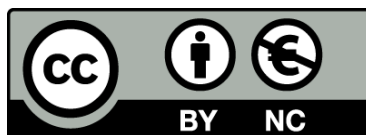


# Iminociclitoles como inhibidores de glicosidasas y su posible aplicación como coadyuvantes en el tratamiento de trastornos metabólicos e infecciones

Livia Gómez Cortés



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License**.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)  
INSTITUTO DE QUÍMICA AVANZADA DE CATALUÑA (IQAC)  
Departamento de química biológica y modelización molecular  
Grupo de biotransformaciones y moléculas bioactivas

BIOGLANE S.L.N.E.

Amb el suport del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament  
d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa de Doctorado de Biotecnología

**Iminociclitoles como inhibidores de glicosidasas y su posible aplicación  
como coadyuvantes en el tratamiento de trastornos metabólicos e  
infecciones**

**Livia Gómez Cortés**

**2013**



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)  
INSTITUTO DE QUIMICA AVANZADA DE CATALUÑA (IQAC)  
Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular  
Grupo de Biotransformaciones y Moléculas Bioactivas

Bioglane S.L.N.E.

Amb el suport del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament  
d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya

UNIVERSIDAD DE BARCELONA,  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
Programa de Doctorado de Biotecnología

**Iminociclitoles como inhibidores de glicosidasas y su posible aplicación  
como coadyuvantes en el tratamiento de trastornos metabólicos e  
infecciones**

Memoria presentada por Livia Gómez Cortés para optar al Título de Doctor por la  
Universidad de Barcelona

Director:

Dr. Pere Clapés Saborit

Tutor:

Dra. Josefa Badía Palacín

Doctorando:

Livia Gómez Cortés

**Livia Gómez Cortés**

**2013**



*The only way of discovering the limits of the possible is  
to venture a little way past them into the impossible*

Arthur C. Clarke



## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco en primer lugar a mi director de tesis, el Dr. Pere Clapés Saborit, así como al Dr. Josep Lluís Torres y a la empresa Bioglane S.L.N.E por ofrecerme la posibilidad de realizar este trabajo. Agradezco también a la Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya (AGAUR) por la ayuda FIE; al grupo de Fisiología y Nutrición Experimental (FINEX) de la facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y a Teresa Rodrigo por instruirme en el manejo de animales de experimentación; y al grupo de Tuberculosis Experimental (UTE) del Instituto Germans Trias i Pujol.

Y especialmente a todos los que, dentro y fuera del laboratorio, me han acompañado durante estos años, sobretodo a los que se fueron en este periodo, porque sin la fuerza que me transmitieron, este trabajo no hubiese sido posible.





## ABSTRACT

---

Iminocyclitols are naturally occurring polyhydroxylated compounds analogues of carbohydrates with a substantial interest as inhibitors of glycosidases and glycosyltransferases. As these enzymes are involved in many biological processes (e.g. carbohydrate digestion in mammals, cell wall biosynthesis in microorganisms and cellular recognition processes) iminocyclitols may lead to potential therapeutic drugs or adjuvants for the treatment of various diseases such as diabetes, bacterial infections and cancer.

The aim of the present work was to study the biological properties of a library of iminocyclitols synthesized in our research group: D-fagomine, L-fagomine, 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB), 1,4-dideoxi-1,4-imino-L-arabinitol (LAB), their aromatic, aminoalcohol and 2-oxopiperazine derivatives, and new piperazines, indolizidines and pirrolizidines. Thus, we explored *in vitro* their inhibitory activity against a panel of commercial glycosidases. Although DAB and LAB were the most effective compounds, the rest of the iminocyclitols tested were shown to be more selective, against  $\alpha$ -D-glucosidases and  $\alpha$ -L-rhamnosidase.

Moreover, these compounds were assayed against intestinal disaccharidases and starch digestion enzymes. D-Fagomine, DAB and LAB showed moderate to potent *in vitro* activity against these enzymes and were also studied *in vivo* as modulators of the postprandial glycaemia using Sprague-Dawley rats. After ingestion together with sucrose or starch they lowered blood glucose in a dose-dependent manner without stimulating insulin secretion, suggesting that they may be used as dietary ingredients to reduce health risks associated with excessive intake of carbohydrates or as drugs for the treatment of diabetes mellitus type 2.

