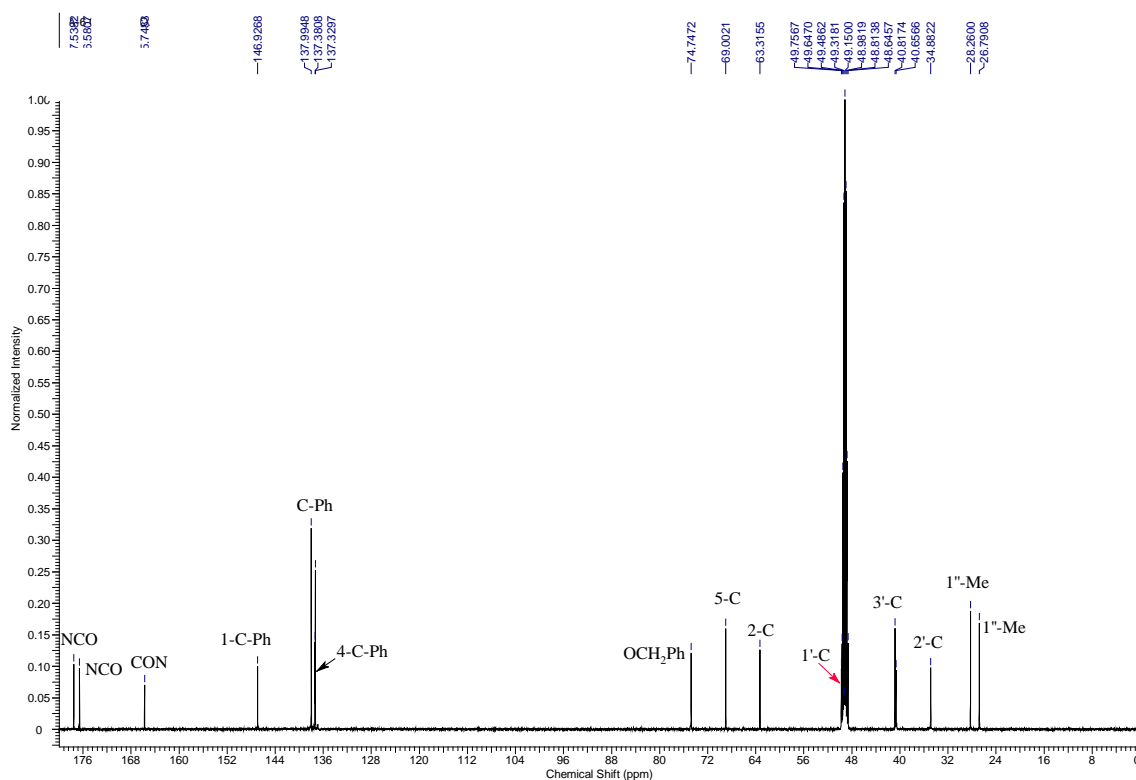
**Tabla 1.** Explicación de las señales <sup>1</sup>H-RMN (ppm) compuesto (10).

### $^{13}\text{C}$ -RMN (10)



10

### (3'-((2S,5S)-5-isopropil-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo



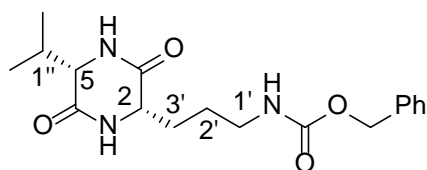
| Señal $^{13}\text{C}$ -RMN (ppm)  | Explicación  |
|-----------------------------------|--|
| 26.8<br>( $\text{CH}_3$ , 1''-Me) | Señal $\text{CH}_3$ que corresponde a un carbono alifático. En el HSQC hay correlación en $\delta_{\text{H}}$ 1.64. Se trata de 1''-Me.                      |
| 28.3<br>( $\text{CH}_3$ , 1''-Me) | Señal $\text{CH}_3$ que corresponde a un carbono alifático, en el HSQC tiene correlación en $\delta_{\text{H}}$ 1.75. Se trata de 1''-Me.                    |
| 34.9<br>( $\text{CH}_2$ , 2'-C)   | Señal correspondiente a un carbono alifático, en el experimento HSQC presenta correlación con 2'-H.  |
| 40.7<br>( $\text{CH}_2$ , 3'-C)   | Señal que corresponde a un carbono alifático, en el HSQC se observa correlación con las señales para 3'- $\text{H}_a$ y 3'- $\text{H}_b$ . Se trata de 3'-C. |



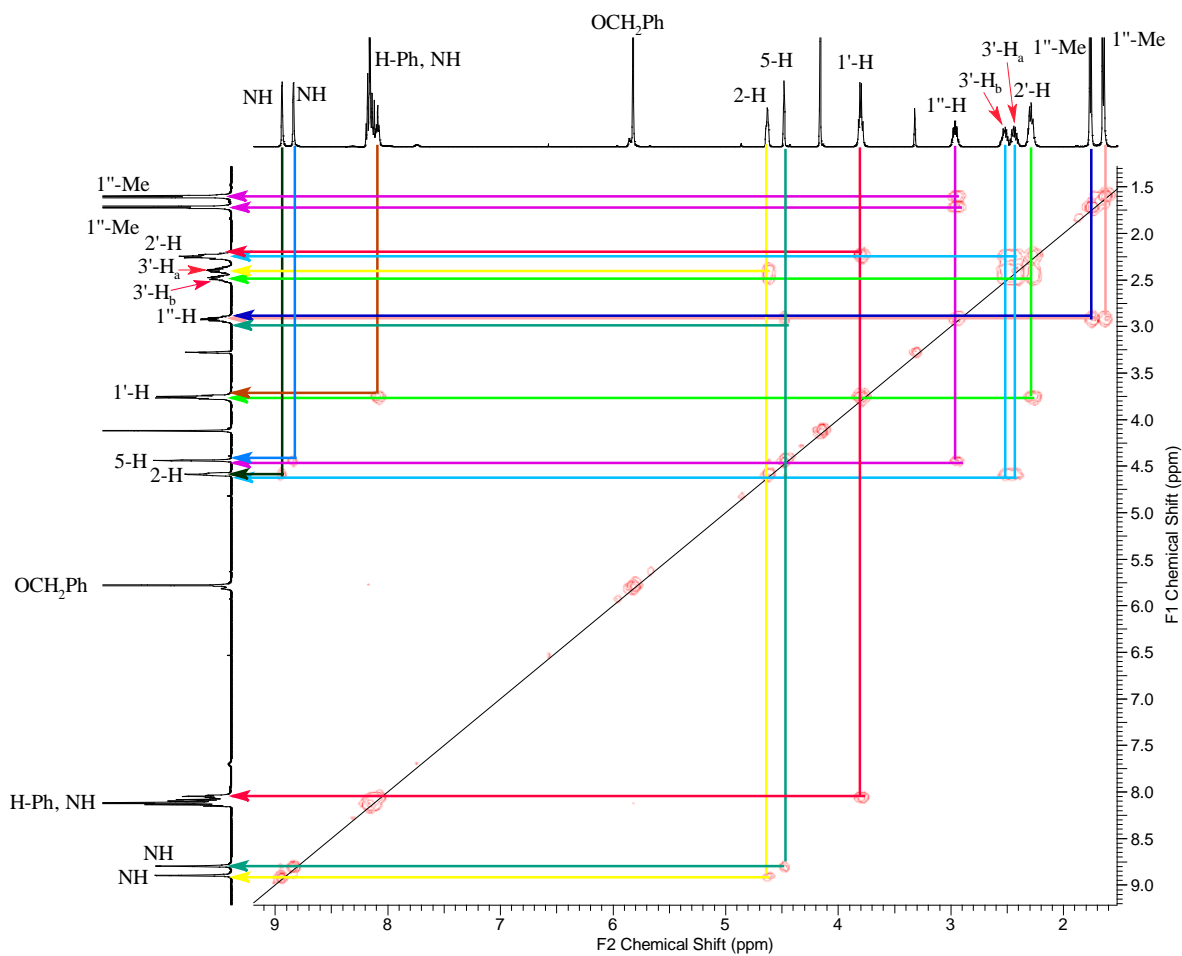
|   |   |
|---|---|
| 40.8<br>(CH <sub>2</sub> , 1''-C)               | Señal que corresponde a un carbono alifático, en el HSQC se observa correlación con 1''-H   |
| 49.8<br>(CH <sub>2</sub> , 1'-C)                | Señal correspondiente un CH <sub>2</sub> unido a heteroátomos, tal como sugiere su desplazamiento químico. Se trata de 1'-C. En el experimento HSQC se correlaciona con δ <sub>H</sub> 3,79 (1'-H).                             |
| 63.3<br>(CH, 2-C)                               | Señal correspondiente a un CH unido a heteroátomo, tal como sugiere su desplazamiento químico. Se trata de un carbono dentro del anillo de DKP, en concreto 2-C. En HSQC se correlaciona con señal a δ <sub>H</sub> 4.62 (2-H). |
| 69.0<br>(CH, 5-C)                               | Señal correspondiente a un CH unido a heteroátomo, tal como sugiere su desplazamiento químico. En HSQC se correlaciona con la señal δ <sub>H</sub> 4.47 (5-H), por lo que se asignó al 5-C.                                     |
| 74.7<br>(CH <sub>2</sub> , OCH <sub>2</sub> Ph) | Señal correspondiente a CH <sub>2</sub> . Su desplazamiento indica que está unido a heteroátomo y se asignó al carbono en posición bencílica. En el experimento HSQC se correlaciona con δ <sub>H</sub> 5.81.                   |
| 137.32<br>(CH, 2 × C-Ph)                        | Señal correspondiente a los dos carbonos del anillo aromático. En el experimento HSQC se correlaciona con el multiplete δ <sub>H</sub> 8.10-8.18 (hidrógenos aromáticos).   |
| 137.38<br>(CH, 4-C-Ph)                          | Señal correspondiente al carbono en posición para del anillo aromático. En el HSQC se correlaciona con el multiplete δ <sub>H</sub> 8.10-8.18 (hidrógenos aromáticos).  |
| 138.0<br>(CH, 2 × C-Ph)                         | Señal correspondiente a los dos carbonos del anillo aromático. En HSQC se correlaciona con el multiplete δ <sub>H</sub> 8.10-8.18 (hidrógenos aromáticos).  |
| 146.9<br>(C, 1-C-Ph)                            | Señal correspondiente a carbono cuaternario del anillo aromático.   |
| 165.7<br>(C, CON)                               | Señal correspondiente a carbono cuaternario. Su desplazamiento sugiere que se trata del carbonilo del grupo bencil carbamato  |
| 176.6<br>(C, NCO)                               | Señal correspondiente a carbono cuaternario. Su desplazamiento sugiere que se trata de un carbonilo (amida) del anillo de DKP.  |
| 177.5<br>(C, NCO)                               | Igual que el anterior.  |

**Tabla 2.** Explicación de las señales <sup>13</sup>C-RMN (ppm) compuesto (10).

## COSY (10)

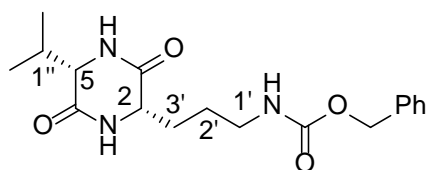


10

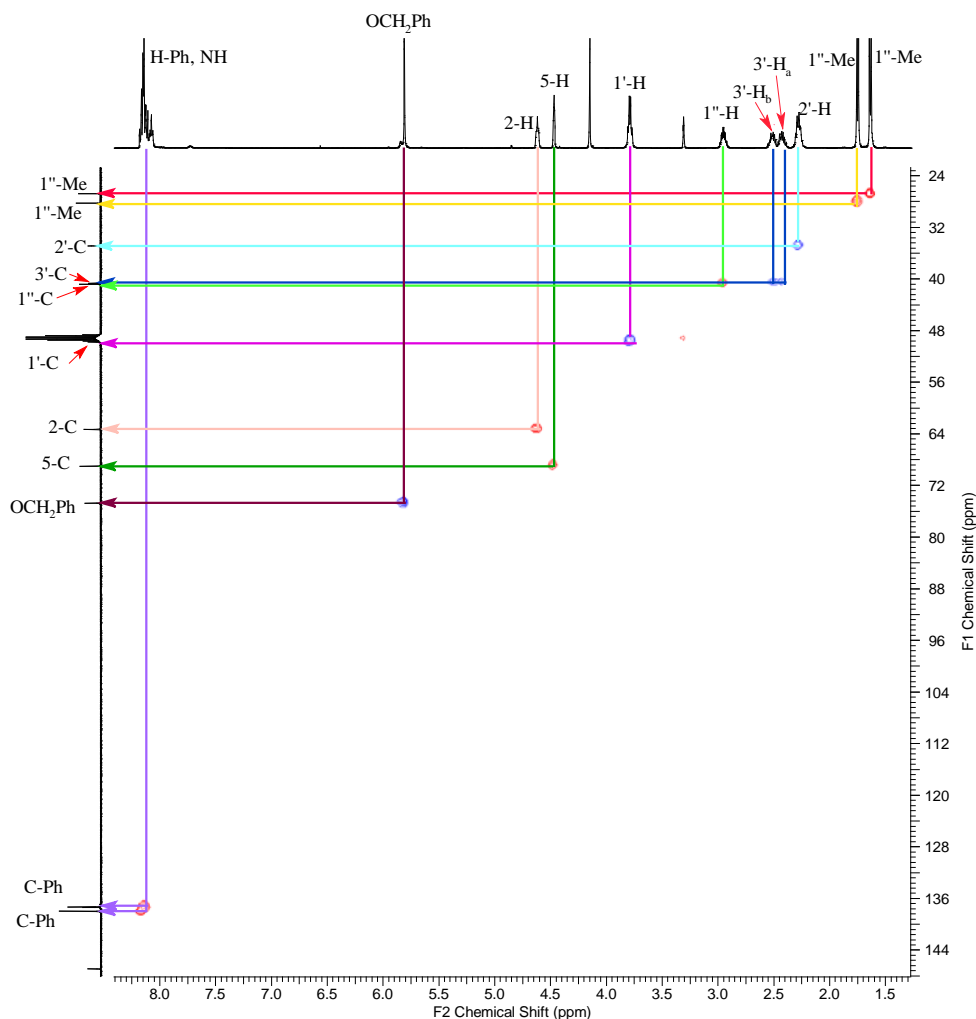


En el experimento COSY se observan las correlaciones entre los protones vecinos, estas aparecen por fuera de la diagonal. Véase por ejemplo que el protón 1''-H (línea morada) presenta correlación con los protones de los dos metilos 1''-Me y con el protón 5-H (flechas moradas); por otro lado, se observa que los dos protones de la posición bencílica no se correlacionan con ninguna otra señal, debido a que carecen de protones vecinos.

## HSQC (10)



10



Las correlaciones halladas mediante el experimento bidimensional HSQC permiten asignar las diferentes uniones entre los protones y los carbonos. A modo de ejemplo, se puede observar que los protones 3'-H<sub>a</sub> y 3'-H<sub>b</sub> se correlacionan con la señal  $\delta_C$  40.7 ppm que corresponde al 3'-C (flecha azul oscuro). Por otro lado, se observa que la señal  $\delta_C$  146.9 ppm no se correlaciona con ningún protón, ello se debe a que al carbono cuaternario que por tanto no está unido ningún protón. Los hidrógenos unidos a los nitrógenos tampoco aparecen correlacionados con ningún carbono.

# MASAS (10)

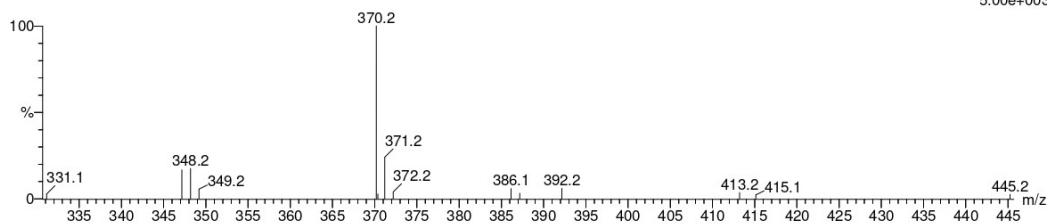
## Elemental Composition Report

Page 1

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0  
Element prediction: Off  
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
1495 formula(e) evaluated with 4 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)  
Elements Used:  
C: 0-60 H: 0-80 N: 0-8 O: 0-20 Na: 0-2  
Carlos  
20220506\_LCT\_XA-6 54 (2.338)

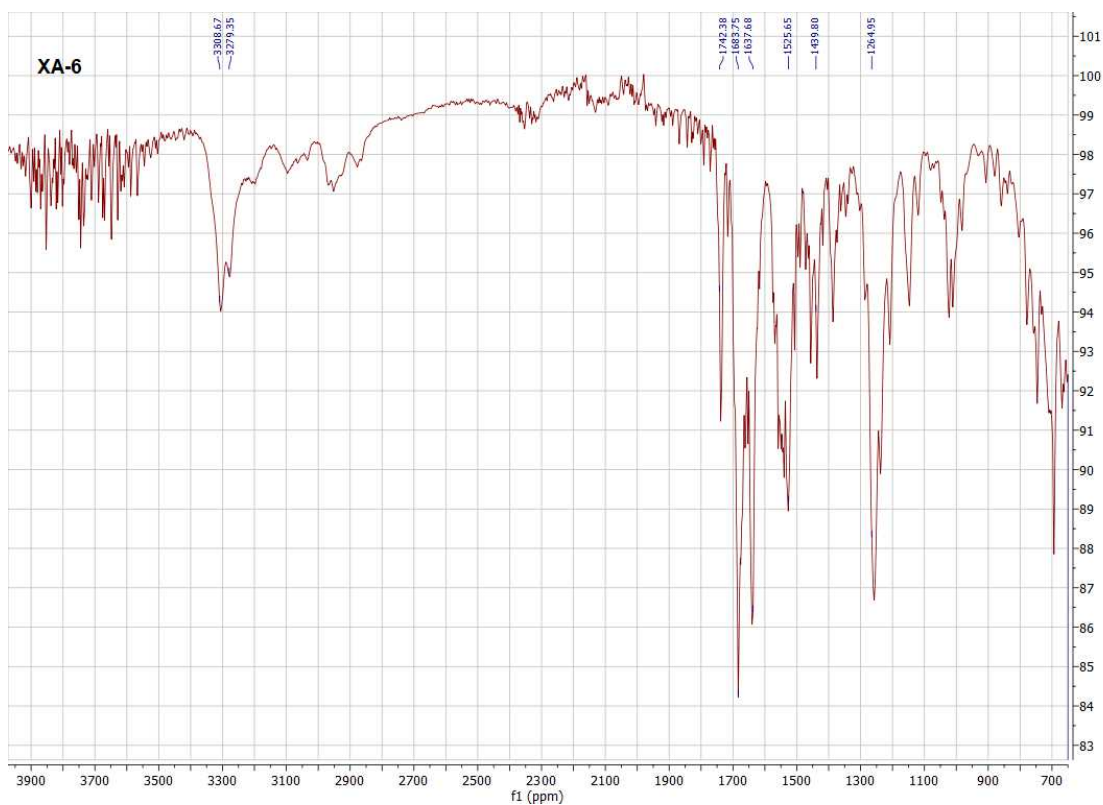
1: TOF MS ES+  
5.00e+003



| Mass     | RA     | Calc. Mass | mDa  | PPM  | DBE  | i-FIT | i-FIT (Norm) | Formula              |
|----------|--------|------------|------|------|------|-------|--------------|----------------------|
| 370.1746 | 100.00 | 370.1759   | -1.3 | -3.5 | 8.5  | 19.3  | 0.4          | C21 H26 N O2         |
|          |        | 370.1743   | 0.3  | 0.8  | 7.5  | 20.6  | 1.7          | Na2<br>C18 H25 N3 O4 |
|          |        | 370.1756   | -1.0 | -2.7 | 12.5 | 20.7  | 1.9          | Na<br>C19 H21 N7 Na  |
|          |        | 370.1732   | 1.4  | 3.8  | 9.5  | 23.8  | 4.9          | C17 H22 N7 Na2       |

La masa calculada es 370.1743 y la encontrada fue 370.1746, existe una buena correlación.

## IR (10)



Presenta señales en 3309 y 3279 cm<sup>-1</sup> (NH) junto a 1742, 1684 y 1637 cm<sup>-1</sup> (C=O).

## PUNTO DE FUSIÓN Y ACTIVIDAD ÓPTICA (10)

Al tratarse de un sólido cristalino que cristalizó en metanol, se procede a averiguar su punto de fusión, el cual es de 204–205 °C.

El valor obtenido para la actividad óptica:  $[\alpha]_D = -14$  (c 0.42, DMSO) a 25°C.

## Screening antimicrobiano

Se preparó una concentración aproximada de 100  $\mu\text{M}$  final para los compuestos **(11)**, **(13)** y **(14)**, que se enfrentaron a *Staphylococcus aureus* y a *Escherichia coli* en medio líquido LB. Se muestran en **Tabla 3** los resultados de la lectura de absorbancia de la placa con los cultivos y los blancos, además de otro blanco para el DMSO con el fin de distinguir entre el efecto del DMSO en la bacteria y el de nuestro compuesto.

| <i>E. coli</i>   |       |        |       |       |       |                  |
|------------------|-------|--------|-------|-------|-------|------------------|
| BLANCO           |       | (DMSO) | (11)  | (13)  | (14)  | (Medio+Bacteria) |
| 0.240            | 0.258 | 1.180  | 1.160 | 1.083 | 1.111 | 1.137            |
| 0.240            | 0.257 | 1.158  | 1.160 | 1.118 | 1.123 | 1.177            |
| 0.258            | 0.258 | 1.165  | 1.160 | 1.134 | 1.097 | 1.27             |
| 0.255            | 0.234 | 1.101  |       |       |       | 1.243            |
| <i>S. aureus</i> |       |        |       |       |       |                  |
| BLANCO           |       | (DMSO) | (11)  | (13)  | (14)  | (Medio+Bacteria) |
| 0.224            | 0.239 | 0.679  | 0.876 | 0.75  | 0.557 | 0.805            |
| 0.250            | 0.247 | 0.730  | 0.864 | 0.508 | 0.591 | 0.795            |
| 0.242            | 0.242 | 0.796  | 0.85  | 0.522 | 0.621 | 0.855            |
| 0.247            | 0.233 | 0.930  |       |       |       | 0.3608           |

**Tabla 3.**

Para *E. coli*, los resultados muestran una absorbancia media del BLANCO de 0.25; una absorbancia media para (Medio+Bacteria) de 1.206; y para **(DMSO)** de 1.151, que consideramos este último como otro producto con su propia actividad biológica y lo diferenciamos así del efecto atribuible a los compuestos testados. Los resultados de la media para los productos **(11)**, **(13)** y **(14)** fueron, respectivamente, 1.16, 1.111 y 1.11. El tratamiento de estos datos consiste en restar la absorbancia media del BLANCO a las absorbancias medias del resto de lecturas, para eliminar la correspondiente al medio de cultivo. Al valor obtenido de la resta de las medias de BLANCO y (Medio+Bacteria) lo tomamos como el 100% de población bacteriana y se calculó el porcentaje de población en el resto de los pocillos, mostrados en **Tabla 4** y **Tabla 5**.

| <i>E.coli</i>           |             |               |                |                         |
|-------------------------|-------------|---------------|----------------|-------------------------|
|                         | Absorbancia | Población (%) | Inhibición (%) | Inhibición sin DMSO (%) |
| (Medio+Bacteria)-Blanco | 0.956       | 100           | 0              |                         |
| <b>(11)</b> - BLANCO    | 0.91        | 95.18         | 4.82           | 0                       |
| <b>(13)</b> - BLANCO    | 0.861       | 90.06         | 9.94           | 4.18                    |
| <b>(14)</b> - BLANCO    | 0.86        | 89.96         | 10.04          | 4.28                    |
| <b>(DMSO)</b> -Blanco   | 0.901       | 94.24         | 5.76           |                         |

**Tabla 4.**

Para *S. aureus* las medias de las absorbancias en el mismo orden expuesto anteriormente fueron: 0.24, 0.818 y 0.783 para los Blancos; y, 0.863, 0.593 y 0.589 para los compuestos. Se muestran los valores finales de población e inhibición tras restar el blanco.

| <i>S. aureus</i>        |             |               |                |                         |
|-------------------------|-------------|---------------|----------------|-------------------------|
|                         | Absorbancia | Población (%) | Inhibición (%) | Inhibición sin DMSO (%) |
| (Medio+Bacteria)-Blanco | 0.578       | 100           | 0              |                         |
| <b>(11)</b> - BLANCO    | 0.623       | 107.78        | -7.78          | 0                       |
| <b>(13)</b> - BLANCO    | 0.353       | 61.07         | 38.93          | 32.87                   |
| <b>(14)</b> - BLANCO    | 0.349       | 60.38         | 39.62          | 33.56                   |
| <b>(DMSO)</b> -Blanco   | 0.543       | 93.94         | 6.06           |                         |

**Tabla 5.**

Se observa en el caso de *E. coli* que ningún compuesto presentó una actividad antimicrobiana significativamente relevante, todos por debajo del 5% de inhibición. Para *S. aureus* los compuestos **(13)** y **(14)** consiguieron mostrar una reducción de la población por encima del 30%.