Iminocyclitol derivatives, which are inhibitors of  $\alpha$ -L-rhamnosidase, could also have the ability to inhibit dTDP-L-rhamnose biosynthesis on *M. tuberculosis*, and therefore constitute potential chemotherapeutic agents for tuberculosis. For this reason, the  $\alpha$ -L-rhamnosidase inhibitors found in this work, were assayed on mycobacterial systems and their Minimum Inhibitory Activities (MIC) values were determined. Although some of the new products were able to inhibit the growth of *M. tuberculosis*, they were less

effective than the antibiotic isoniazid. However, we could not establish a correlation between  $\alpha$ -L-rhamnosidase and dTDP-L-rhamnose biosynthesis inhibitory activities because DAB and its aromatic derivatives, which did not inhibit  $\alpha$ -L-rhamnosidase, were active against *M. tuberculosis*. This might indicate that the products are not acting on the target rhamnosidase processing enzymes of the cell wall.

## SUMARIO

---

El Capítulo 1 (Introducción) es una revisión de los principales temas discutidos en esta tesis doctoral: glicosidasas, glicosiltransferasas y sus inhibidores. Contiene una descripción de los iminociclitoles como inhibidores de estas enzimas, sus aplicaciones terapéuticas y las estrategias sintéticas utilizadas para su síntesis por nuestro grupo de investigación.

En el Capítulo 2 (Objetivos) se plantean las diferentes cuestiones a estudiar a lo largo de esta tesis doctoral.

En el Capítulo 3 (Resultados y discusión) se exponen los resultados obtenidos, dividiéndose éstos en los siguientes apartados:

En el Apartado 3.1 se describen las propiedades inhibitorias de los iminociclitoles frente a diferentes glicosidasas de origen comercial

En el Apartado 3.2 se discuten sus propiedades *in vitro* sobre la digestión de carbohidratos en la mucosa intestinal de rata, describiéndose su actividad frente a disacaridasas intestinales,  $\alpha$ -amilasas y amiloglicosidasas

En el Apartado 3.3 se presentan los resultados de los estudios de las propiedades *in vivo* de D-fagomina, DAB y LAB sobre la digestión de carbohidratos (sacarosa y almidón) en ratas. Además, se introducen los resultados obtenidos en una prueba piloto, realizada en el mismo modelo animal para determinar el efecto a largo plazo del compuesto D-fagomina administrado en una dieta combinada rica en lípidos y glúcidos

En el Apartado 3.4 se describen las propiedades de los compuestos de este trabajo que resultaron inhibidores de la actividad de la enzima  $\alpha$ -L-

rhamnosidasa como inhibidores del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis

El capítulo 4 (Conclusiones) es una síntesis de los resultados obtenidos

En el capítulo 5 (Sección experimental) se describen las diferentes metodologías empleadas en los diferentes estudios

Las referencias bibliográficas se agrupan en el capítulo 6 (Bibliografía)

Por último, en el capítulo 7 (Publicaciones) se recopilan los diferentes artículos a los que han dado lugar los experimentos realizados en este trabajo de investigación

Otras colaboraciones con miembros de este y otros grupos de investigación cuyos resultados no se detallan en este trabajo de tesis y que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Padró M, Castillo JA, Gómez L, Joglar J, Clapés P, de Bolós C. ***Cytotoxicity and enzymatic activity inhibition in cell lines treated with novel iminosugar derivatives***. 2010, *Glycoconj J.*; 27(2):277-85

Calveras J, Egado-Gabás M, Gómez L, Casas J, Parella T, Joglar J, Bujons J, Clapés P. : ***Dihydroxyacetone phosphate aldolase catalyzed synthesis of structurally diverse polyhydroxylated pyrrolidine derivatives and evaluation of their glycosidase inhibitory properties***. 2009. *Chemistry*, 15(30):7310-28.

Finalmente, en el CD adjunto, se añade el material adicional, un compendio de las representaciones gráficas dosis-respuesta que se utilizaron para la determinación de los valores de IC<sub>50</sub>; de los diagramas de Lineweaver-Burk con los que se determinaron los valores de k<sub>i</sub> y los tipos de inhibición de la colección de compuestos frente a las diferentes glicosidasas estudiadas; y de las fotografías de las placas de los ensayos

realizados sobre cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Carbohidratos, glicoconjugados y las enzimas que los procesan: glicosidasas y glicosiltransferasas</b>	<b>23</b>
1.1.1 Mecanismo de glicosidasas y glicosiltransferasas	26
Mecanismo de glicosidasas	26
Mecanismo de glicosiltransferasas	28
1.1.2 Inhibidores de Glicosidasas y glicosiltransferasas	29
Inhibidores de glicosidasas	29
Inhibidores de glicosiltransferasas	33
<b>1.2 Iminociclitoles</b>	<b>34</b>
<b>1.3 Uso terapéutico de los iminociclitoles como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas</b>	<b>36</b>
1.3.1 Agentes antidiabéticos	37
1.3.1.1 Inhibidores de glicosidasas intestinales: control de la digestión de carbohidratos y modulación de la glicemia postprandial	39
1.3.1.2 Inhibidores de glicógeno sintasa y glicógeno fosforilasa: modulación de la síntesis e hidrólisis de glicógeno en hígado, músculo y cerebro	47
1.3.2 Agentes anti infectivos: antimicrobianos, antivirales y antiparasitarios	50
1.3.2.1 Antibacterianos	50
1.3.2.2 Agentes antivirales	54
1.3.3 Agentes anticancerígenos	55
1.3.3.1 Inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas y cáncer	57
1.3.3.2 Inhibidores $\alpha$ -L-fucosiltransferasas: terapia anti cáncer	57
<b>1.4 Síntesis de iminociclitoles</b>	<b>58</b>
1.4.1 Síntesis quimo-enzimática de D-fagomina y sus derivados N-alquilados	60
1.4.2 Síntesis quimo-enzimática de DAB, LAB y conjugados, usando FSA 129S/A165G y RhuA respectivamente	60
1.4.3 Síntesis quimo-enzimática de pirrolizidinas usando la aldolasa L-fuculosa-1-fosfato(FucA) con la mutación F131A	63
1.4.4 Síntesis quimo-enzimática de indolizidinas y quinolizidinas polihidroxiladas	64
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>67</b>
<b>2.1 Objetivos generales</b>	<b>69</b>



<b>2.2 Objetivos Concretos</b>	<b>69</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Iminociclitos como inhibidores de la actividad de glicosidasas comerciales de diferentes orígenes</b>	<b>73</b>
3.1.1 Propiedades inhibitorias de DAB, LAB, D-fagomina y L-fagomina	75
3.1.2 Propiedades inhibitorias de derivados de DAB) y LAB	78
3.1.3 Propiedades inhibitorias de los nuevos iminociclitos del tipo pirrolizidinas	92
3.1.4 Propiedades inhibitorias de nuevos iminociclitos de tipo indolizidina y quinolizidina	96
3.1.5 Discusión	100
<b>3.2 Propiedades inhibitorias de los iminociclitos sobre las disacaridasas de la mucosa intestinal y otras enzimas relacionadas con la digestión de carbohidratos en el tracto digestivo</b>	<b>103</b>
3.2.1 Propiedades inhibitorias de los compuestos DAB, LAB, D-fagomina y L-fagomina	105
3.2.1.1 Efecto sobre las disacaridasas intestinales	105
3.2.1.2 Efecto sobre la hidrólisis de almidón	106
3.2.4 Propiedades inhibitorias de derivados de DAB y de LAB	108
3.2.3 Propiedades inhibitorias de nuevos iminociclitos derivados de pirrolizidinas polihidroxiladas	111
3.2.3.1 Efecto sobre las disacaridasas intestinales	111
3.2.4 Propiedades inhibitorias de nuevos iminociclitos del tipo indolizidina y quinolizidina	113
3.2.3.1 Efecto sobre las disacaridasas intestinales	113
3.2.4.2 Efecto sobre la hidrólisis de almidón	115
3.2.5 Discusión	117
<b>3.3 Evaluación de la actividad de los compuestos D-fagomina, LAB y DAB</b>	<b>119</b>
3.3.1 Efecto de la D-fagomina	120
3.3.1.1 Efecto de D-fagomina sobre la glucemia postprandial	122
3.3.1.2 Efecto de la D-fagomina sobre la actividad de las disacaridasas intestinales sobre dos tipos de muestras, homogeneizado de tejido y sacos evertidos, comparado con el de los productos Acarbosa, Miglitol y DNJ	128
3.3.1.2 Efecto de la d-fagomina sobre la agregación bacteriana y la adhesión al epitelio intestinal	129
3.3.1.4 Efecto de la D-fagomina a largo plazo en una dieta combinada rica en grasas y carbohidratos	130
3.3.2 Evaluación de la actividad de DAB y LAB sobre la digestión de sacarosa y almidón <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	134
3.3.2.1 Efecto de los productos DAB y de LAB sobre la glicemia postprandial	135