# Materiales y Métodos

## Técnicas experimentales generales

- Resonancia Magnética Nuclear



- Espectroscopía Infrarroja



ATR



Dialpath



- Espectrometría de Masas

Espectrómetro modelo LCT Premier XE de Micromass, utilizando la técnica de electrospray (ESI).



- Punto de fusión

Bibby-Stuart modelo SMP10, con capilares de 100 mm de longitud y 1.3 mm de diámetro interno.



- Actividad óptica

Polarímetro MCP 150 Anton Paar.



## Técnicas cromatográficas

### - Cromatografía en capa fina

Para la comprobación y seguimiento de los productos obtenidos en las reacciones se realizaron cromatografías en capa fina en gel de sílice Merck (60F254 de 0,25 mm) aplicando diferentes eluyentes específicos para cada producto. Se empleó luz UV de 254 nm para su observación preliminar y posteriormente un revelado con disolución de permanganato potásico con la aplicación de calor con decapador hasta la aparición de manchas decoloradas, indicando la presencia de nuestro producto.

### - Cromatografía en columna de gel de sílice

La separación y purificación se llevó a cabo con cromatografías en columna de gel de sílice, empleando el eluyente apropiado para cada compuesto. Se fueron tomando fracciones en viales y corroborando la presencia del compuesto con cromatografías de capa fina.

## Actividades antimicrobianas

### - Cabina de flujo laminar

Telstar Bio II Advanced.



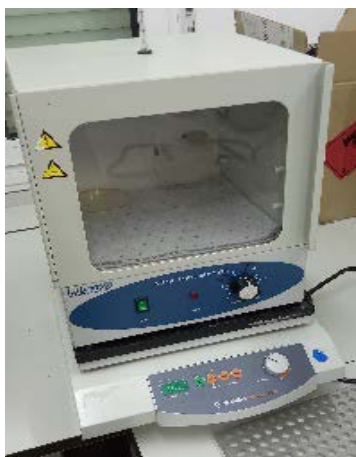
### - Lector de microplacas multimodo

BMG Labtech tipo FLUOstar Omega, empleado para la medición de la absorbancia de los diferentes pocillos.



- Incubadora y Agitador

Mini Incubator Labnet sobre agitador Unimax 1010 Heidolph.



## Procedimiento sintético

### 1. Procedimiento general de síntesis de dipéptidos

En un matraz se añade Boc-Orn(Z)-OH (2565 mg, 7 mmoles) y H-aa-OMe (8.4 mmoles) y se disuelven en DCM (30 mL). Luego se añade el HBTU (3184 mg, 8.4 mmoles) y se enfría a 0°C con un baño de hielo-agua. Por último, se añade DIPEA (2.9 mL, 16.8 mmoles) se agita 1h a 0°C y otras 16h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vierte en un embudo de extracción y se lava con HCl al 10 % tres veces y con NaHCO<sub>3</sub> otras tres veces. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra, se concentra a vacío. Finalmente, el residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexanos/AcOEt obteniéndose los dipéptidos.

## 2. Procedimiento general de síntesis de 2,5-dicetopiperazinas

El dipéptido Boc-Orn(Cbz)-aa-OMe (6 mmoles) se disuelve en el ácido fórmico (40 mL) y se agita a temperatura ambiente 16h. Tras comprobar por CCF que no queda producto de partida se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en el 2-butanol (20 mL), se añade el tolueno (80 mL) y se calienta a reflujo durante 16h. Se forma un producto sólido que se filtra y se lava con metanol obteniéndose las dicetopiperazinas.

## 3. Procedimiento general de desprotección del grupo bencil carbamato (Cbz)

A una solución de la dicetopiperazina (5 mmoles) en MeOH (30 mL) se añade 150 mg de Pd/C al 10% y se agita bajo atmósfera de hidrógeno. Tras comprobar por CCF que no queda producto de partida, se filtra sobre celita para obtener la dicetopiperazina con el grupo amina libre.

## Procedimiento experimental del Screening antimicrobiano

Para este experimento se empleó una placa de 96 pocillos de fondo plano para cada bacteria a estudiar, *E. coli* (CECT 434) y *S. aureus* (CECT 794), empleándose 25 pocillos en cada una de ellas para el estudio de la posible actividad antibacteriana de **(11)**, **(13)** y **(14)**, que corresponden con los derivados de DKP con residuos de leucina, serina y fenilalanina. Se escogieron los compuestos con estos residuos debido a su diferente naturaleza química, teniendo el compuesto **(11)** un residuo alquilo; el **(13)** un grupo polar, hidroxilo; y el **(14)** un residuo con un anillo aromático.

Se tomó un cultivo de bacterias en fase de meseta, tomando de base aproximado de  $10^9$  bacterias/mL, se tomaron 100  $\mu$ L y se añadieron a 900  $\mu$ L de suero fisiológico 0.9%, y repitiéndose este proceso 3 veces más, llegando a diluir hasta  $10^5$  bacterias/mL. Más adelante se desarrollará esta suposición.

Se pesaron 0.01 milimoles de cada compuesto en un Eppendorf y se disolvieron en 1 mL de DMSO esterilizado en autoclave, consiguiendo una concentración de  $10^4$   $\mu$ M.

De esta disolución se toman 8  $\mu$ L y se llevan a otro Eppendorf al que se le añade 392  $\mu$ L de medio LB, obteniendo una concentración de 200  $\mu$ M, no obstante, esta concentración pasará a ser de 100  $\mu$ M una vez dispuesto ya el producto en los pocillos debido a la

dilución resultante al mezclar 100  $\mu\text{L}$  de producto con 50  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 50  $\mu\text{L}$  de medio con bacterias.

En cuanto a la medición del efecto en sí del DMSO sobre el crecimiento bacteriano, se procedió a evaluarlo por separado para diferenciarlo del efecto propio de nuestros productos. Para ello, se tomaron 8  $\mu\text{L}$  de DMSO y se llevaron a un Eppendorf al que se le añade 392  $\mu\text{L}$  de medio LB., al igual que anteriormente se realizó con los productos.

El llenado de pocillos se dividió de la siguiente manera: 8 pocillos para la medición del BLANCO, con 200  $\mu\text{L}$  de medio LB; 4 pocillos para el control del crecimiento bacteriano, con 150  $\mu\text{L}$  de medio LB y 50  $\mu\text{L}$  de medio con bacterias; 4 pocillos para el control del efecto del DMSO, con 50  $\mu\text{L}$  de medio LB, 50  $\mu\text{L}$  de medio con bacterias y 100  $\mu\text{L}$  de medio con DMSO; 3 pocillos para el estudio de cada producto, con 50  $\mu\text{L}$  de medio LB, 50  $\mu\text{L}$  de medio con bacterias y 100  $\mu\text{L}$  de medio con producto. Posteriormente, la placa se dejó incubar durante 18 horas a 37°C.

Para conocer el número de bacterias empleadas en este experimento se realizaron siembras en césped en medio LB sólido en placas de Petri de diluciones seriadas de cada cultivo inicial de bacterias, como se explica a continuación.

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del cultivo con una cantidad aproximada de  $10^5$  bacterias y se llevaron a 10 mL con suero fisiológico obteniéndose, tras agitar con vórtex, la primera dilución ( $10^{-2}$ ); de ésta se tomó 1 mL y se completó con suero fisiológico hasta los 10 mL, obteniéndose, tras agitar con vórtex, la segunda dilución ( $10^{-3}$ ); por último, se repite este último paso obteniéndose la tercera dilución ( $10^{-4}$ ).

De las tres diluciones se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron en césped en placas con medio LB, y se dejaron incubar durante 18 horas a 37°C. Por último, se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias de cada placa, obteniéndose los datos para cada bacteria recogidos en la **Tabla 6**.

| <i>E. coli</i>   |     | <i>S. aureus</i> |     |
|------------------|-----|------------------|-----|
| Dilución         | UFC | Dilución         | UFC |
| 10 <sup>-2</sup> | 143 | 10 <sup>-2</sup> | 38  |
| 10 <sup>-3</sup> | 16  | 10 <sup>-3</sup> | 6   |
| 10 <sup>-4</sup> | 3   | 10 <sup>-4</sup> | 0   |

**Tabla 6.**

Por tanto, se aproxima que para *E. coli* se empleó una concentración de 10<sup>5</sup> bacterias/mL y para *S. aureus* 10<sup>4</sup> bacterias/mL.

## Conclusiones

Se ha preparado una quimioteca de dicetopiperazinas de valina, leucina, serina, alanina y fenilalanina combinados con ornitina, con buenos rendimientos. Se estudió la actividad antimicrobiana de los mismos con bacterias Gram (+) y Gram (-). La actividad antimicrobiana fue baja, lo cual se atribuye a que el grupo ornitina estaba protegido. Se observó que las DKP con residuos de serina y fenilalanina son los que presentaron mejor resultados, frente a la bacteria Gram (+) *S. aureus*. Las pruebas biológicas serán completadas en un futuro.

En cuanto a la síntesis, se ha logrado obtener la mayoría de los distintos derivados de DKP con un buen rendimiento. Sin embargo, debe mejorarse el proceso de hidrogenación para obtener los compuestos sin el grupo protector Cbz, ya que la amina libre de la ornitina podría ser necesaria para la actividad antimicrobiana.

## Bibliografía

1. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*. 2018; 26(10): 2700–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
2. Bajusz S. Structure and function relationships among synthetic enkephalin analogues. En: *Hormonally Active Brain Peptides*. Boston, MA: Springer US; 1982. p. 1–24. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9248-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9248-8_1)
3. Fischer E, Raske K. Beitrag zur Stereochemie der 2,5-Diketopiperazine. *Ber Dtsch Chem Ges*. 1906; 39(4): 3981–95. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/cber.19060390479>
4. Li L, Yang M, Luo J, Qu Q, Chen Y, Liang L, et al. Nematode-trapping fungi and fungus-associated bacteria interactions: the role of bacterial diketopiperazines and biofilms on *Arthrobotrys oligospora* surface in hyphal morphogenesis: Bacterial DKPs and biofilms on *A. oligospora* morphogenesis. *Environ Microbiol*. 2016; 18(11): 3827–39. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13340>
5. Kang H, Ku S-K, Choi H, Bae J-S. Three diketopiperazines from marine-derived bacteria inhibit LPS-induced endothelial inflammatory responses. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26(8): 1873–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.030>
6. Feni L, Jütten L, Parente S, Piarulli U, Neundorf I, Diaz D. Cell-penetrating peptides containing 2,5-diketopiperazine (DKP) scaffolds as shuttles for anti-cancer drugs: conformational studies and biological activity. *Chem Commun*. 2020; 56(42): 5685–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/D0CC01490G>
7. Milne PJ, Kilian G. The properties, formation, and biological activity of 2,5-diketopiperazines. *Comprehensive Natural Products II*. 2010; 5: 657–98. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00716-4>
8. Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(17): 7253–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1006740108>

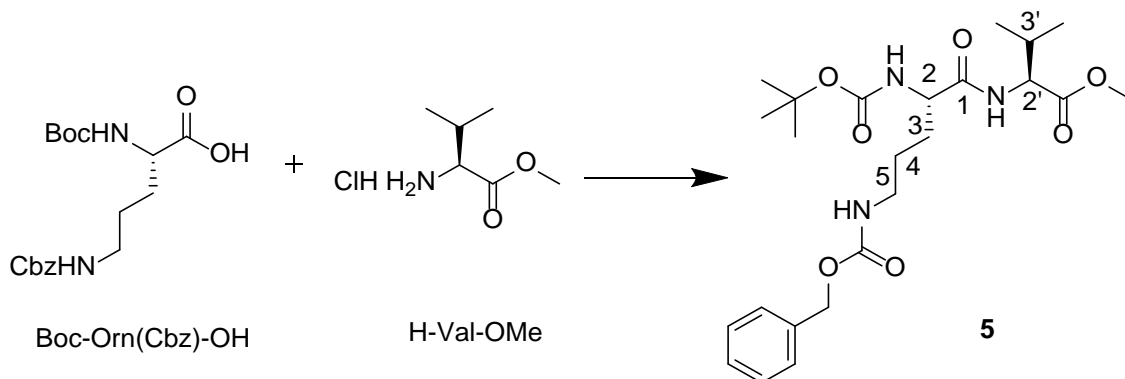


9. Giessen TW, Marahiel MA. Rational and combinatorial tailoring of bioactive cyclic dipeptides. *Front Microbiol.* 2015; 6: 785. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00785>
10. Scharf DH, Heinekamp T, Remme N, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(2): 467–72. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3689-1>
11. Balibar CJ, Walsh CT. GliP, a multimodular nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus*, makes the diketopiperazine scaffold of gliotoxin. *Biochemistry.* 2006; 45(50): 15029–38. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bi061845b>
12. Patteson JB, Cai W, Johnson RA, Santa Maria KC, Li B. Identification of the biosynthetic pathway for the antibiotic bicyclomycin. *Biochemistry.* 2018; 57(1): 61–5. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00943>
13. Nishanth Kumar S, Mohandas C, Siji JV, Rajasekharan KN, Nambisan B. Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi. *J Appl Microbiol.* 2012; 113(4): 914–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05385.x>
14. Furukawa T, Akutagawa T, Funatani H, Uchida T, Hotta Y, Niwa M, et al. Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(6): 2002–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.01.050>
15. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. [consultado en mayo 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>
16. Boto A, Pérez de la Lastra JM, González CC. The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules.* 2018; 23(2): 311. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules23020311>
17. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev.* 2009; 38(2): 606–31. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/B701677H>
18. Nitecki DE, Halpern B, Westley JW. Simple route to sterically pure diketopiperazines. *J Org Chem.* 1968; 33(2) :864–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jo01266a091>

19. Koirala D, Mistry S, Wenthold PG. Participation of C-H protons in the dissociation of a proton deficient dipeptide. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2017; 28(7): 1313–23. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1662-7>

## Anexos

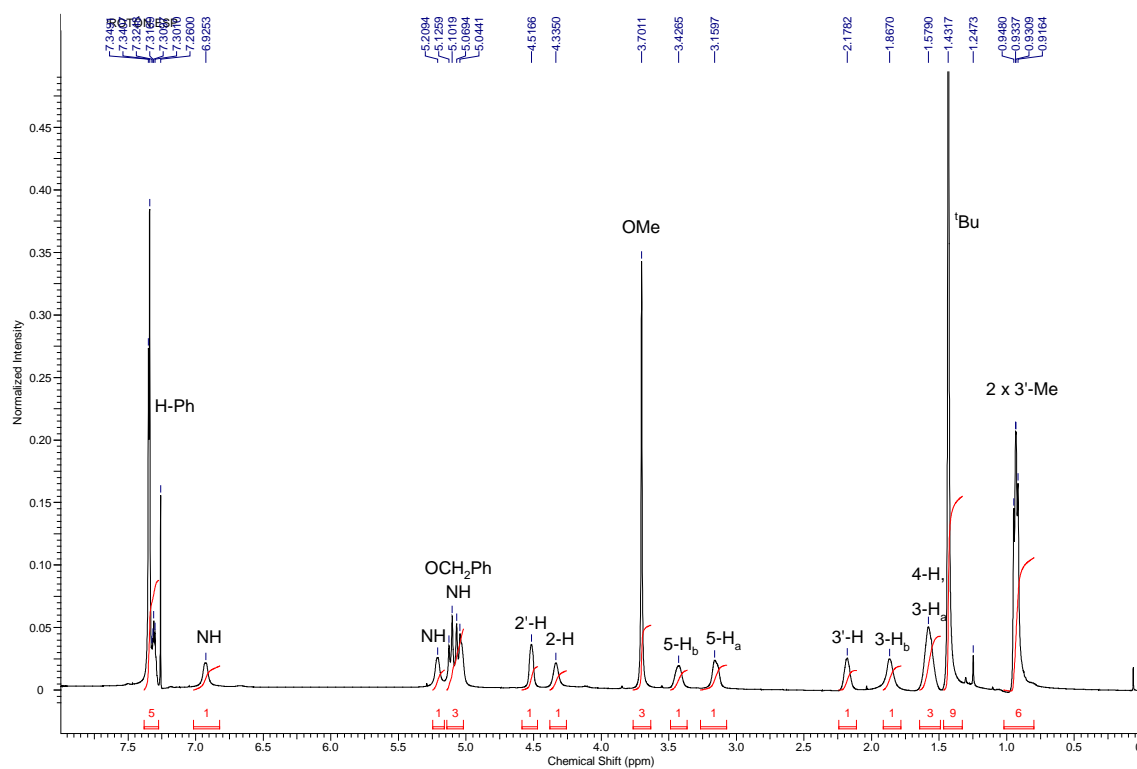
### ((S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((tertbutoxicarbonil)amino)pentanoil)-L-valinato de metilo (**5**)



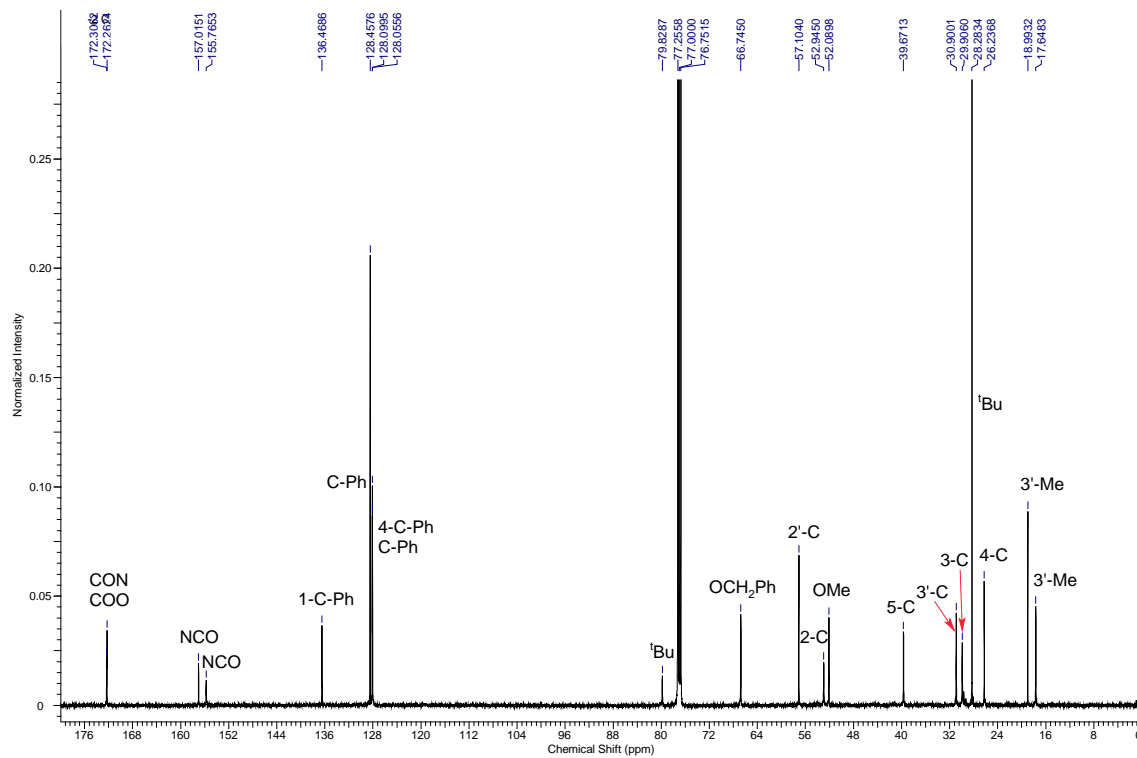
Sintetizado a partir del de H-Val-OMe comercial siguiendo el procedimiento general de síntesis de dipéptidos, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/AcOEt, 1:1), obteniéndose el dipéptido (**5**) (3219 mg; 96%).

|  |
|--|
| Líquido. $[\alpha]_D = +7$ ( <i>c</i> 0.35, CHCl <sub>3</sub> ) a 25°C.  |
| <b>IR</b> (CHCl <sub>3</sub> ) $\nu_{\text{máx}}$ 3442, 3330 (NH), 1704, 1677 (C=O) cm <sup>-1</sup> .   |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)</b> $\delta_H$ 0.92 (3H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3'-Me), 0.94 (3H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3'-Me), 1.43 (9H, s, <sup>t</sup> Bu), 1.58 (3H, br. s, 4-H, 3-H <sub>a</sub> ), 1.87 (1H, br. s, 3-H <sub>b</sub> ), 2.18 (1H, br. s, 3'-H), 3.16 (1H, br. s, 5-H <sub>a</sub> ), 3.43 (1H, br. s, 5-H <sub>b</sub> ), 3.7 (3H, s, OMe), 4.33 (1H, br. s, 2-H), 4.52 (1H, br. s, 2'-H), 5.04–5.12 (3H, m, OCH <sub>2</sub> Ph, NH), 5.21 (1H, br. s, NH), 6.92 (1H, br. s, NH), 7.30–7.35 (5H, m, H-Ph).  |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)</b> $\delta_C$ 17.6 (CH <sub>3</sub> , 3'-Me), 19.0 (CH <sub>3</sub> , 3'-Me), 26.2 (CH <sub>2</sub> , 4-C), 28.3 (3 × CH <sub>3</sub> , <sup>t</sup> Bu), 29.9 (CH <sub>2</sub> , 3-C), 30.9 (CH, 3'-C), 39.7 (CH <sub>2</sub> , 5-C), 52.1 (CH <sub>3</sub> , OMe), 52.9 (CH, 2-C), 57.1 (CH, 2'-C), 66.7 (CH <sub>2</sub> , OCH <sub>2</sub> Ph), 79.8 (C, <sup>t</sup> Bu), 128.06 (CH, 4-C-Ph), 128.10 (2 × CH, C-Ph), 128.5 (2 × CH, C-Ph), 136.5 (C, 1-C-Ph), 155.8 (C, NCO), 157.0 (C, NCO), 172,26 (C, CON), 172,31 (C, COO). |
| <b>EMAR (ESI)</b> <i>m/z</i> calculado para C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> [M + Na] <sup>+</sup> 502.2523, encontrado 502,2520.   |