3.3.3	Discusión	139
<b>3.4</b>	<b>Efecto de los productos inhibidores de <math>\alpha</math>-L-rhamnosidasa sobre el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>143</b>
3.4.1	Efecto de nuevos iminociclitoles del tipo indolizidinas y quinolizidinas	144
3.4.2	Propiedades inhibitorias de derivados de DAB Y LAB conjugados con aminas aromáticas	144
3.4.3	Revisión de los resultados	146
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>149</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>155</b>
5.1	Productos estudiados	157
5.2	Ensayos de inhibición enzimática sobre glicosidasas comerciales	161
5.3	Ensayos de inhibición enzimática sobre disacaridasas intestinales y otras enzimas que degradan almidón	164
5.4	Estudio <i>in vivo</i> sobre el efecto de iminociclitoles	169
5.4.1	Estudio a corto plazo sobre la modulación de la glicemia postprandial	169
5.4.2	Intervención nutricional. Estudio del efecto de D-fagomina sobre una dieta combinada rica en sacarosa y grasas (high fat-high sucrose)	172
5.5	Efecto de los iminociclitoles sobre el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	177
5.5.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método REMA	177
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>181</b>
<b>7.</b>	<b>PUBLICACIONES</b>	<b>191</b>



## ABREVIATURAS

---

AUC: *Area under the curve*, Área bajo la curva

Cbz: grupo protector carboxibenziloxi

DAB: 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

DNJ: 1-deoxinojirimicina

GIP: Gastric Inhibitory Polypeptide

GLP-1: Glucagon-like Peptide-1

IC<sub>50</sub>: Concentración que causa una reducción de la actividad enzimática del 50%

Ki: Konstante de inhibición

LAB: 1,4-dideoxi-1,4-imino-L-arabinitol

MIC: Concentración mínima inhibitoria

NIDDM: Diabetes Mellitus No Insulinodependiente, Diabetes mellitus tipo 2

NJ: nojirimicina

SEM: Error Estándar de la Media



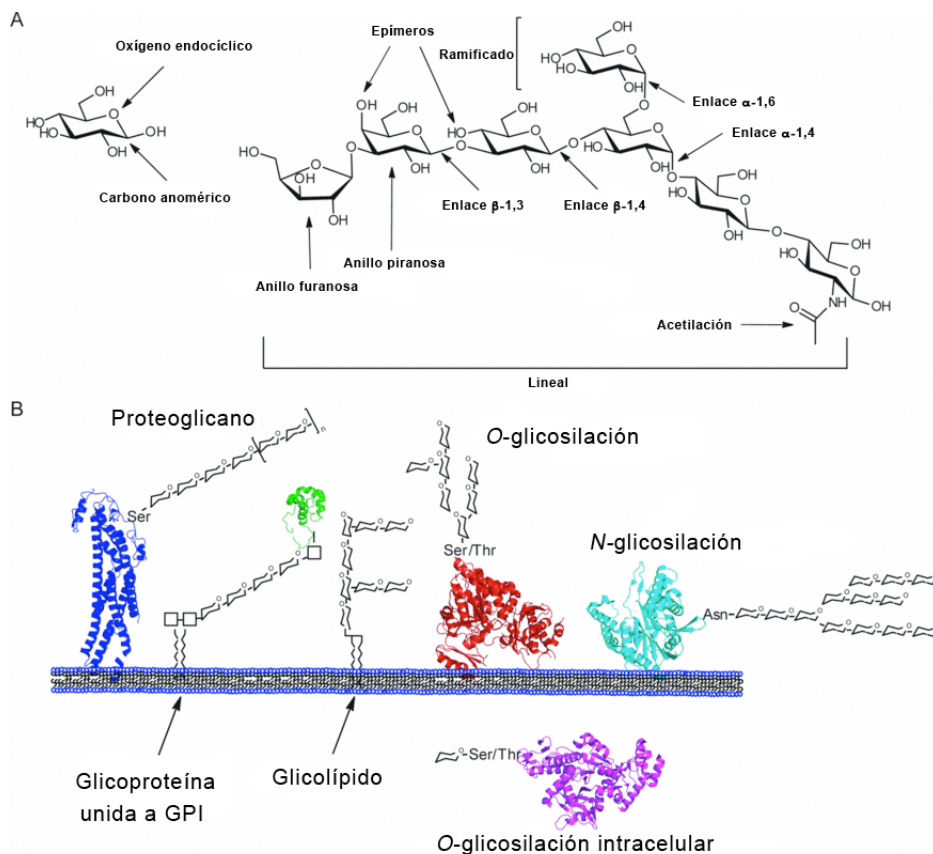
# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 Carbohidratos, glicoconjugados y las enzimas que los procesan: glicosidasas y glicosiltransferasas