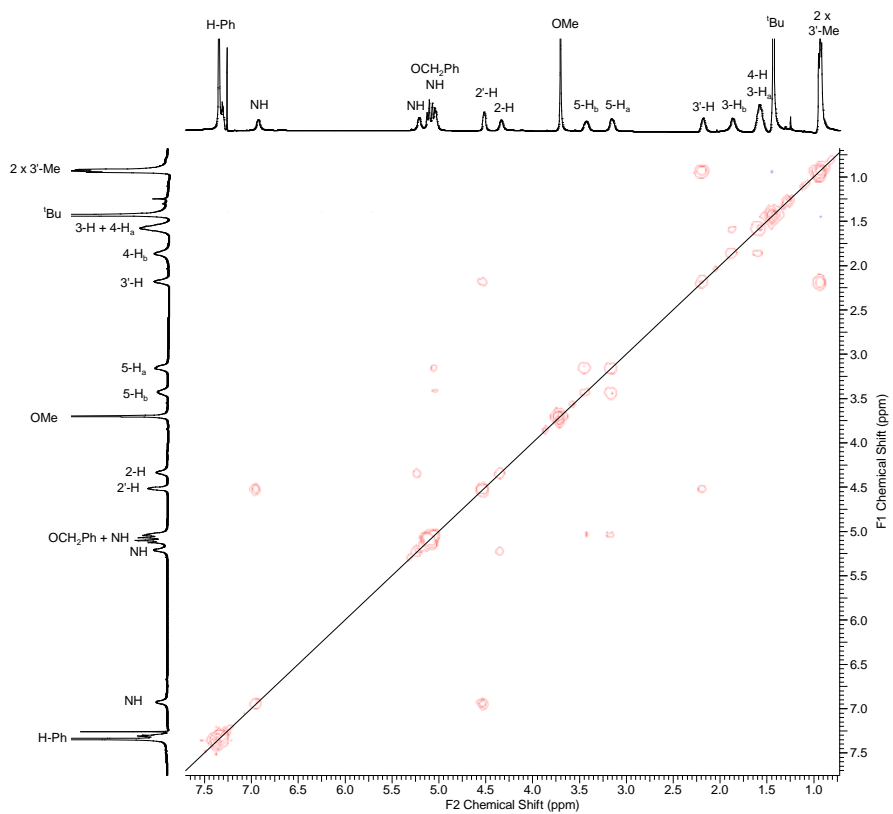
# <sup>1</sup>H-RMN (5)



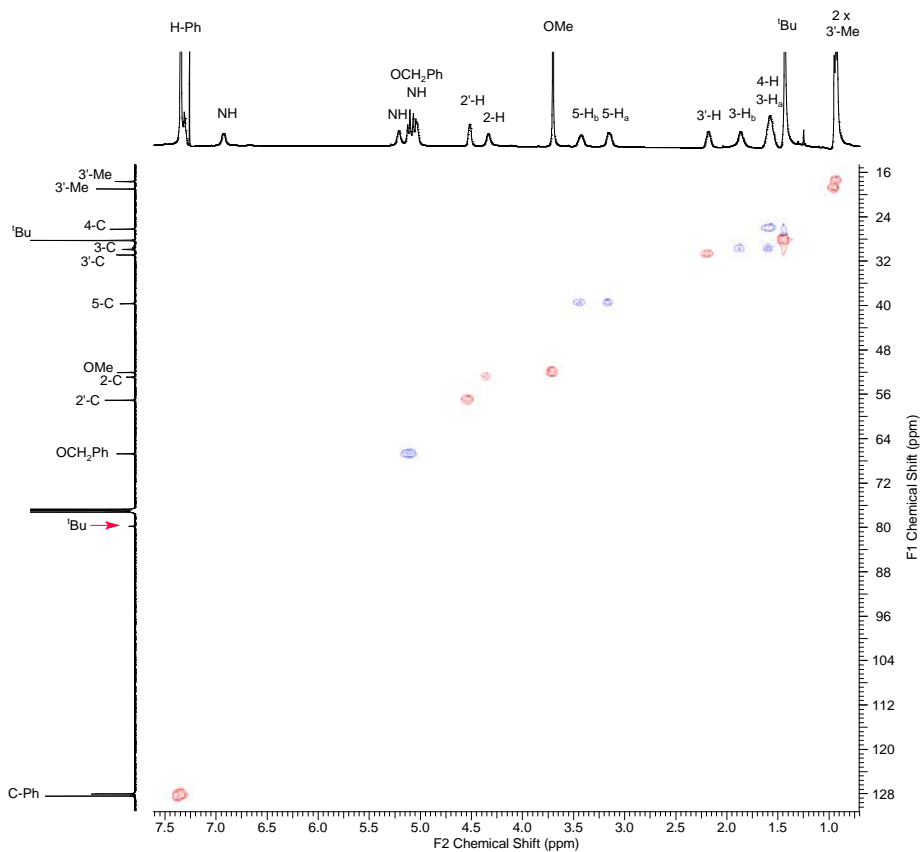
# <sup>13</sup>C-RMN (5)



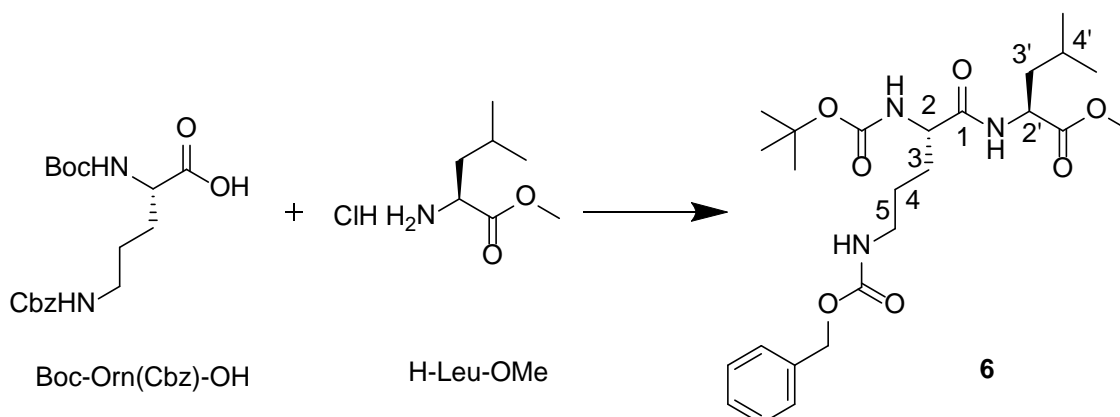
## COSY (5)



## HSQC (5)



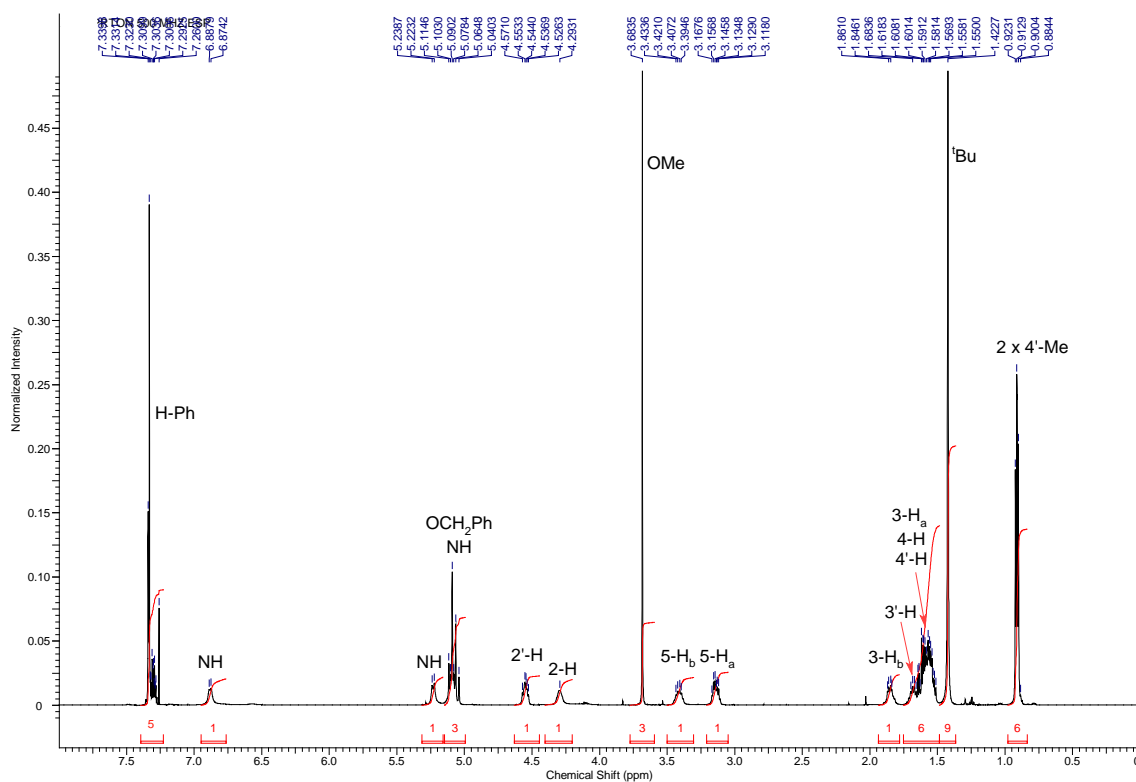
**((S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((tertbutoxicarbonil)amino)pentanoil)-L-leucinato de metilo (6)**



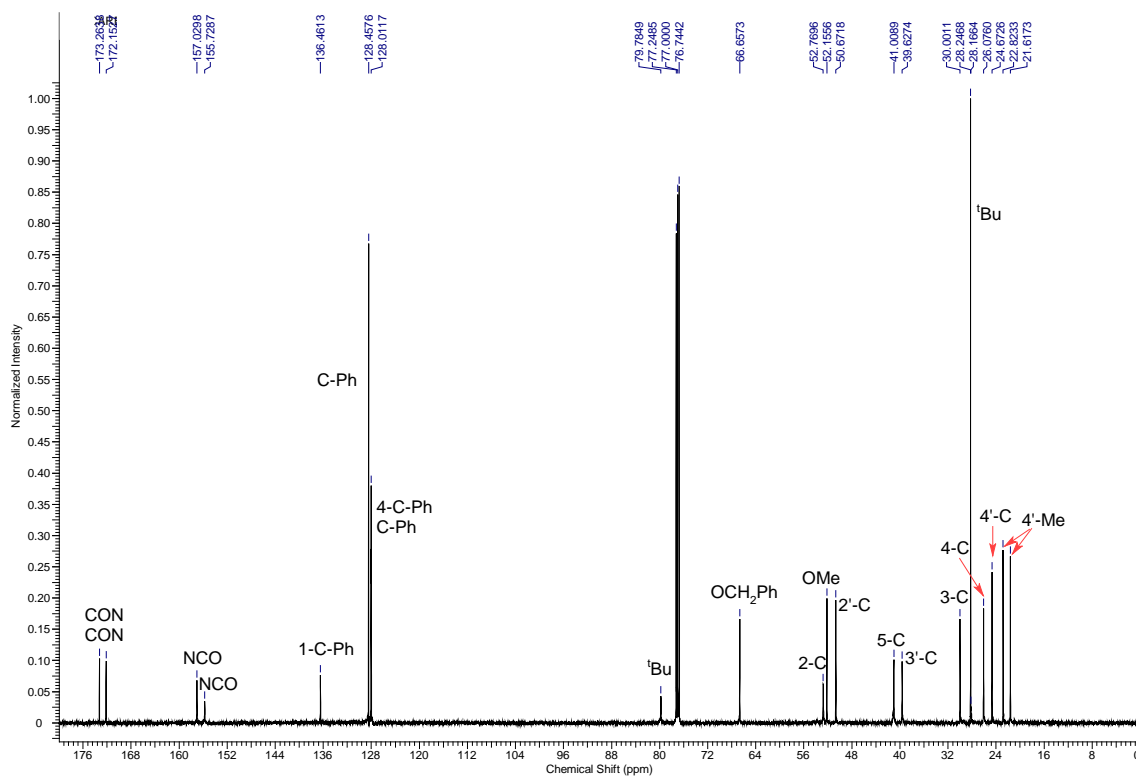
Sintetizado a partir del de H-Leu-OMe comercial siguiendo el procedimiento general de síntesis de dipéptidos, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/AcOEt, 1:1), obteniéndose el dipéptido **(6)** (3381 mg; 98%).

|  |
|--|
| Líquido. $[\alpha]_D = -4$ ( $c$ 0.31, $\text{CHCl}_3$ ) a $25^\circ\text{C}$ .  |
| <b>IR</b> ( $\text{CHCl}_3$ ) $\nu_{\text{máx}}$ 3439, 3323 (NH), 1703, 1680 (C=O) $\text{cm}^{-1}$ .  |
| <b>RMN <math>^1\text{H}</math> (500 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>, <math>25^\circ\text{C}</math>)</b> $\delta_{\text{H}}$ 0.89 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 4'-Me), 0.92 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 4'-Me), 1.42 (9H, s, $^t\text{Bu}$ ), 1.51–1.62 (5H, m, 4-H, 4'-H, 3- $\text{H}_a$ ), 1.68 (1H, m, 3'-H), 1.87 (1H, br. s, 3- $\text{H}_b$ ), 3.13 (1H, m, 5- $\text{H}_a$ ), 3.41 (1H, br. s, 5- $\text{H}_b$ ), 3.68 (3H, s, OMe), 4.29 (1H, br. s, 2-H), 4.54 (1H, m, 2'-H), 5.04–5.11 (3H, m, $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , NH), 5.23 (1H, d, $J = 7.8$ , NH), 6.87 (1H, d, $J = 6.9$ , NH), 7.28–7.33 (5H, m, H-Ph).  |
| <b>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (125,7 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>, <math>25^\circ\text{C}</math>)</b> $\delta_{\text{C}}$ 21.6 ( $\text{CH}_3$ , 4'-Me), 22.8 ( $\text{CH}_3$ , 4'-Me), 24.7 (CH, 4'-C), 26.1 ( $\text{CH}_2$ , 4-C), 28.2 ( $3 \times \text{CH}_3$ , $^t\text{Bu}$ ), 30.0 ( $\text{CH}_2$ , 3-C), 39.6 ( $\text{CH}_2$ , 3'-C), 41.0 ( $\text{CH}_2$ , 5-C), 50.7 (CH, 2'-C), 52.2 ( $\text{CH}_3$ , OMe), 52.8 (CH, 2-C), 66.7 ( $\text{CH}_2$ , $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 79.8 (C, $^t\text{Bu}$ ), 128.01 ( $2 \times \text{CH}$ , C-Ph), 128.04 (CH, 4-C-Ph), 128.5 ( $2 \times \text{CH}$ , C-Ph), 136.5 (C, 1-C-Ph), 155.7 (C, NCO), 157.0 (C, NCO), 172.2 (C, CON), 173.3 (C, COO). |
| <b>EMAR (ESI)</b> $m/z$ calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{NaO}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 516.2680, encontrado 516,2680.  |

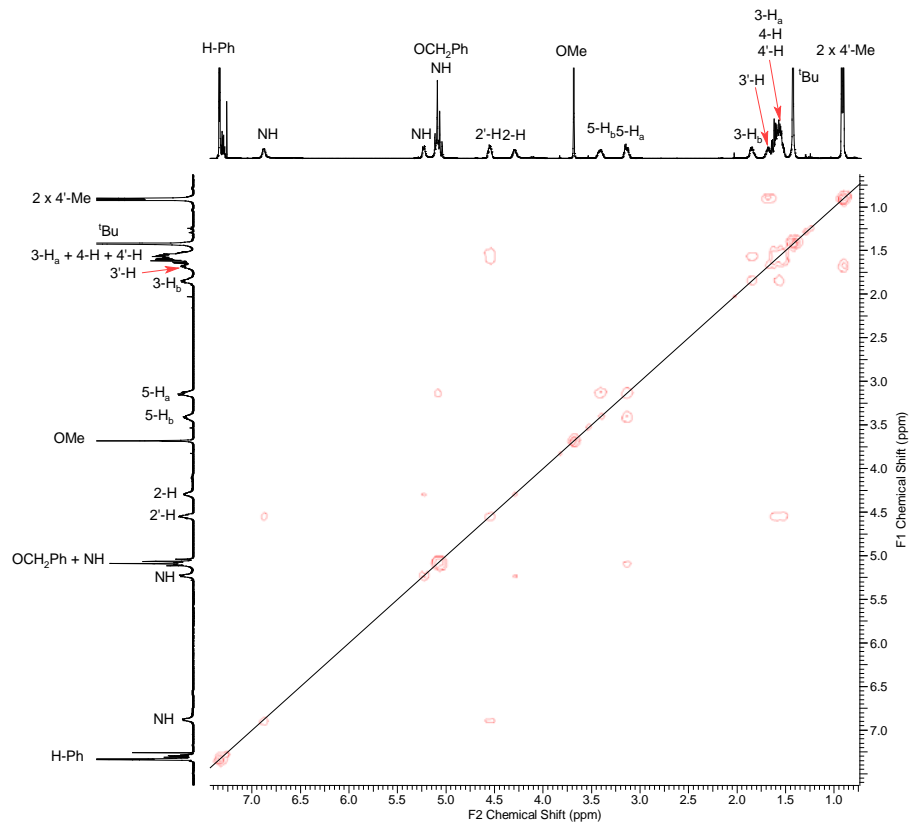
# <sup>1</sup>H-RMN (6)



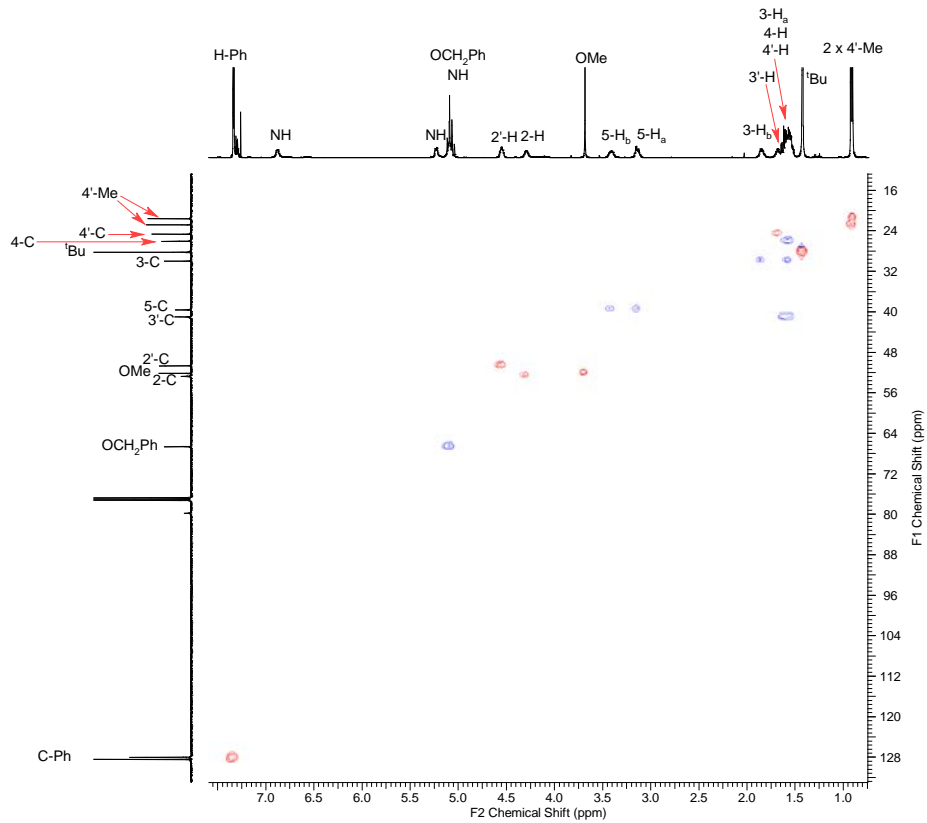
# <sup>13</sup>C-RMN (6)



## COSY (6)

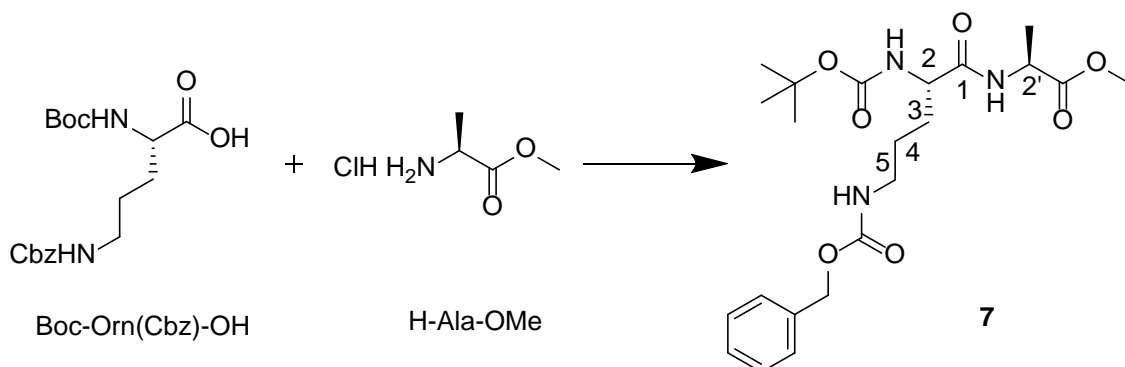


## HSQC (6)





**((S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)pentanoil)-L-alaninato de metilo (7)**



Sintetizado a partir del de H-Ala-OMe comercial siguiendo el procedimiento general de síntesis de dipéptidos, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/AcOEt, 1:1), obteniéndose el dipéptido (**7**) (3062 mg; 97%).

Sólido cristalino. Cristalizó de hexano/AcOEt. p.f. 87-88°C.  $[\alpha]_D = +16$  (c 0.34, CHCl<sub>3</sub>) a 25°C.

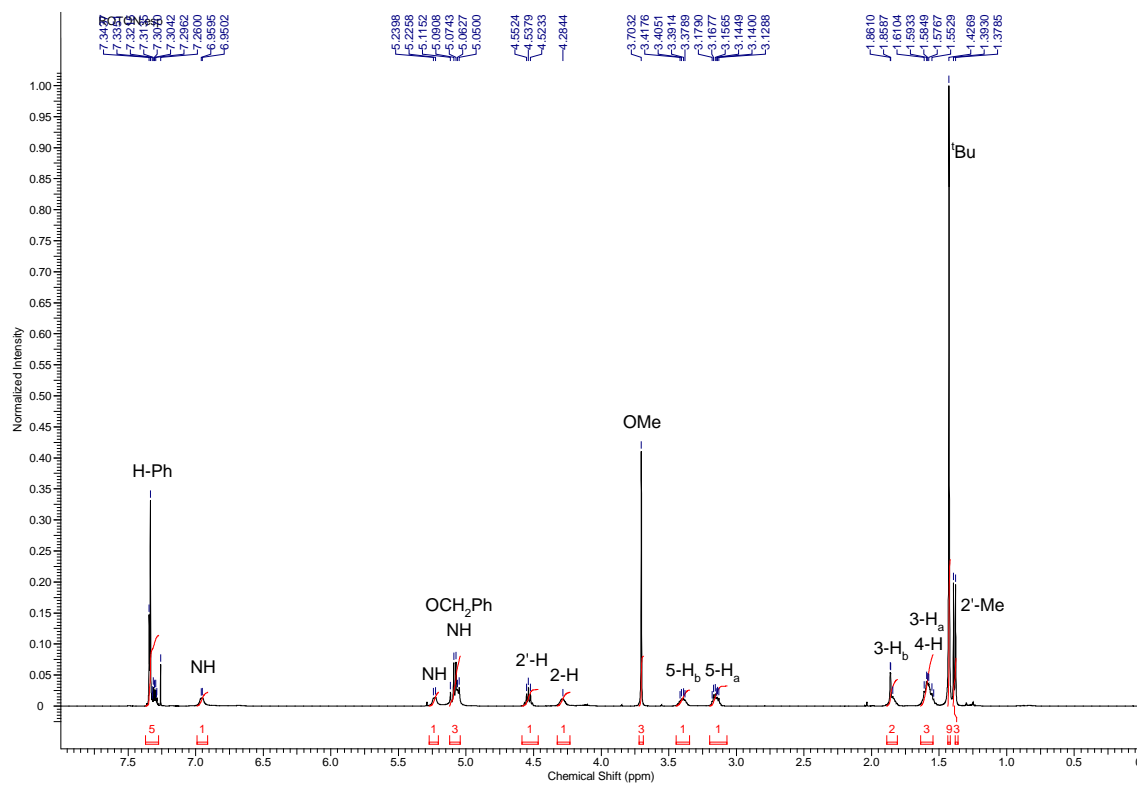
**IR(CHCl<sub>3</sub>)**  $\nu_{\text{máx}}$  3440, 3320 (NH), 1704, 1671 (C=O) cm<sup>-1</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)**  $\delta_H$  1.39 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, 2'-Me), 1.43 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 1.54–1.61 (3H, m, 3-H, 4-H<sub>a</sub>), 1.86 (1H, br. s, 4-H<sub>b</sub>), 3.15 (1H, m, 5-H<sub>a</sub>) 3.4 (1H, m, 5-H<sub>b</sub>), 3.70 (3H, s, OMe), 4.28 (1H, br. s, 2-H), 4.54 (1H, m, 2'-H), 5.05–5.11 (3H, m, OCH<sub>2</sub>Ph, NH), 5.23 (1H, d,  $J = 7$ , NH), 6.95 (1H, d,  $J = 4.7$ , NH), 7.29–7.34 (5H, m, H-Ph).

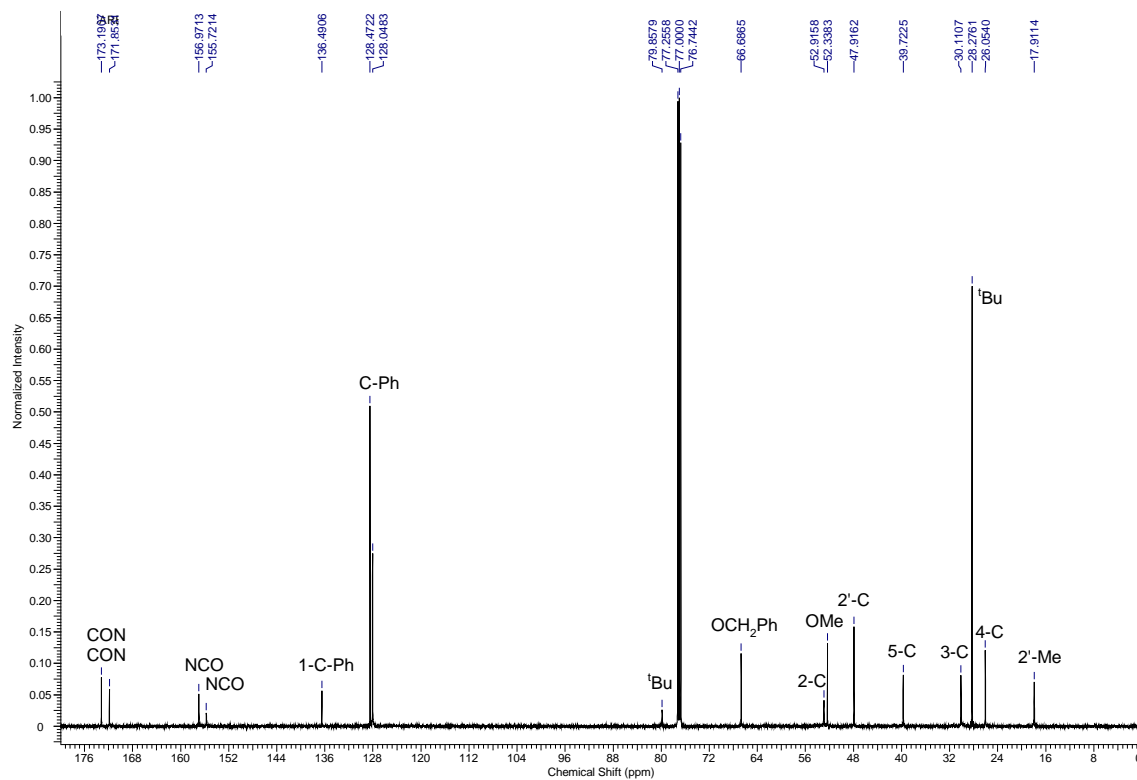
**RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)**  $\delta_C$  17.9 (CH<sub>3</sub>, 2'-Me), 26.1 (CH<sub>2</sub>, 4-C), 28.3 (3 × CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 30.1 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 39.7 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 47.9 (CH, 2'-C), 52.3 (CH, OMe), 52.9 (CH, 2-C), 66.7 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>Ph), 79.8 (C, <sup>t</sup>Bu), 128.0 (2 × CH, C-Ph), 128.5 (3 × CH, C-Ph), 136.5 (C, 1-C-Ph), 155.7 (C, NCO), 157.0 (C, NCO), 171.9 (C, CON), 173.2 (C, COO).

**EMAR (ESI)** m/z calculado para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub> [M + Na]<sup>+</sup>, 474.2211 encontrado 474,2214.

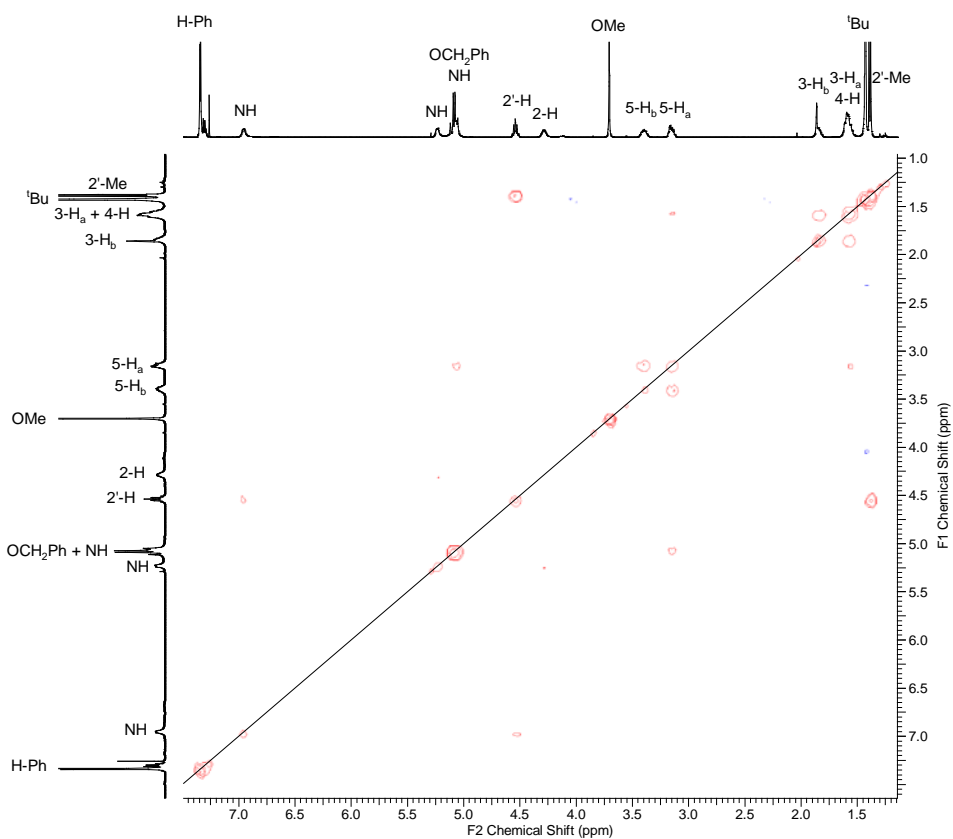
# <sup>1</sup>H-RMN (7)



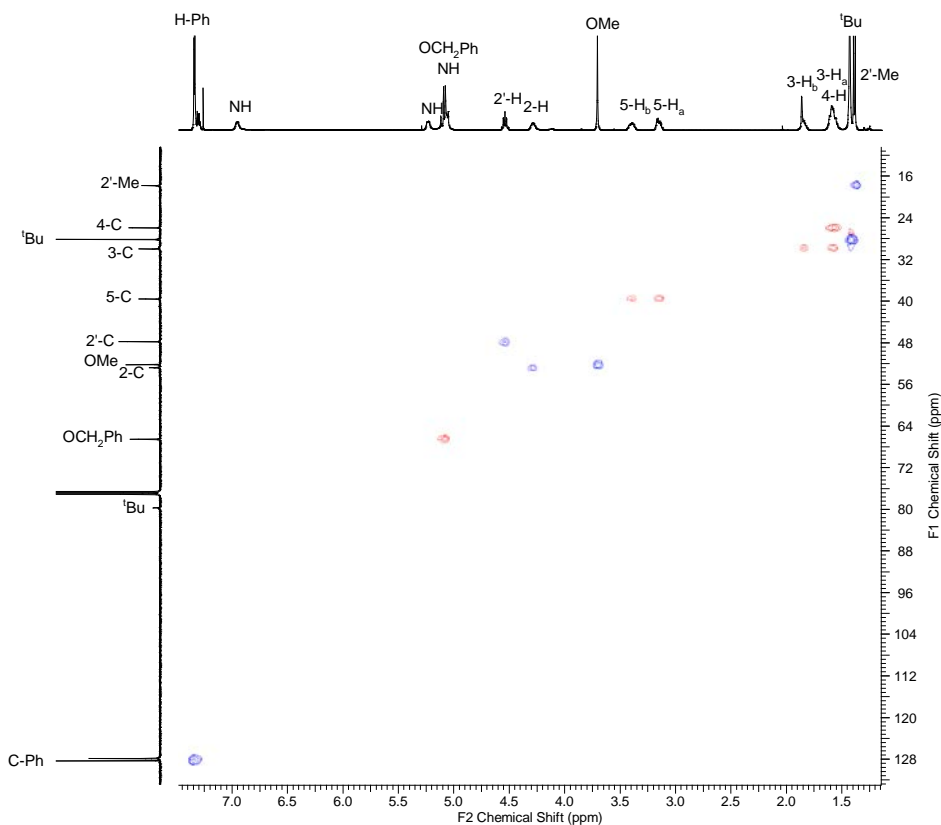
# <sup>13</sup>C-RMN (7)



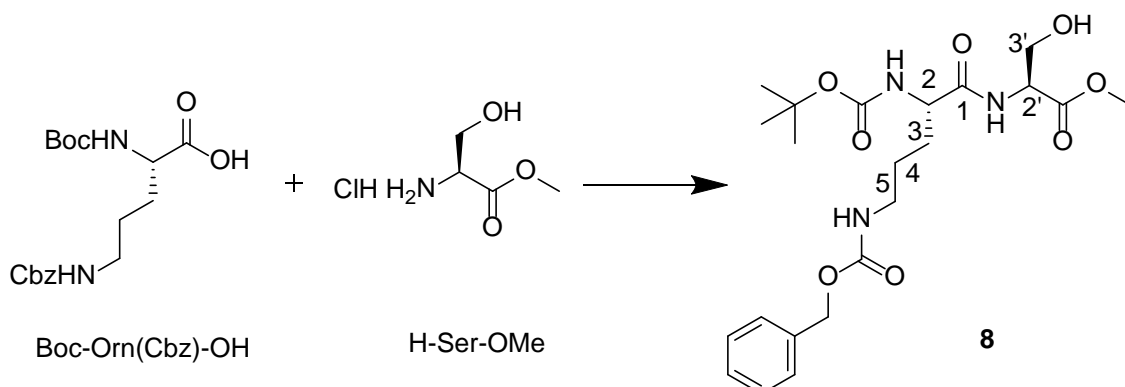
## COSY (7)



## HSQC (7)



**((S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)pentanoil)-L-serinato de metilo (8)**



Sintetizado a partir del de H-Ser-OMe comercial siguiendo el procedimiento general de síntesis de dipéptidos, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/AcOEt, 1:9), obteniéndose el dipéptido **(8)** (3040mg; 93%).

Líquido.  $[\alpha]_D = +15$  (*c* 0.42, CHCl<sub>3</sub>) a 25°C.

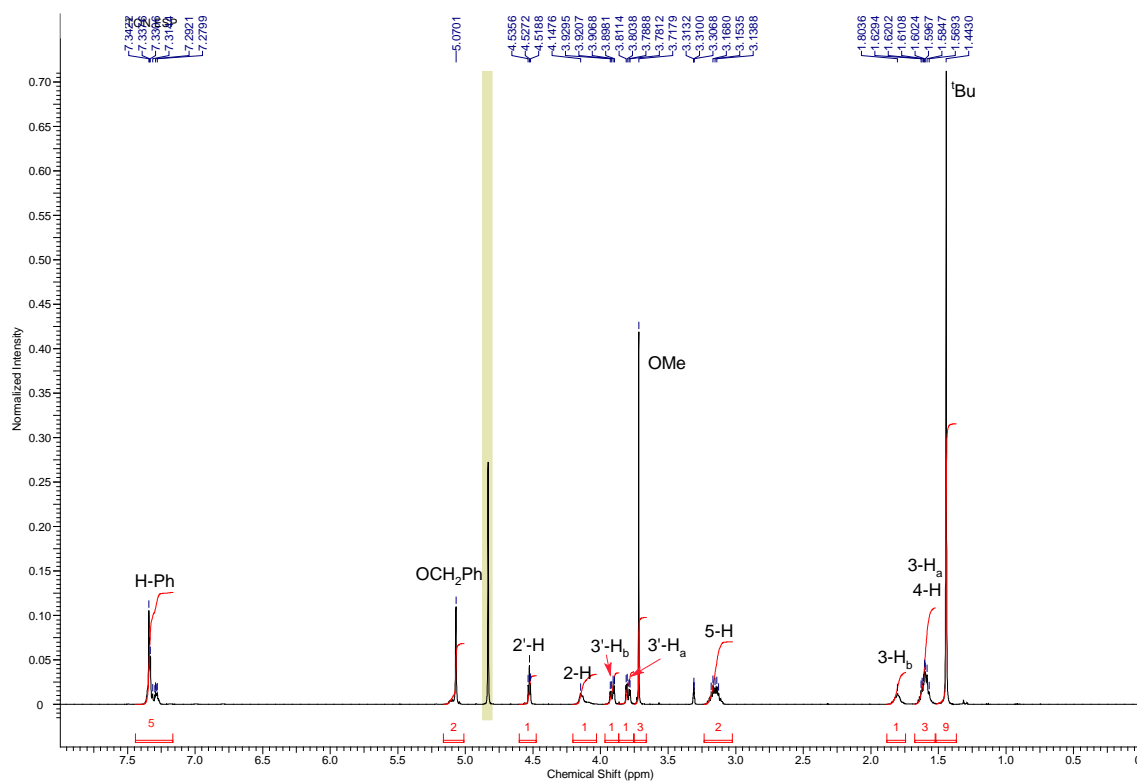
**IR**(CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{máx}}$  3437, 3324 (NH), 1704, 1684 (C=O) cm<sup>-1</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)**  $\delta_H$  1.44 (9H, s, <sup>1</sup>Bu), 1.56–1.62 (3H, m, 4-H, 3-H<sub>a</sub>), 1.80 (1H, br. s, 3-H<sub>b</sub>), 3.12–3.18 (2H, m, 5-H), 3.72 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, dd, *J* = 11.3, 3.8 Hz, 3'-H<sub>a</sub>), 3.91 (1H, dd, *J* = 11.3, 4.4 Hz, 3'-H<sub>b</sub>), 4.15 (1H, br. s, 2-H), 4.53 (1H, dd, *J* = 4.2, 4.2 Hz, 2'-H), 5.07 (2H, br. s, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.27–7.34 (5H, H-Ph).

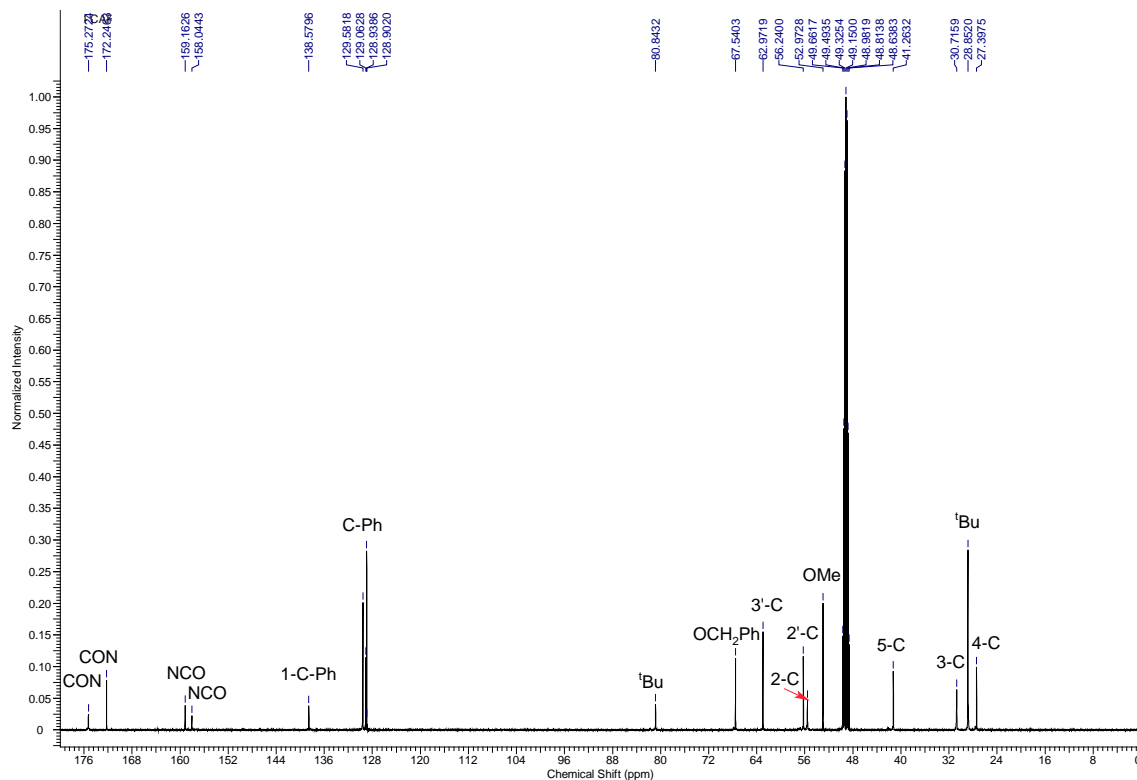
**RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)**  $\delta_C$  27.4 (CH<sub>2</sub>, 4-C), 28.9 (3 × CH<sub>3</sub>, <sup>1</sup>Bu), 30.7 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 41.3 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 53.0 (CH<sub>3</sub>, OMe), 55.6 (CH, 2-C), 56.2 (CH, 2'-C), 63.0 (CH<sub>2</sub>, 3'-C), 67.5 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>Ph), 80.8 (C, <sup>1</sup>Bu), 128.9 (2 × CH, C-Ph), 129.1 (CH, 4-C-Ph), 129.6 (2 × CH, C-Ph), 138.6 (C, 1-C-Ph), 158.0 (C, NCO), 159.2 (C, NCO), 172.2 (C, CON), 175.3 (C, COO).

**EMAR (ESI)** *m/z* calculado para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>8</sub> [M + Na]<sup>+</sup>, 490.2160 encontrado 490,2156.

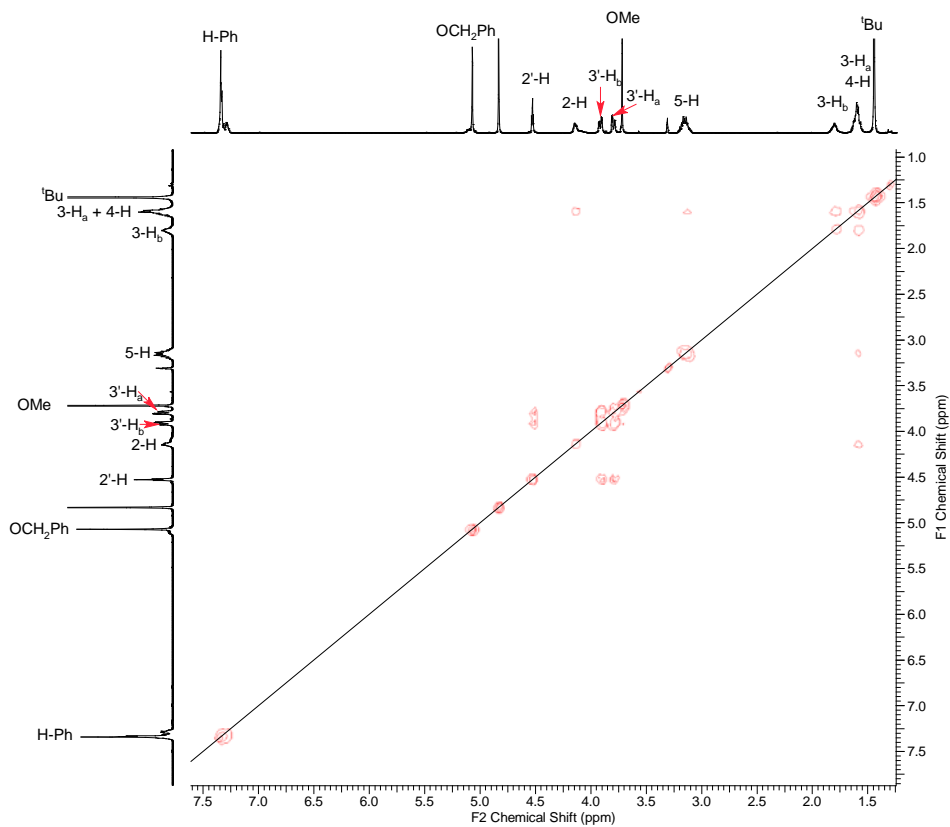
# <sup>1</sup>H-RMN (8)



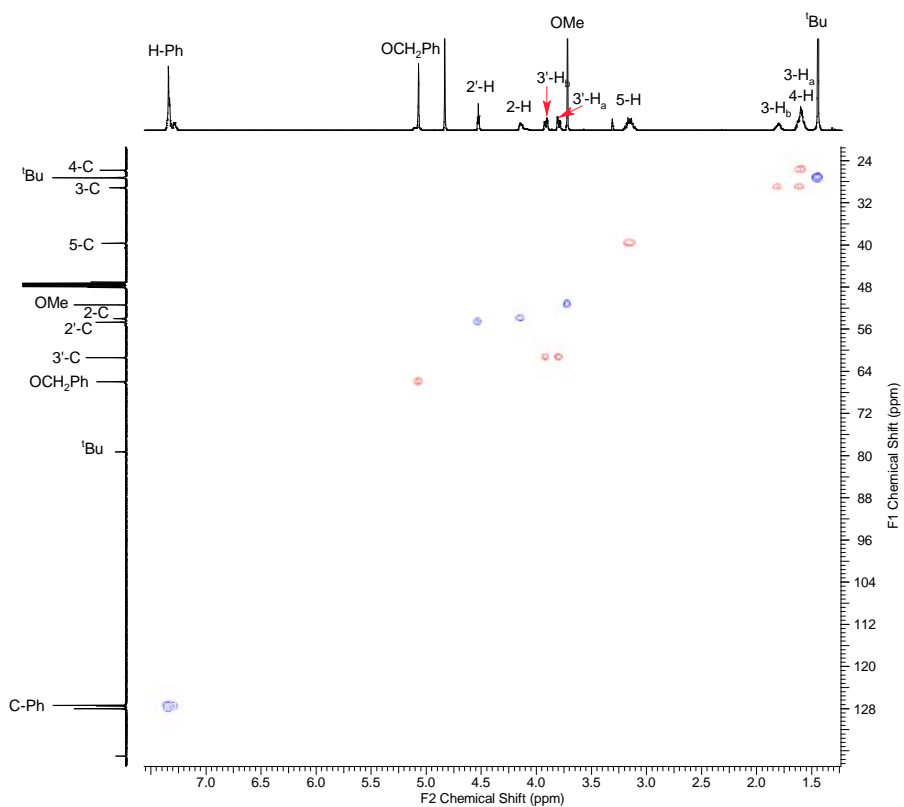
# <sup>13</sup>C-RMN (8)