Los glúcidos o carbohidratos son biomoléculas esenciales para la vida, que en su forma más simple (monosacáridos) constituyen la fuente de energía principal de los organismos vivos. La mayoría de carbohidratos se encuentra en forma de moléculas complejas como glicanos (oligosacáridos y polisacáridos) y glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos). Los glicanos y glicoconjugados, que comprenden moléculas de diferentes estructuras y tamaños, desde cadenas lineales hasta estructuras ramificadas<sup>[1]</sup> (Figura 1.1.1), tienen un papel fundamental en la fisiología celular y en el desarrollo de microorganismos, plantas y animales.



**Figura 1.1.1.** A) Diversidad de las estructuras de los glicanos. B) Diferentes tipos de glicosilación en proteínas y lípidos<sup>[2]</sup>

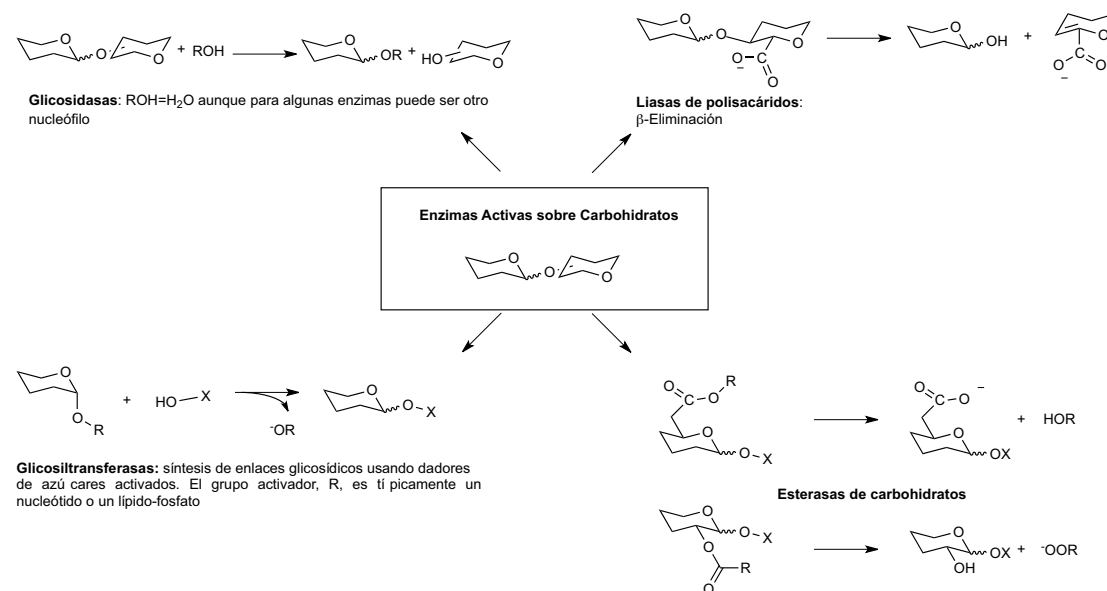
Por ejemplo, los glicoconjugados de la superficie celular, que constituyen gran parte de la matriz extracelular, ejercen una función estructural básica para el



mantenimiento de la integridad y organización tisular. La más importante es que muchos de ellos participan activamente en los procesos de interacción, reconocimiento y adhesión célula-célula, y actúan como receptores para algunos virus, bacterias, toxinas y otros patógenos<sup>[3]</sup>.

La regulación de las funciones de los carbohidratos requiere enzimas que modulen su síntesis y degradación<sup>[4]</sup>. Entre el 1 y el 5% del genoma de la mayoría de organismos codifica enzimas responsables de la degradación y biosíntesis de glicanos<sup>[5]</sup>.