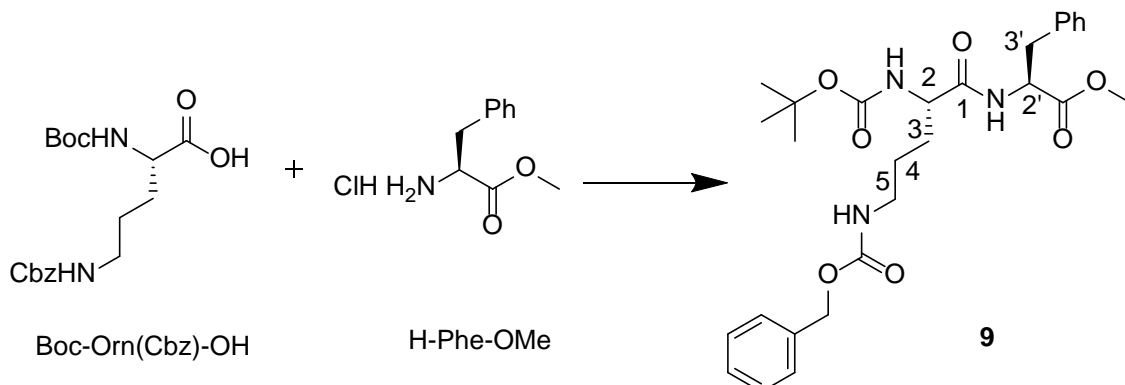
## COSY (8)



## HSQC (8)



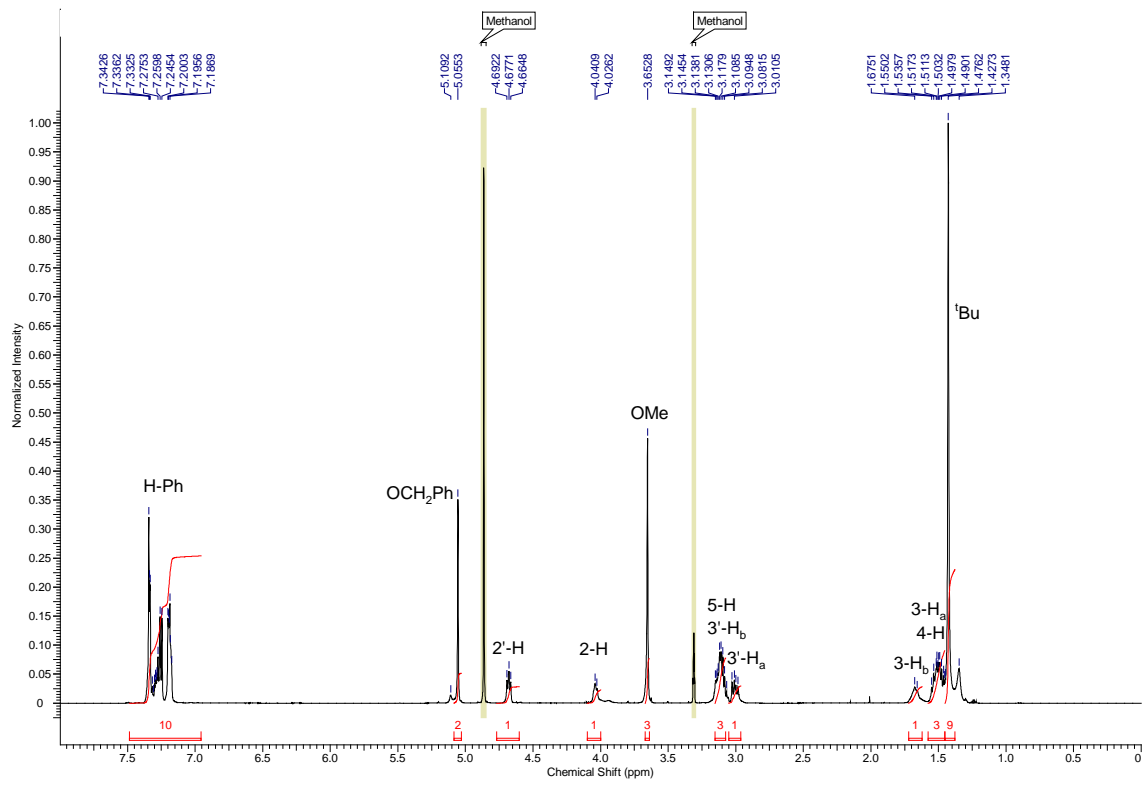
**(S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)pentanoil)-L-fenilalanito de metilo (9)**



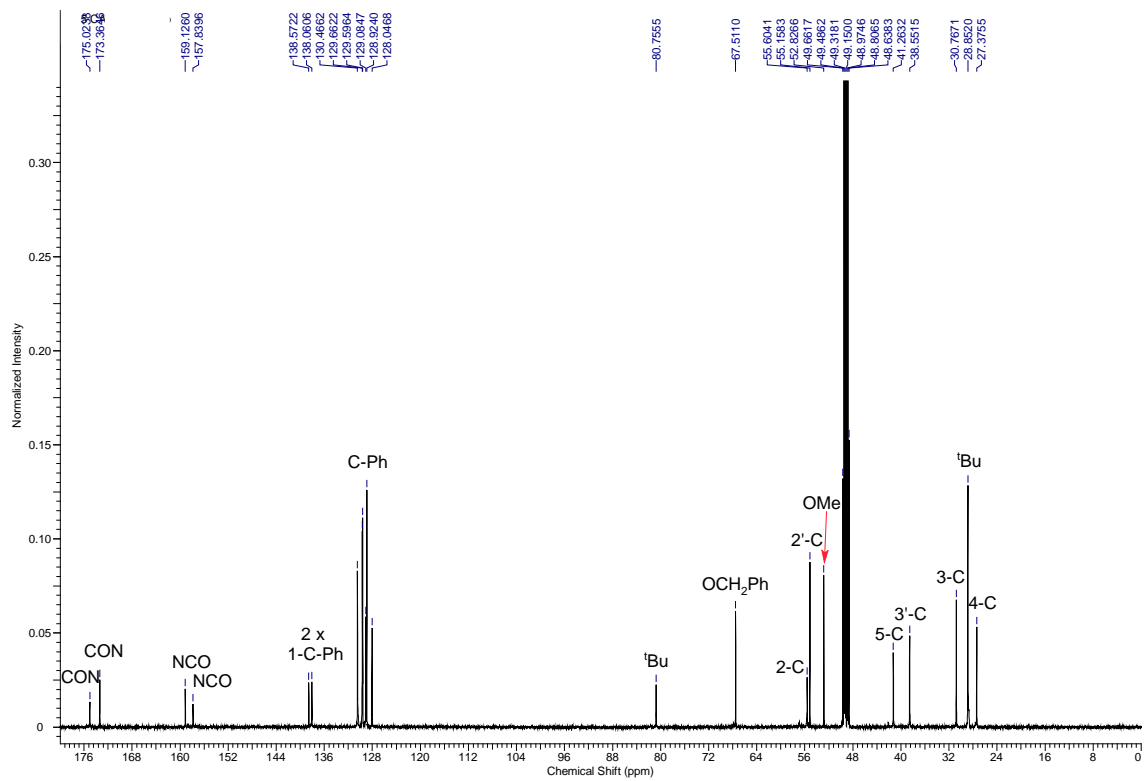
Sintetizado a partir de H-Phe-OMe comercial siguiendo el procedimiento general de síntesis de dipéptidos, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/AcOEt, 1:1), obteniéndose el dipéptido (**9**) (3283 mg; 89%).

|   |
|---|
| Líquido. $[\alpha]_D = +23$ ( <i>c</i> 0.44, CHCl <sub>3</sub> ) a 25°C.  |
| <b>IR(CHCl<sub>3</sub>)</b> $\nu_{\text{máx}}$ 3317 (NH), 1704, 1671 (C=O) cm <sup>-1</sup> .   |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)</b> $\delta_H$ 1.43 (9H, s, <sup>t</sup> Bu), 1.45–1.55 (3H, m, 4-H, 3-H <sub>a</sub> ), 1.67 (1H, br. s, 3-H <sub>b</sub> ), 3.00 (1H, dd, <i>J</i> = 13.8, 8.1 Hz, 3'-H <sub>a</sub> ), 3.06–3.14 (3H, m, 3'-H <sub>b</sub> , 5-H), 3.65 (3H, OMe), 4.03 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2-H), 4.68 (1H, dd, <i>J</i> = 6.9, 6.9 Hz, 2'-H), 5.06 (2H, s, OCH <sub>2</sub> Ph), 7.18–7.34 (10H, H-Ph).   |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (125,7 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)</b> $\delta_C$ 27.4 (CH <sub>2</sub> , 4-C), 28.9 (3 × CH <sub>3</sub> , <sup>t</sup> Bu), 30.8 (CH <sub>2</sub> , 3-C), 38.6 (CH <sub>2</sub> , 3'-C), 41.3 (CH <sub>2</sub> , 5-C), 52.8 (CH <sub>3</sub> , OMe), 55.2 (CH, 2'-C), 55.6 (CH, 2-C), 67.5 (CH <sub>2</sub> , OCH <sub>2</sub> Ph), 80.8 (C, <sup>t</sup> Bu), 128.0 (CH, 4-C-Ph), 128.9 (2 × CH, C-Ph), 129.1 (CH, 4-C-Ph), 129.6 (2 × CH, C-Ph), 129.7 (2 × CH, C-Ph), 130.5 (2 × CH, C-Ph), 138.1 (C, 1-C-Ph), 138.6 (C, 1-C-Ph), 157.8 (C, NCO), 159.1 (C, NCO), 173.4 (C, CON), 175.0 (C, COO). |
| <b>EMAR (ESI)</b> <i>m/z</i> calculado para C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> [M + Na] <sup>+</sup> , 550.2524 encontrado 550,2520.   |

# <sup>1</sup>H-RMN (9)

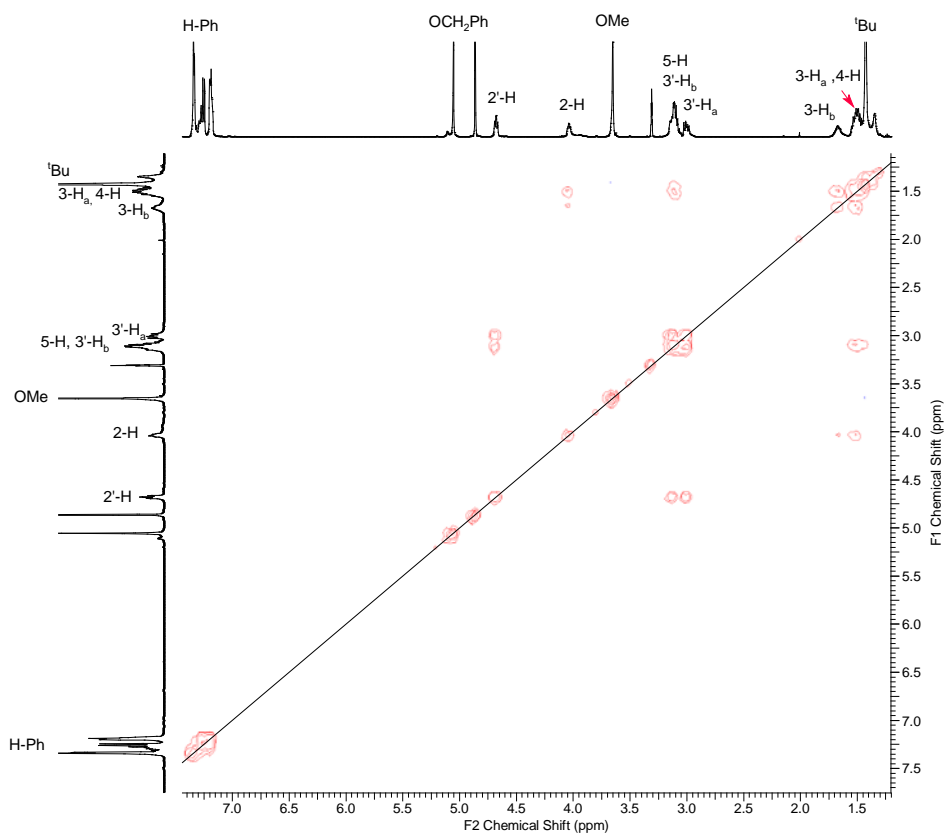


# <sup>13</sup>C-RMN (9)

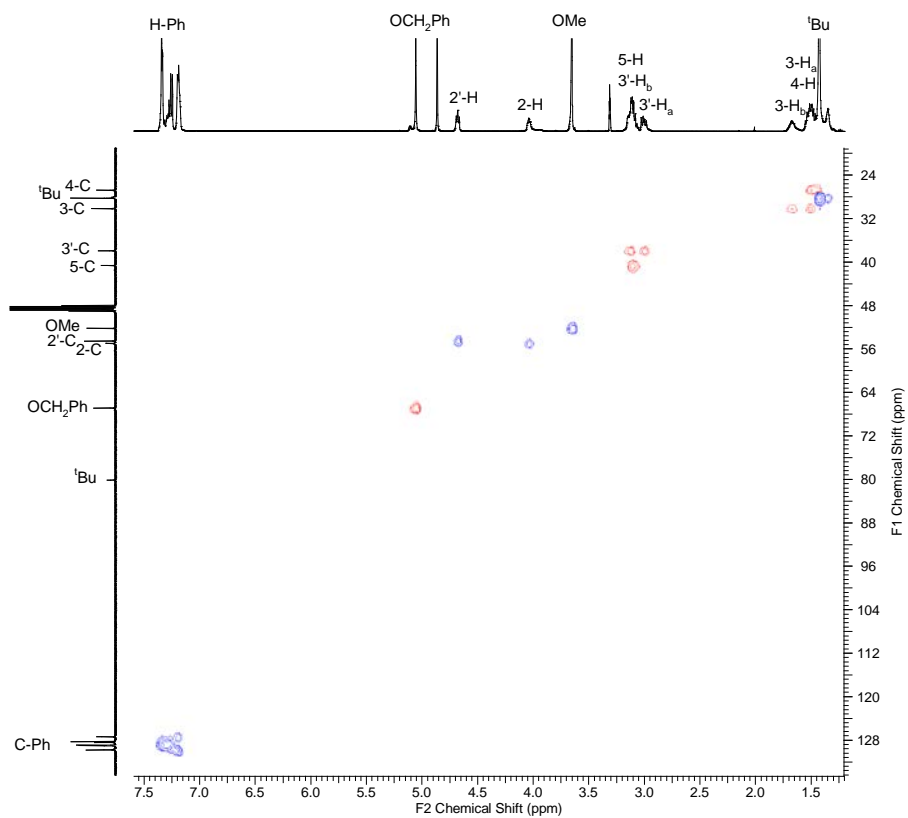




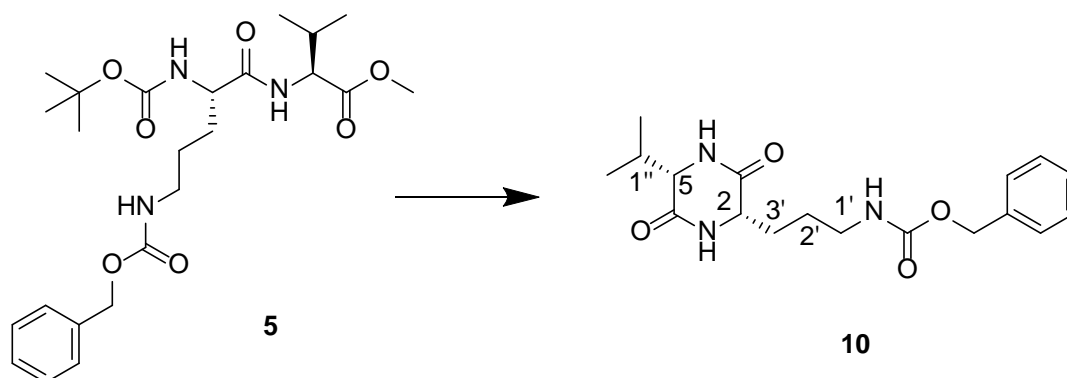
## COSY (9)



## HSQC (9)



**(3'-((2S,5S)-5-isopropil-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo (10)**



Sintetizado a partir del dipéptido **5** siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,5-dicetopiperazinas obteniéndose el dicetopiperazina (**10**) (1374 mg; 66 %).

Sólido cristalino. Cristalizó de MeOH. p.f 204-205°C.  $[\alpha]_D = -14$  (*c* 0.42, DMSO) a 25°C.

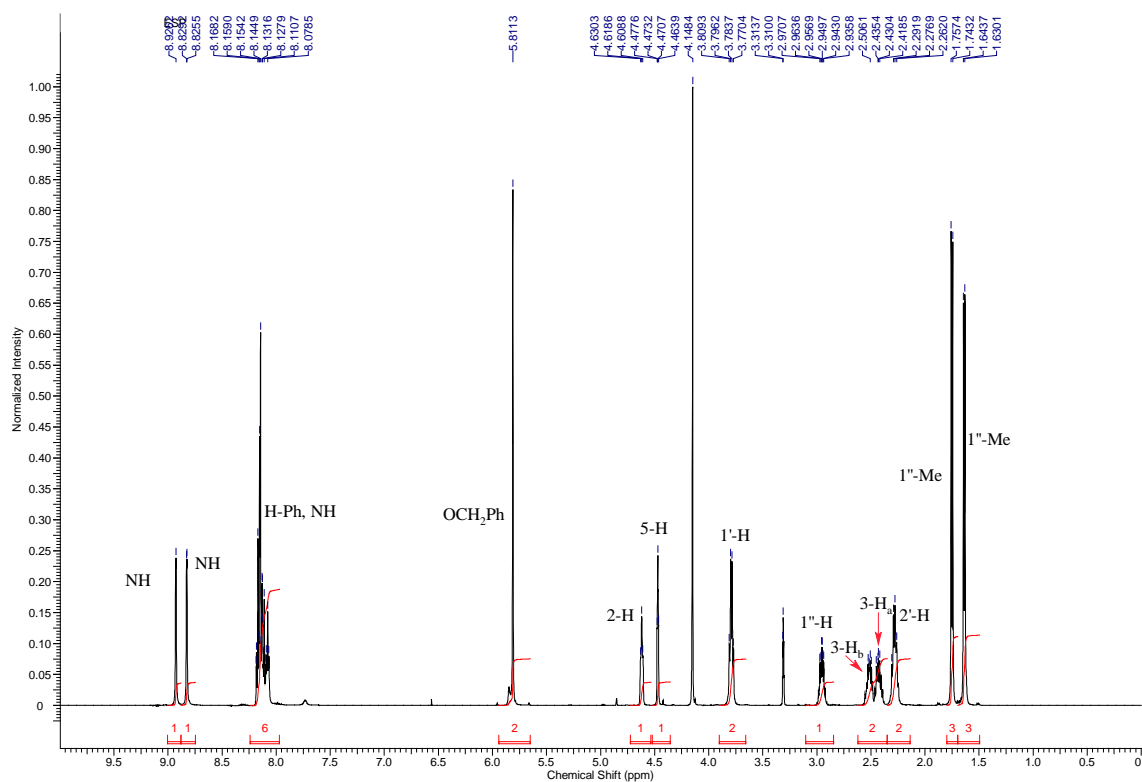
**IR(ATR)**  $\nu_{\text{máx}}$  3309, 3279 (NH), 1742, 1684, 1638 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)**  $\delta_{\text{H}}$  1.64 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 1''-Me), 1.75 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, 1''-Me), 2.25–2.31 (2H, m, 2'-H), 2.43 (1H, m, 3'-H<sub>a</sub>), 2.52 (1H, m, 3'-H<sub>b</sub>), 2.95 (1H, dddd, *J* = 10.4, 6.9, 6.9, 3.6, 3.6 Hz, 1''-H), 3.79 (2H, ddd, *J* = 6.6, 6.6, 6.6 Hz, 1'-H), 4.47 (1H, m, 5-H), 4.62 (1H, dd, *J* = 5.4, 5.4 Hz, 2-H), 5.81 (2H, s, OCH<sub>2</sub>Ph), 8.08 (1H, dd, *J* = 5.7, 5.8 Hz, NH), 8.10–8.18 (5H, m, H-Ph), 8.83 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, NH), 8.93 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, NH).

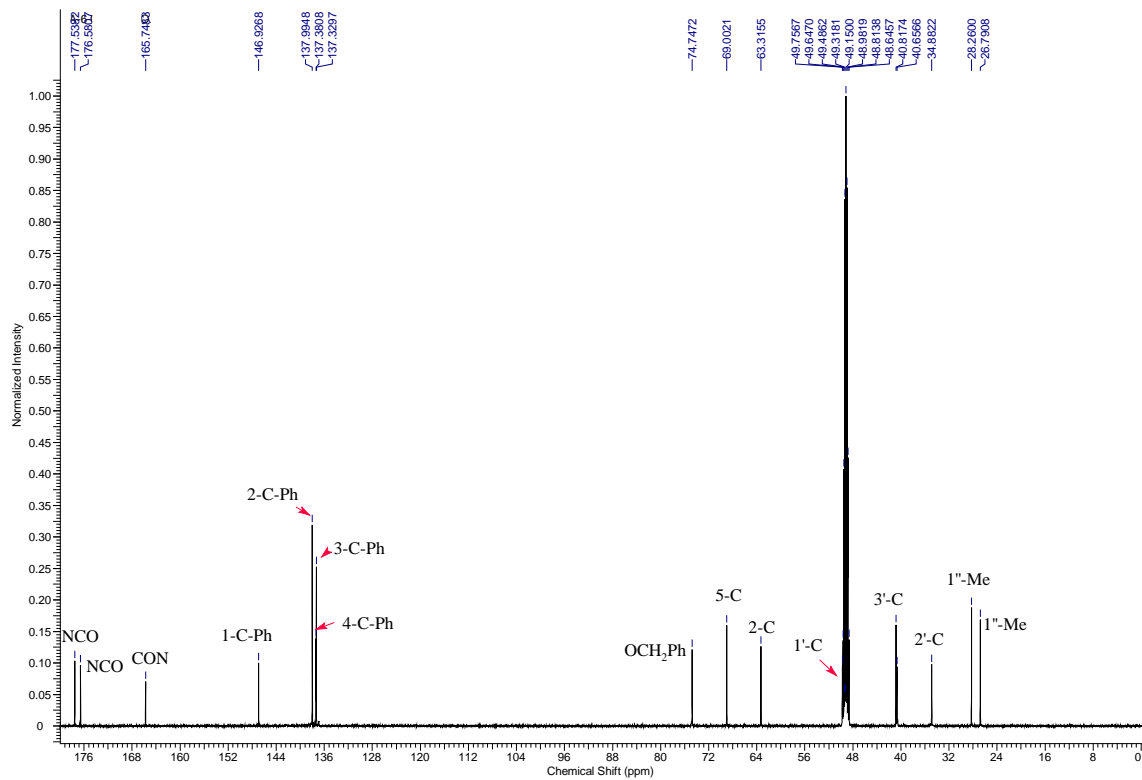
**RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)**  $\delta_{\text{C}}$  26.8 (CH<sub>3</sub>, 1''-Me), 28.3 (CH<sub>3</sub>, 1''-Me), 34.9 (CH<sub>2</sub>, 2'-C), 40.7 (CH<sub>2</sub>, 3'-C), 40.8 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 49.8 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 63.3 (CH, 2-C), 69.0 (CH, 5-C), 74.7 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>Ph), 137.32 (2 × CH, C-Ph), 137.38 (CH, 4-C-Ph), 138.0 (2 × CH, C-Ph), 146.9 (C, 1-C-Ph), 165.7 (C, CON), 176.6 (C, NCO), 177.5 (C, NCO).

**EMAR (ESI)** *m/z* calculado para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>, 370.1743 encontrado 370.1746.

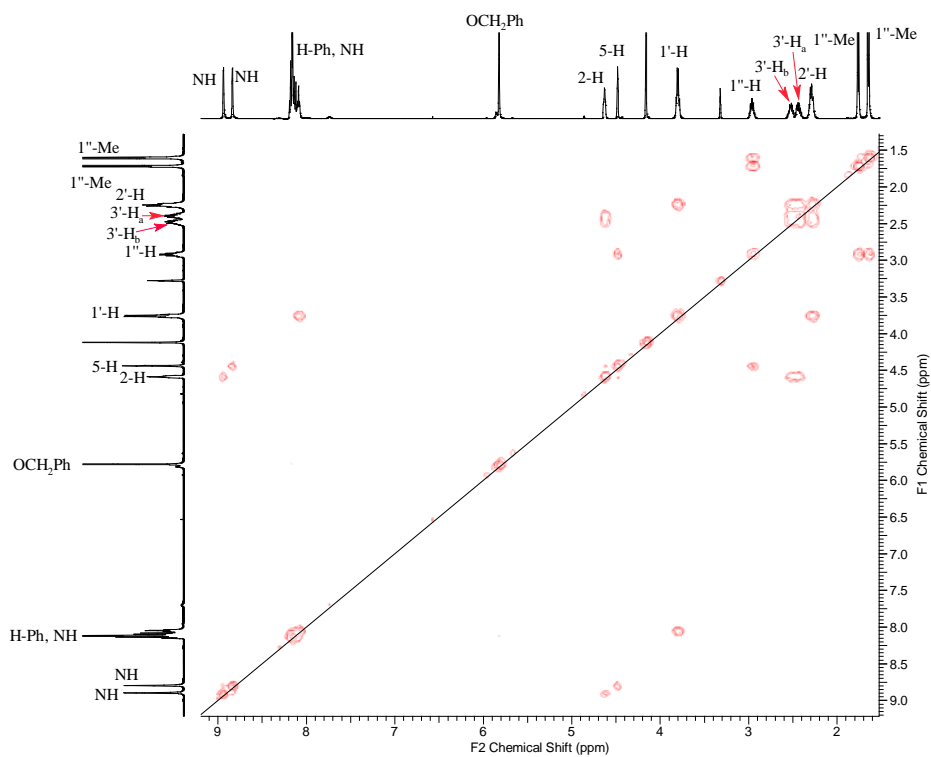
# <sup>1</sup>H-RMN (10)



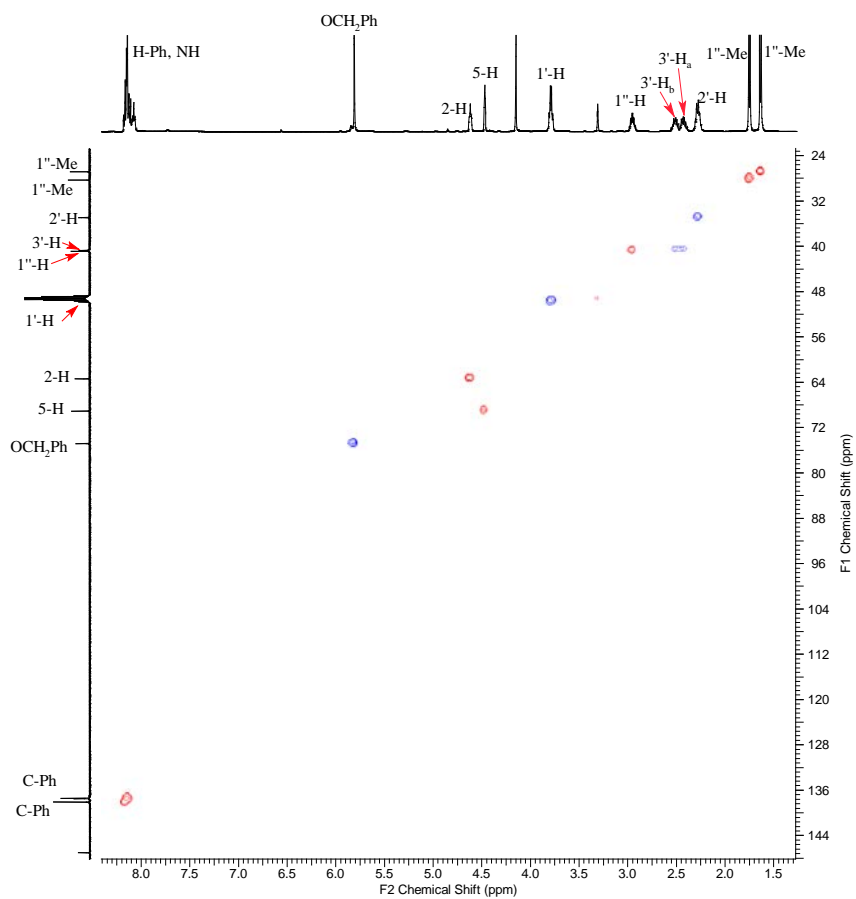
# <sup>13</sup>C-RMN (10)



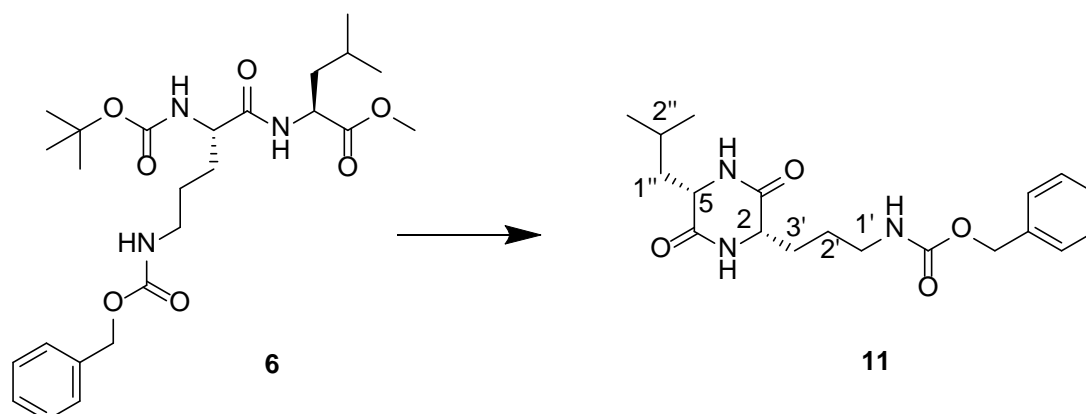
## COSY (10)



## HSQC (10)



**(3'-(2*S*,5*S*)-5-isobutil-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo (11)**



Sintetizado a partir del dipéptido **2** siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,5-dicetopiperazinas obteniéndose el dicetopiperazina (**11**) (1495 mg; 69%).

Sólido cristalino. Cristalizó de MeOH. p.f. 202-203°C.  $[\alpha]_D = -31$  (c 0.32, DMSO) a 25°C.

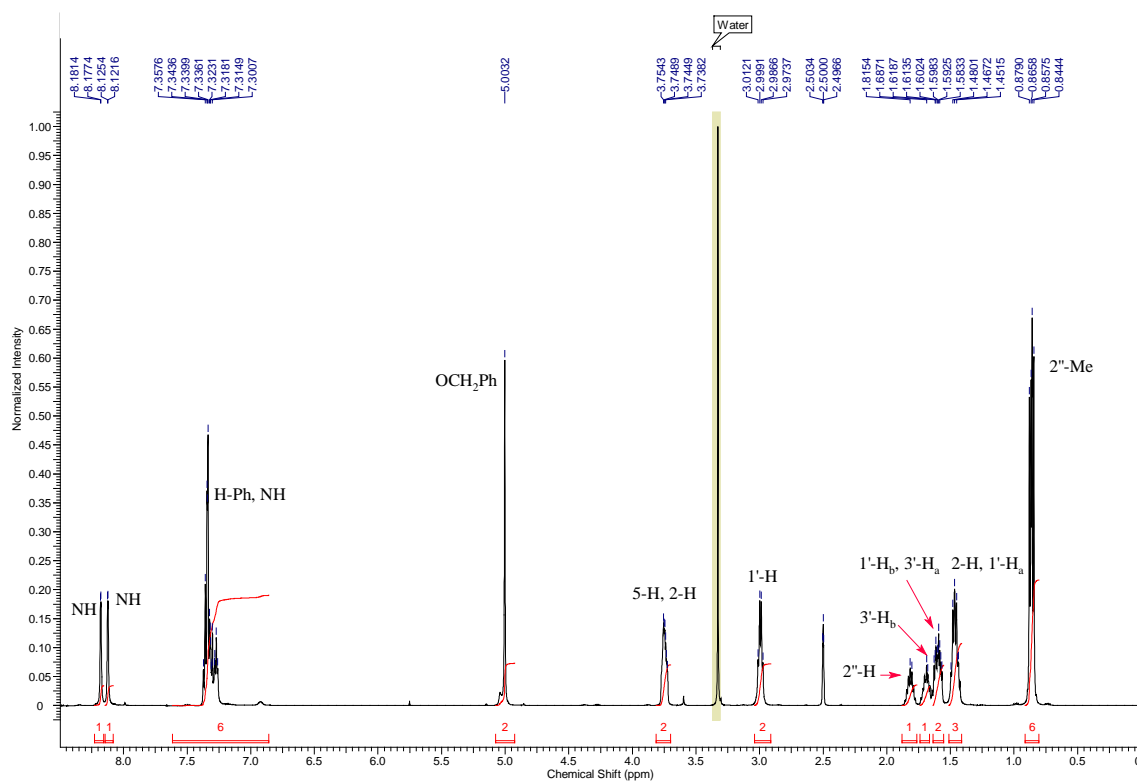
**IR(ATR)**  $\nu_{\text{máx}}$  3317, 3197 (NH), 1672 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3\text{SO}_2, 25^\circ\text{C})$**   $\delta_{\text{H}}$  0.85 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 2''-Me), 0.87 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 2''-Me), 1.42–1.50 (3H, m, 1'-H<sub>a</sub>, 2''-H), 1.56–1.63 (2H, m, 1'-H<sub>b</sub>, 3'-H<sub>a</sub>), 1.68 (1H, m, 3'-H<sub>b</sub>), 1.81 (1H, m, 2''-H), 2.99 (2H, ddd,  $J = 6.5, 6.5, 6.5$  Hz, 1'-H), 3.73–3.75 (2H, m, 5-H, 2-H), 5.00 (2H, s, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.27 (1H, dd,  $J = 5.6, 6.1$  Hz, NH), 7.29–7.37 (5H, m, H-Ph), 8.12 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, NH), 8.18 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, NH).

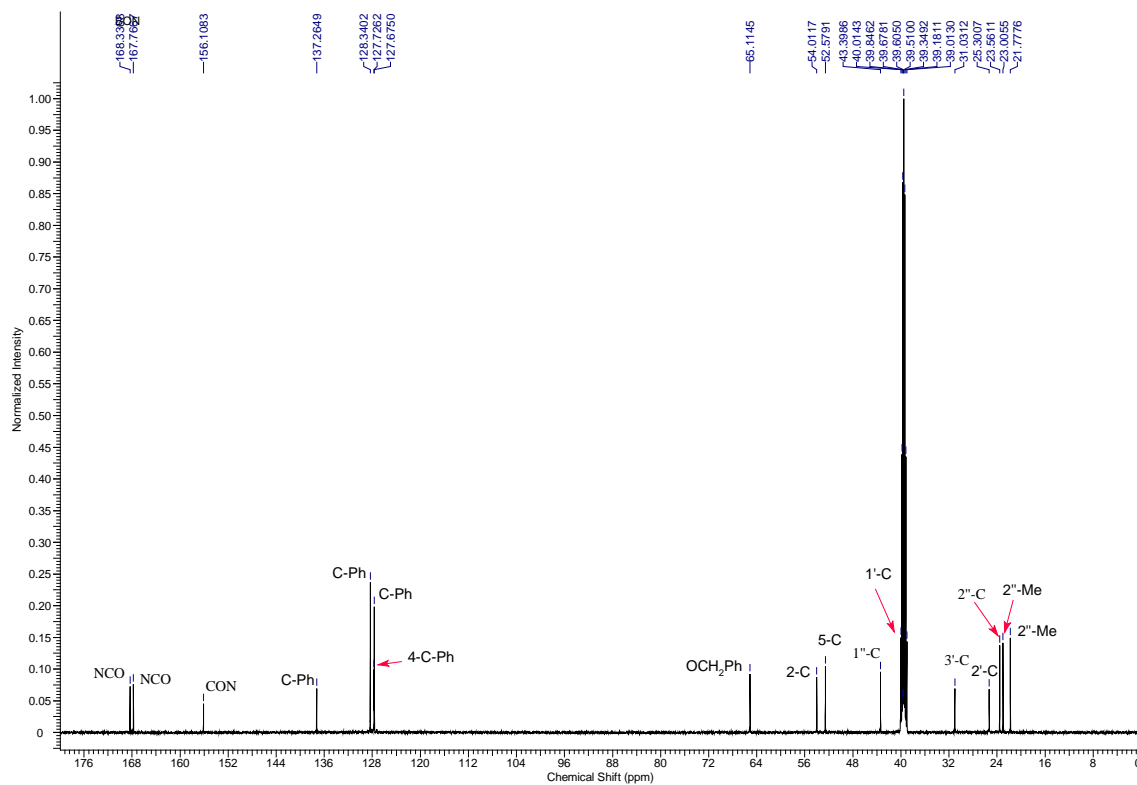
**RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $(\text{CD}_3\text{SO}_2, 25^\circ\text{C})$**   $\delta_{\text{C}}$  21.8 (CH<sub>3</sub>, 2''-Me), 23.0 (CH<sub>3</sub>, 2''-Me), 23.6 (CH- 2''-C), 25.3 (CH<sub>2</sub>, 2'-C), 31.0 (CH<sub>2</sub>, 3'-C), 40.1 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 43.4 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 52.6 (CH, 5-C), 54.0 (CH, 2-C), 65.1 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>Ph), 127.67 (2 × CH, C-Ph), 127.72 (CH, 4-C-Ph), 128.3 (2 × CH, C-Ph), 137.2 (C, 1-C-Ph), 156.1 (C, NCO), 167.8 (C, CON), 168.3 (C, CON).

**EMAR (ESI)** m/z calculado para C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 384,189377, encontrado 384,1889.

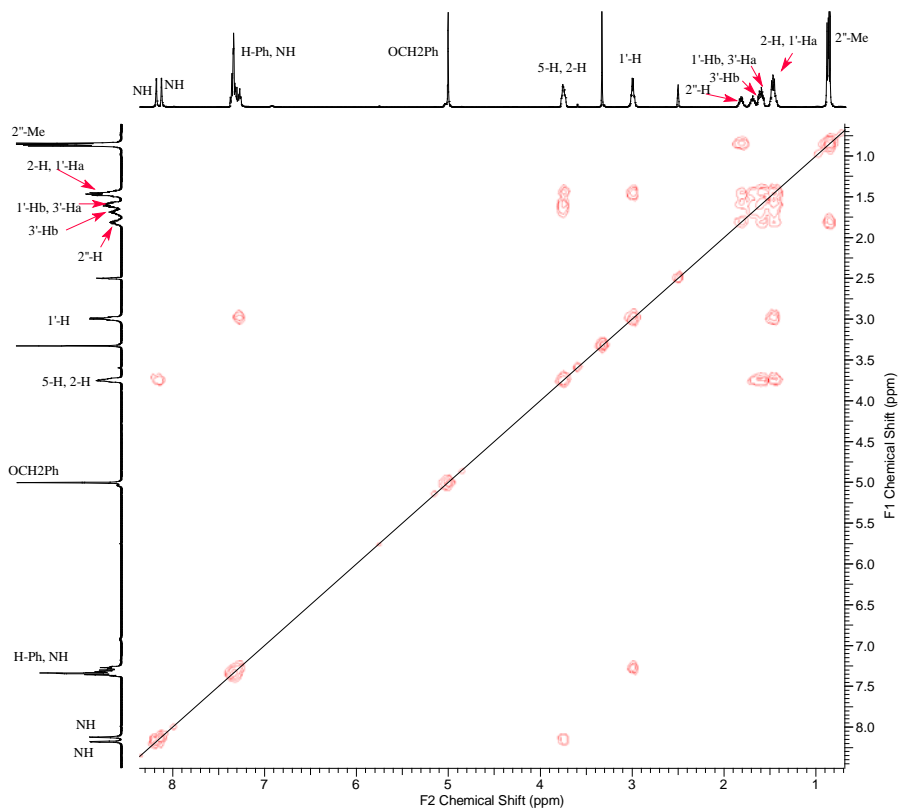
# <sup>1</sup>H-RMN (11)



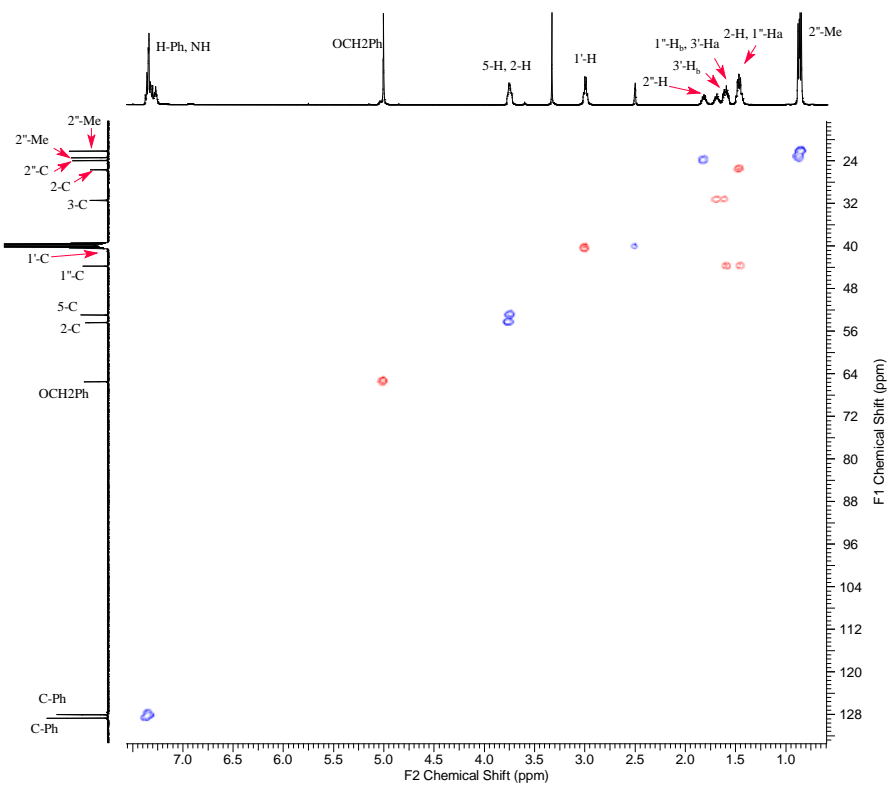
# <sup>13</sup>C-RMN (11)



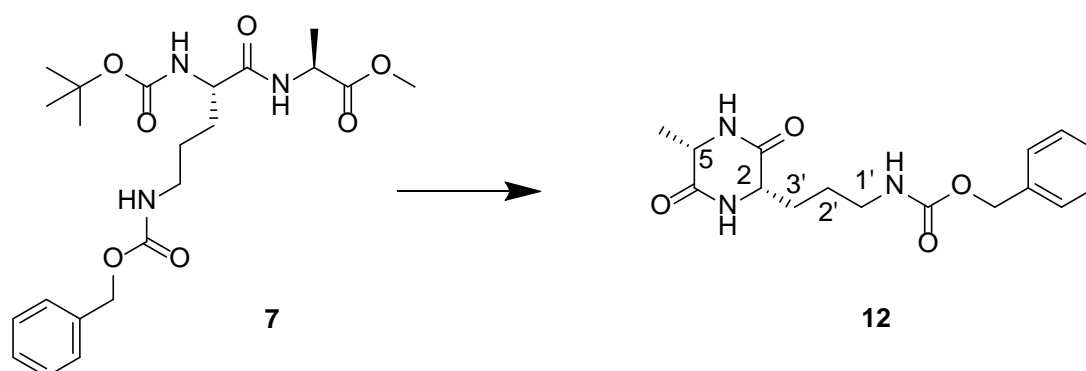
## COSY (11)



## HSQC (11)



**(3'-((2S,5S)-5-metil-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo (12)**



Sintetizado a partir del dipéptido (**7**) siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,5-diketopiperazinas obteniéndose el diketopiperazina (**12**) (1492 mg; 78%).

Sólido cristalino. Cristalizó de MeOH. p.f. 226-227°C.  $[\alpha]_D = -29$  (c 0.32, DMSO) a 25°C.

**IR(ATR)**  $\nu_{\text{máx}}$  3294 (NH), 1681, 1632 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

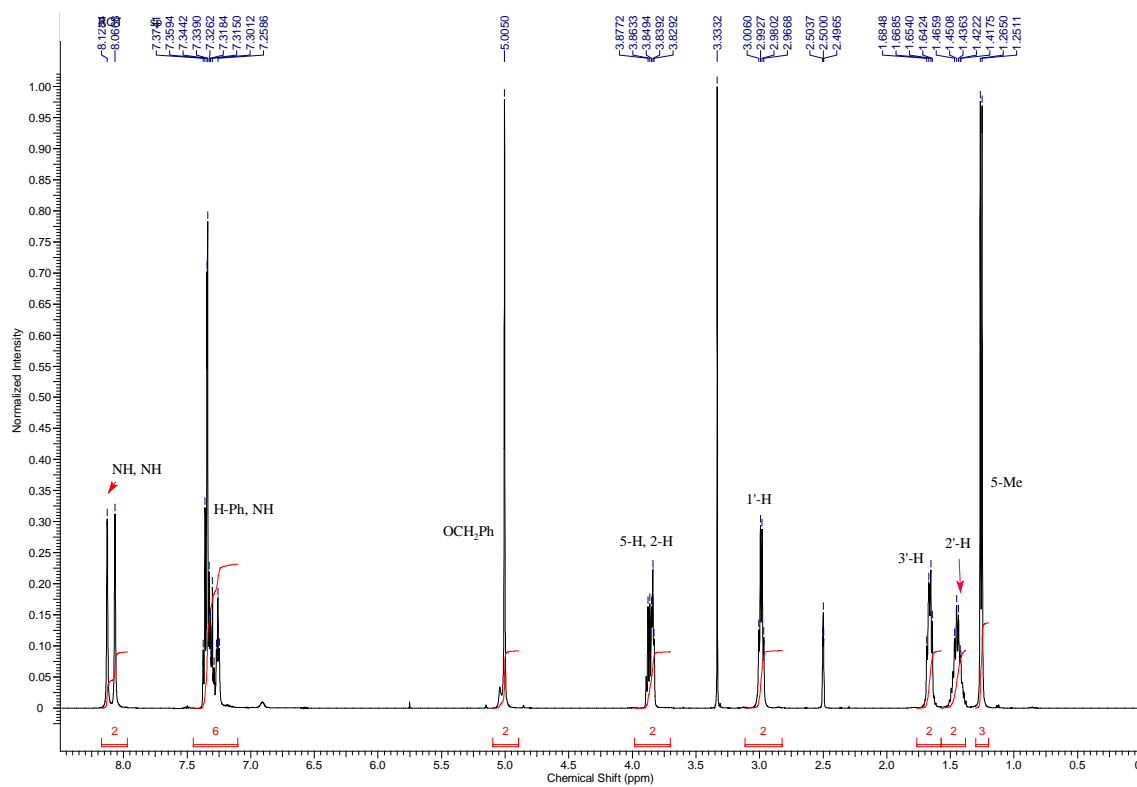
**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3\text{SO}_2, 25^\circ\text{C})$**   $\delta_{\text{H}}$  1.26 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, 5-Me), 1.42–1.47 (2H, m, 2'-H), 1.64–1.68 (2H, m, 3'-H), 2.96–3.00 (2H, m 1'-H), 3.83–3.88 (2H, m, 5-H, 2-H), 5.01 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7.26 (1H, dd,  $J = 5.6, 5.6$  Hz, NH), 7.28–7.37 (5H, m, H-Ph), 8.07 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $(\text{CD}_3\text{SO}_2, 25^\circ\text{C})$**   $\delta_{\text{C}}$  19.5 ( $\text{CH}_3$ , 5-Me), 24.8 ( $\text{CH}_2$ , 2'-C), 30.0 ( $\text{CH}_2$ , 3'-C), 40.1 ( $\text{CH}_2$ , 1'-C), 49.8 (CH, 5-C), 53.8 (CH, 2-C), 65.1 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 127.69 (2  $\times$  CH, C-Ph), 127.73 (CH, 4-C-Ph), 128.3 (CH, 2  $\times$  C-Ph), 137.3 (C, 1-C-Ph), 156.1 (C, NCO), 167.6 (C, CON), 168.8 (C, CON).

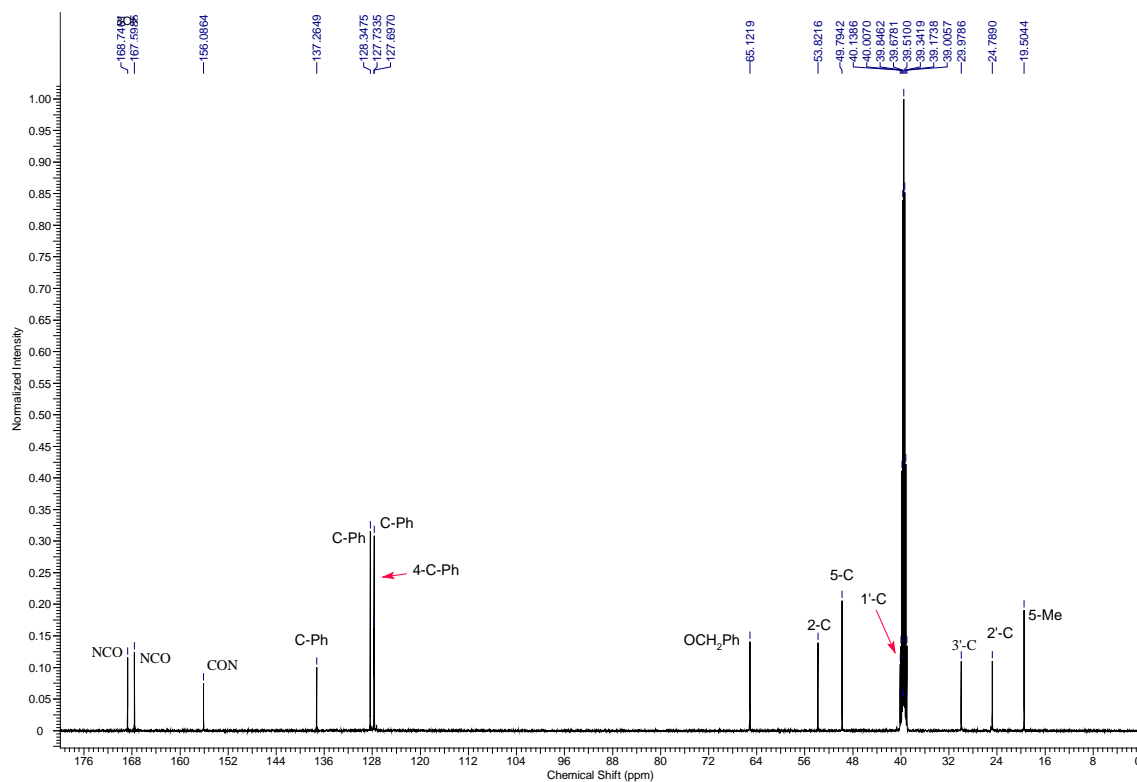
**EMAR (ESI)** m/z calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_4$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 342,1424 encontrado 342.1421



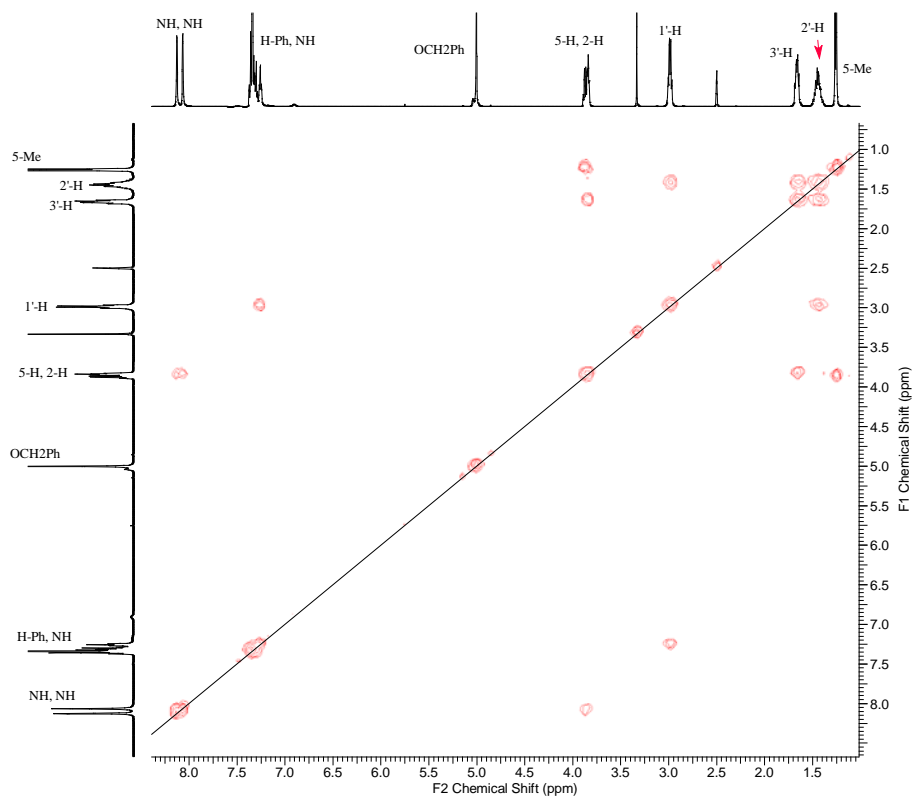
# <sup>1</sup>H-RMN (12)



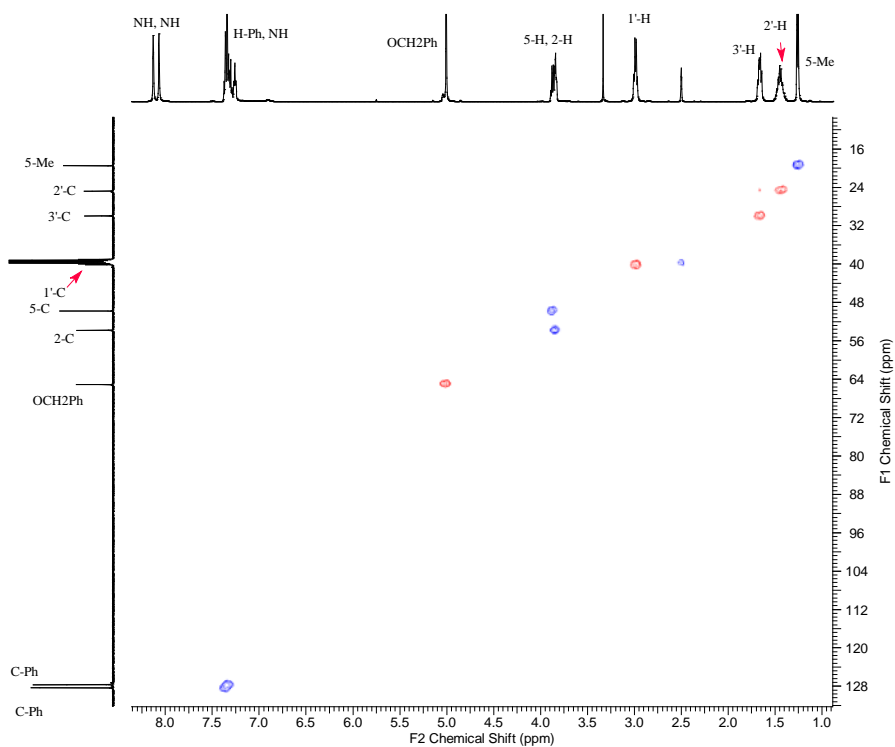
# <sup>13</sup>C-RMN (12)



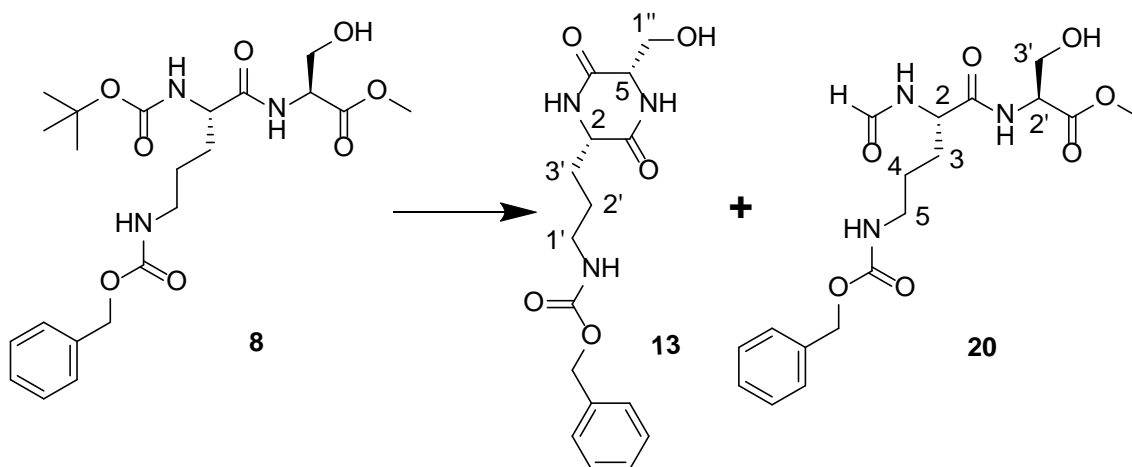
## COSY (12)



## HSQC (12)



**(3'-((2S,5S)-5-(hidroximetil)-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo (13) y ((S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-formamidopentanoil)-L-serinato de metilo (20)**

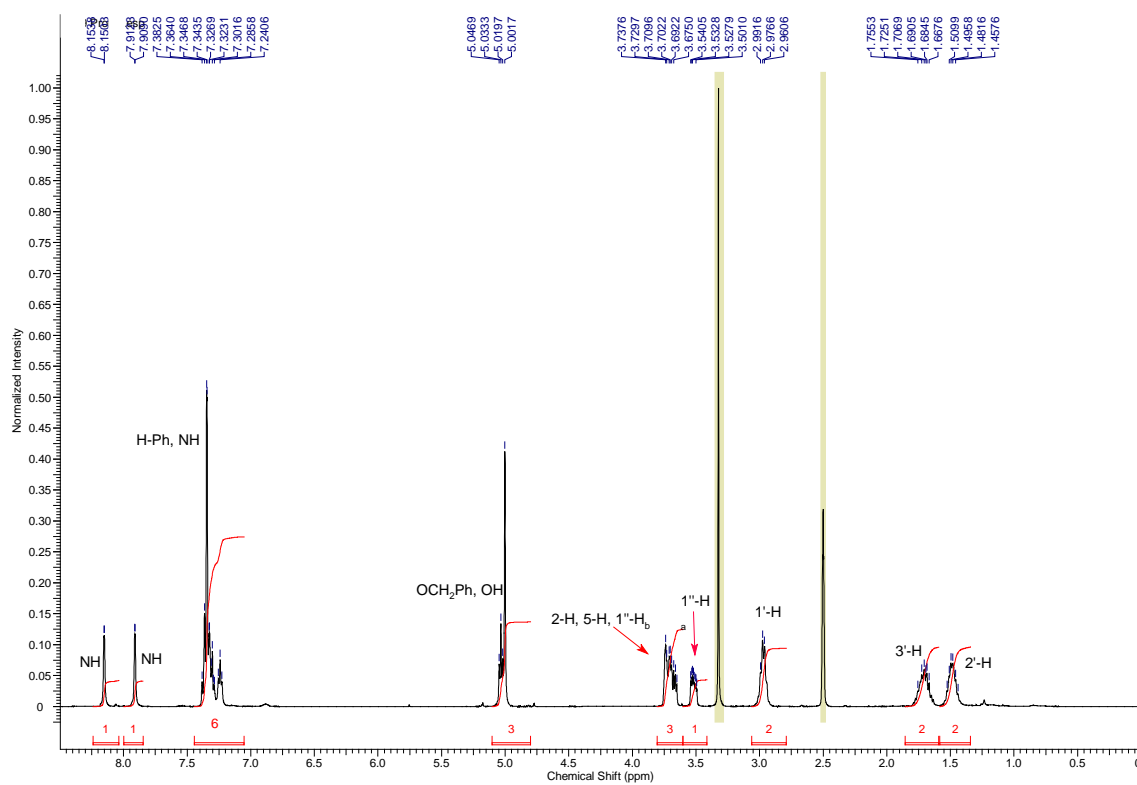


Sintetizado a partir del dipéptido **8** siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,5-dicetopiperazinas obteniéndose el dicetopiperazina (**13**) (764 mg; 38%). El metanol de los lavados se concentra y se obtiene el dipéptido (**20**) (995 mg; 42%) por cristalización en DCM/MeOH.

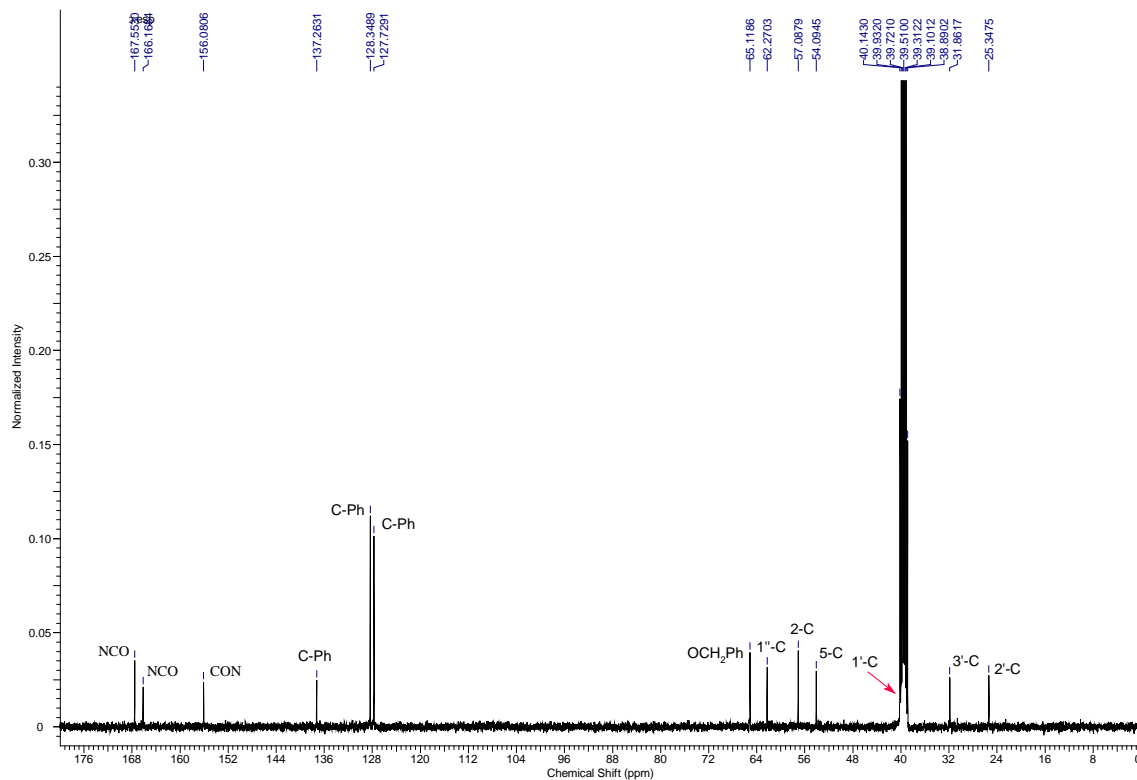
**(3'-((2S,5S)-5-(hidroximetil)-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo (13)**

|   |
|---|
| Sólido cristalino. Cristalizó de MeOH. p.f. 180-181°C. $[\alpha]_D = -24$ (c 0.37, DMSO) a 25°C.  |
| <b>IR(ATR)</b> $\nu_{\text{máx}}$ 3310, 3188 (NH), 1684, 1652 (C=O) $\text{cm}^{-1}$ .  |
| <b>RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>(\text{CD}_3\text{SO}_2, 25^\circ\text{C})</math></b> $\delta_{\text{H}}$ 1.44–1.53 (2H, m, 2'-H), 1.67–1.76 (2H, m, 3'-H), 2.96–2.99 (2H, m, 1'-H), 3.52 (1H, ddd, $J = 10.7, 5.1, 3.1$ Hz, 1''-H <sub>a</sub> ), 3.65–3.73 (3H, m, 2-H, 5-H, 1''-H <sub>b</sub> ), 5.00 (2H, s, OCH <sub>2</sub> Ph), 5.03 (1H, dd, $J = 5.5, 5.5$ Hz, OH), 7.24 (1H, dd, $J = 5.6, 5.6$ Hz, NH), 7.29–7.38 (5H, m, Ph-H), 7.91 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, NH), 8.15 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, NH). |
| <b>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100.6 MHz, <math>(\text{CD}_3\text{SO}_2, 25^\circ\text{C})</math></b> $\delta_{\text{C}}$ 25.3 (CH <sub>2</sub> , 2'-C), 31.8 (CH <sub>2</sub> , 3'-C), 40.1 (CH <sub>2</sub> , 1'-C), 54.1 (CH, 5-C), 57.1 (CH, 2-C), 62.3 (CH <sub>2</sub> , 1''-C), 65.1 (CH <sub>2</sub> , OCH <sub>2</sub> Ph), 127.7 (CH, 2 × C-Ph), 128.3 (CH, 3 × C-Ph), 137.3 (C, 1-C-Ph), 156.1 (C, NCO) 166.2 (C, CON), 167.6 (C, CON).  |
| <b>EMAR (ESI)</b> m/z calculado para C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>5</sub> [M + Na] <sup>+</sup> , 358,1373 encontrado 358.1370.  |

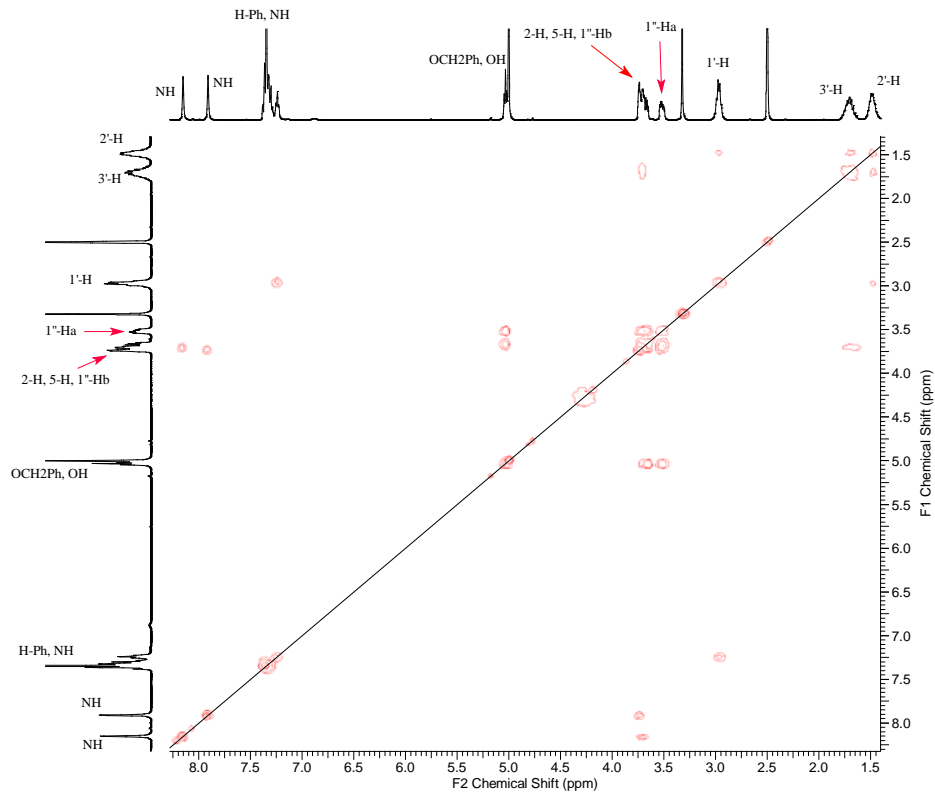
# <sup>1</sup>H-RMN (13)



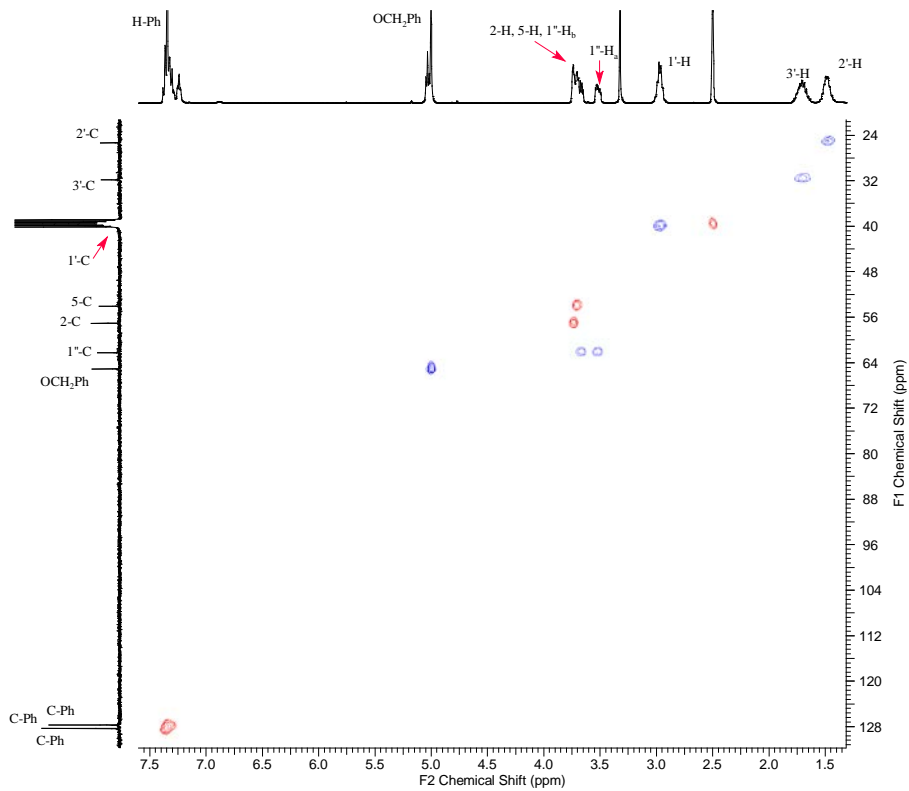
# <sup>13</sup>C-RMN (13)



### COSY (13)



### HSQC (13)



**((S)-5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-formamidopentanoil)-L-serinato de metilo (20)**

Sólido cristalino. Cristalizó de DCM/MeOH. p.f. 106-107°C.  $[\alpha]_D = -5$  (*c* 0.37, DMSO) a 25°C.

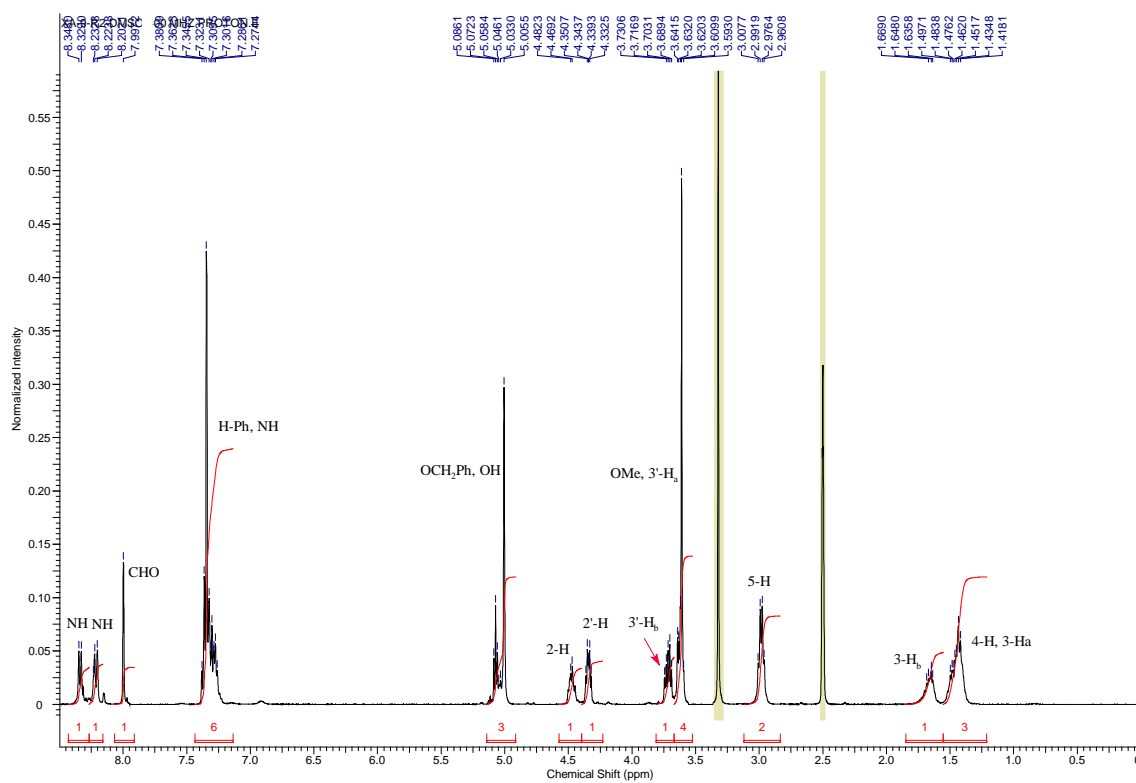
**IR(ATR)**  $\nu_{\text{máx}}$  3298, (NH), 1685, 1635 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)\text{SO}_2$ , 25°C)**  $\delta_{\text{H}}$  1.41–1.50 (3H, m, 4-H, 3-H<sub>a</sub>), 1.66 (1H, m, 3-H<sub>b</sub>), 2.98 (2H, ddd, *J* = 6.2, 6.2, 6.2 Hz, 5-H), 3.59–3.64 (4H, m, OMe, 3'-H<sub>a</sub>), 3.72 (1H, ddd, *J* = 5.5, 5.5 11.0 Hz, 3'-H<sub>b</sub>), 4.34 (1H, ddd, *J* = 4.8, 4.8, 7.5 Hz, 2'-H), 4.47 (1H, m, 2-H), 5.01 (2H, br. s, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.07 (1H, dd, *J* = 5.6, 5.6 Hz, OH), 7.27–7.38 (6H, H-Ph, NH), 8.22 (1H, dd, *J* = 8.7 Hz, NH), 8.34 (1H, dd, *J* = 7.6 Hz, NH).

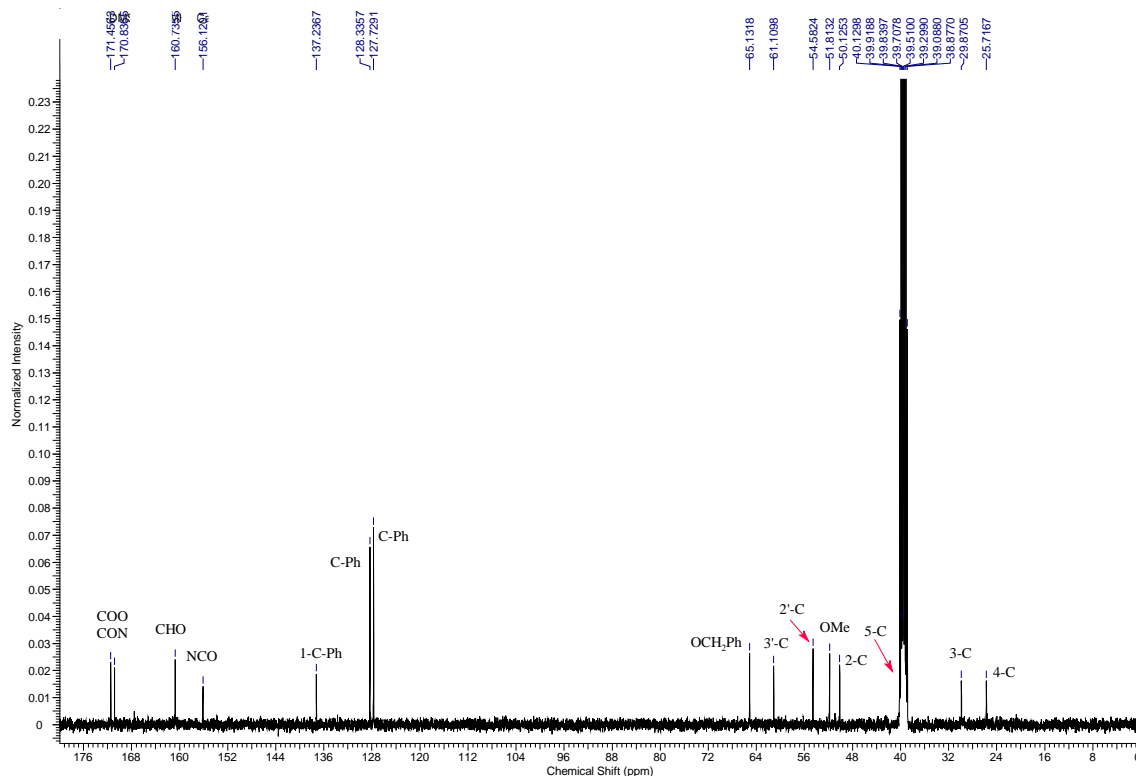
**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)\text{SO}_2$ , 25°C)**  $\delta_{\text{C}}$  25.7 (CH<sub>2</sub>, 4-C), 29.9 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 39.8 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 50.1 (CH, 2-C), 51.8 (CH<sub>3</sub>, OMe), 54.6 (CH, 2'-C), 61.1 (CH<sub>2</sub>, 3'-C), 65.1 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>Ph), , 127.7 (3 × CH, C-Ph), 128.3 (2 × CH, C-Ph), 137.2 (C, 1-C-Ph), 156.1 (C, NCO), 160.7 (CH, CHO), 170.8 (C, CON), 171.5 (C, COO).

**EMAR (ESI)** *m/z* calculado para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub> [M + Na]<sup>+</sup>, 418.1590 encontrado 418.1594.

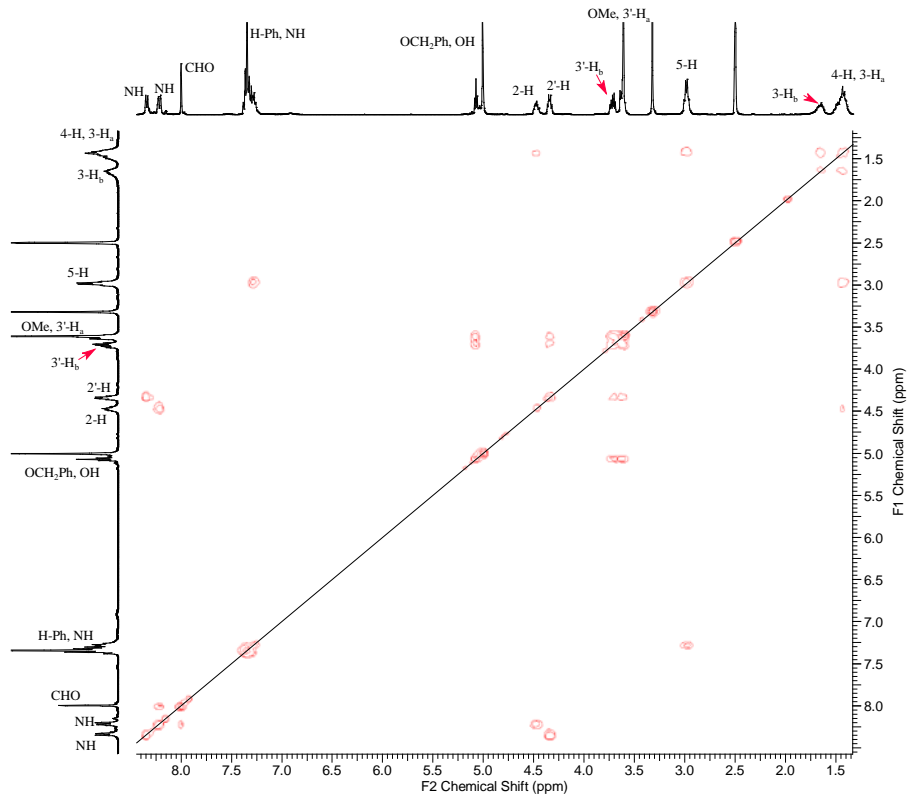
# <sup>1</sup>H-RMN (20)



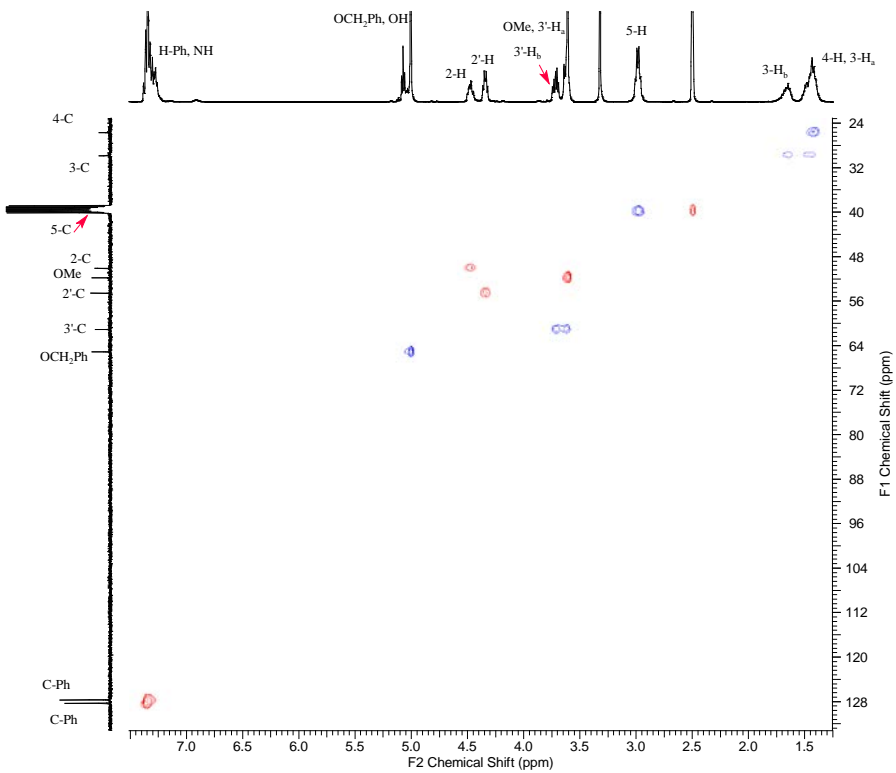
# <sup>13</sup>C-RMN (20)



## COSY (20)

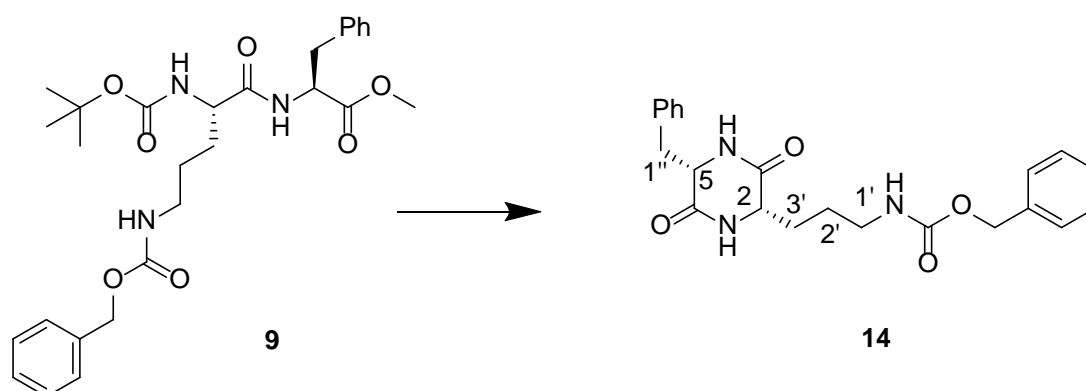


## HSQC (20)





**(3'-((2S,5S)-5-bencil-3,6-dioxopiperazin-2-il)propil)carbamato de bencilo (14)**



Sintetizado a partir del dipéptido **9** siguiendo el procedimiento general de síntesis de 2,5-dicetopiperazinas obteniéndose el dicetopiperazina (**14**) (1872 mg; 79%).

Sólido cristalino. Cristalizó de MeOH. p.f. 224-225 °C.  $[\alpha]_D = -10$  (*c* 0.33, DMSO) a 25°C.

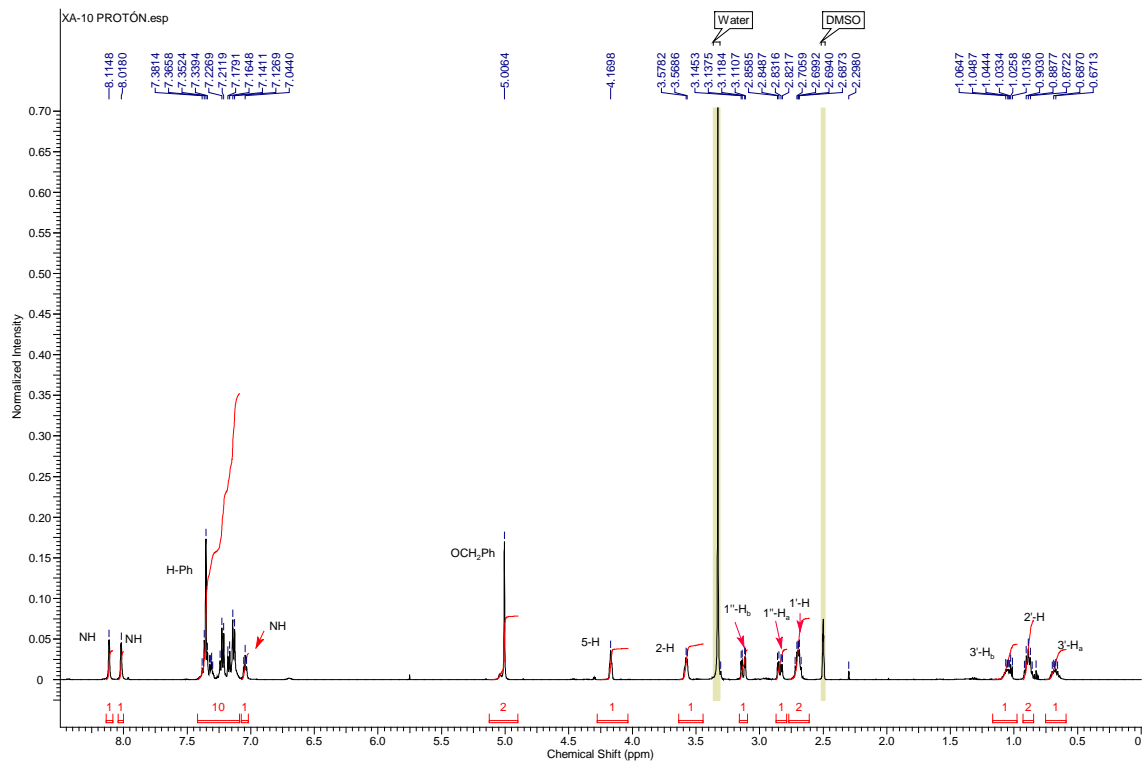
**IR(ATR)**  $\nu_{\text{máx}}$  3298 (NH), 1685, 1635 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>, 25 °C)**  $\delta_{\text{H}}$  0.68 (1H, m, 3'-H<sub>a</sub>), 0.89 (2H, dddd, *J*=7.6, 7.6, 7.6, 7.6 Hz, 2'-H), 1.04 (1H, m, 3'-H<sub>b</sub>), 2.67-2.71 (2H, m, 1'-H), 2.84 (1H, dd, *J* = 13.5, 4.9 Hz, 1''-H<sub>a</sub>), 3.13 (1H, dd, *J* = 13.4, 3.9 Hz, 1''-H<sub>b</sub>), 3.57 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, 2-H), 4.17 (1H, br. s, 5-H), 5.01 (2H, s, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.04 (1H, dd, *J* = 5.7, 5.7 Hz, NH), 7.13 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, H-Ph), 7.17 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-Ph), 7.21-7.24 (2H, m, H-Ph), 7.30-7.38 (5H, m, H-Ph), 8.02 (1H, s, NH), 8.11 (1H, s, NH).

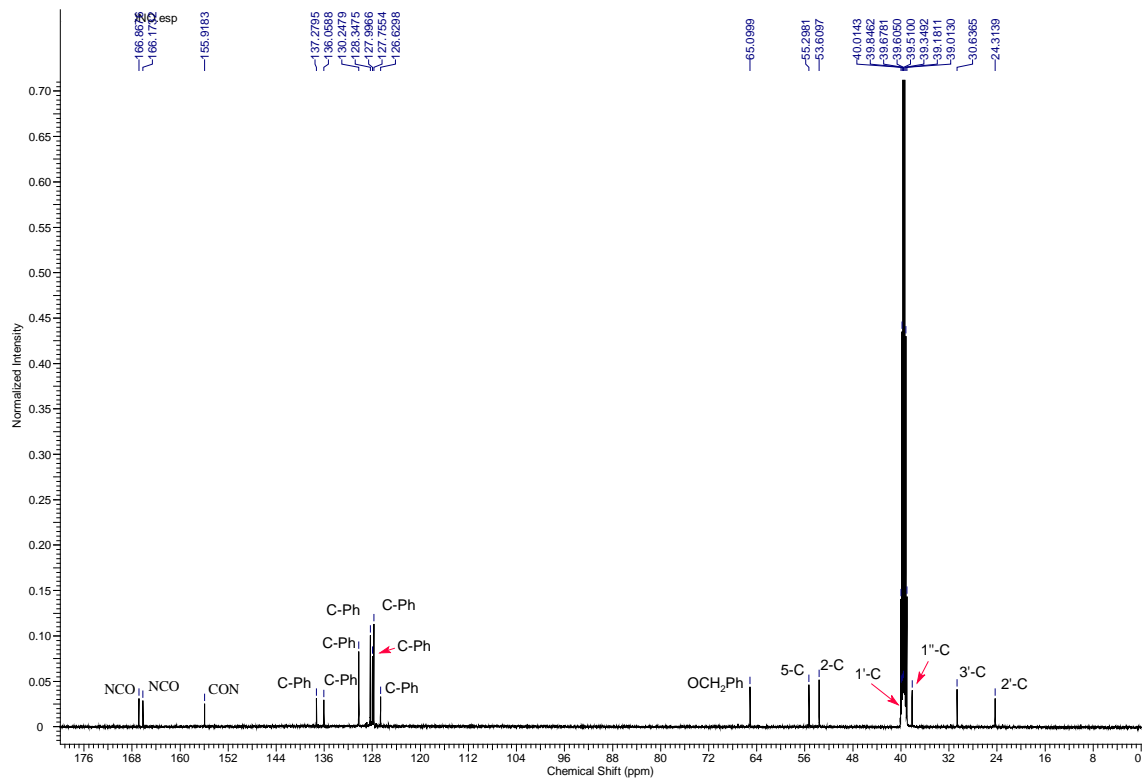
**RMN <sup>13</sup>C (125,7 MHz, (CD<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>, 25 °C)**  $\delta_{\text{C}}$  24.3 (CH<sub>2</sub>, 2'-C), 30.6 (CH<sub>2</sub>, 3'-C), 38.1 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 39.9 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 53.6 (CH, 2-C), 55.3 (CH, 5-C). 65.1 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>Ph), 126.6 (CH, 4-C-Ph), 127.8 (CH, 3 × C-Ph), 128.0 (CH, 2 × C-Ph), 128.3 (CH, 2 × C-Ph), 130.2 (CH, 2 × C-Ph), 136.1 (C, 1-C-Ph), 137.3 (C, 1-C-Ph), 155.9 (C, NCO), 166.1 (C, CON), 166.8 (CON).

**EMAR (ESI)** *m/z* calculado para C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub> [M + Na]<sup>+</sup>, 418,1737 encontrado 418.1731.

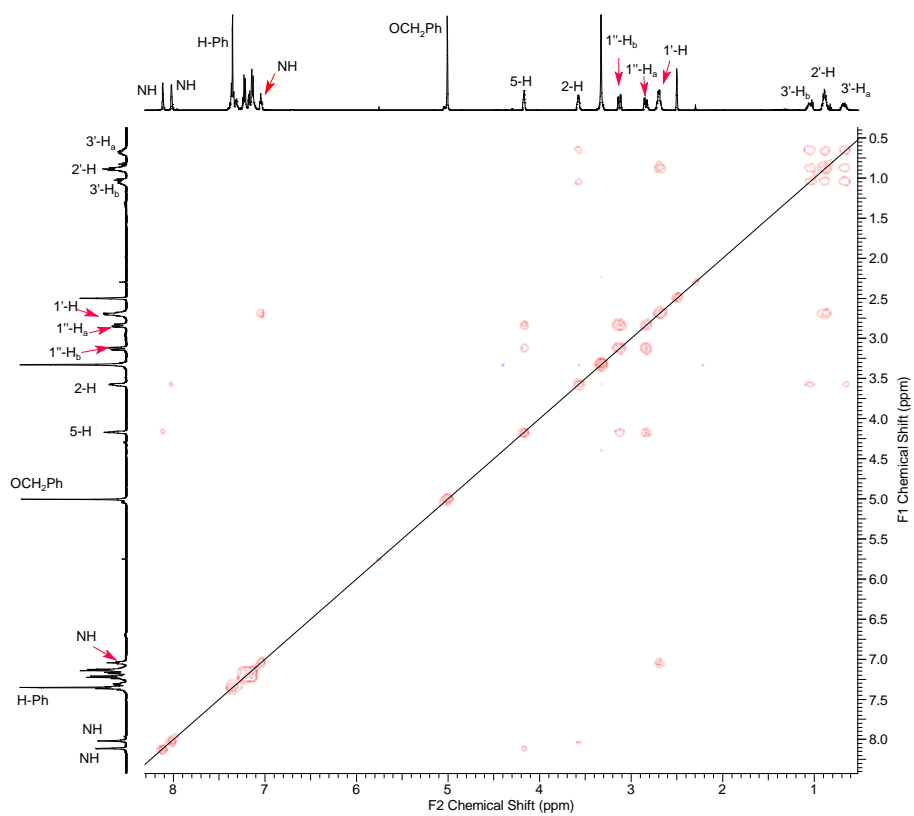
# <sup>1</sup>H-RMN (14)



# <sup>13</sup>C-RMN (14)



## COSY (14)



## HSQC (14)