Desde septiembre de 1998 está disponible en la red una base de datos, CAZY (Carbohydrate Active enZymes, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)), dedicada a presentar y analizar la información genómica, estructural y bioquímica de estas enzimas<sup>[6]</sup> que se agrupan en familias según las similitudes de sus secuencias de aminoácidos. Estas familias se distribuyen a su vez en 4 clases o superfamilias en función del tipo de actividad que presentan: glicósido hidrolasas (EC 3.2.1.-), glicosiltransferasas (EC 2.4.x.y.), liasas de polisacáridos (EC 4.2.2.-) y esterasas de carbohidratos (Figura 1.1.2).



**Figura 1.1.2.** Clases de enzimas activas sobre carbohidratos de la base de datos CAZY<sup>[5]</sup>

Este trabajo se ocupa principalmente de la súper familia de glicósido hidrolasas (glicosidasas) y en menor medida de la súper familia de glicosiltransferasas. Hasta la fecha se han clasificado 130 familias de glicosidasas (GH glucósido hidrolasas)

<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> y 94 familias de glicosiltransferasas (GT) <http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html><sup>[2-4, 7]</sup>.

### Glicosidasas

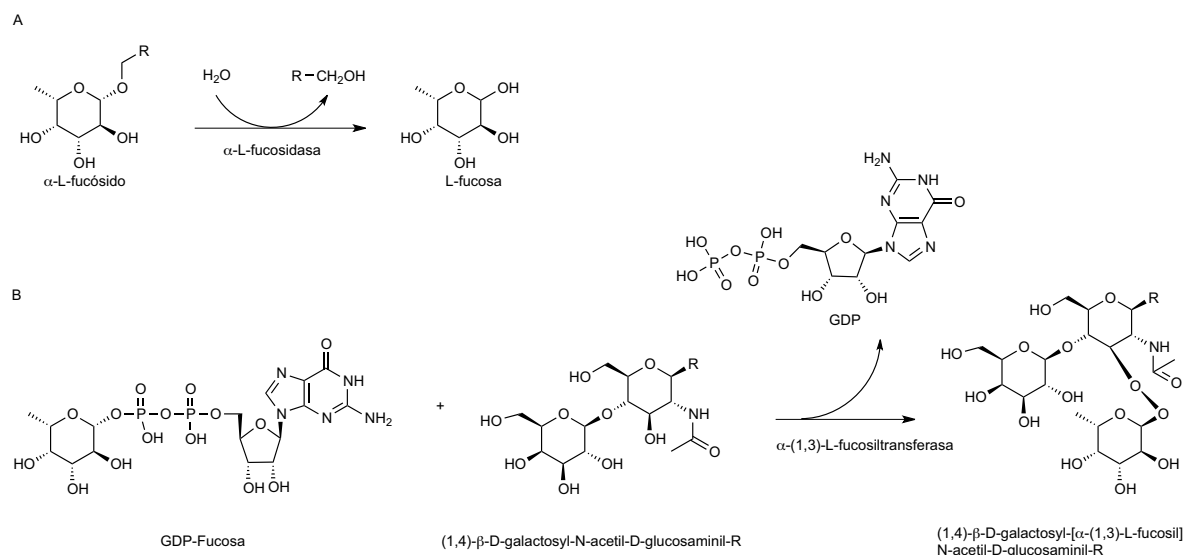
Las glicosidasas son las enzimas hidrolíticas responsables de la degradación de carbohidratos (catabolismo). Catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos en oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados. Normalmente las glicosidasas se denominan según la unidad de azúcar que procesan: glucosidasas si se trata de glucosa, galactosidasas si se trata de galactosa, manosidasas si se trata de manosa; etc.; y de la orientación del enlace glicosídico que hidrolizan ( $\alpha$ - o  $\beta$ -), por ejemplo  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa (Figura 1.1.3 A). Se clasifican además en función de la zona del oligosacárido o polisacárido, libre o conjugado, en la que actúan: si hidrolizan residuos de los extremos se denominan exoglicosidasas; y si hidrolizan residuos centrales se denominan endoglicosidasas<sup>[2]</sup>.

### Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la formación de enlaces glicosídicos y son responsables de la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados (anabolismo), por lo que requieren dos sustratos: un sustrato dador de azúcar; y un aceptor. Los sustratos dadores son moléculas que contienen un grupo fosfato, normalmente azúcares nucleósido difosfato (UDP-Glucosa, UDP-Galactosa, GDP-Manosa), pero pueden utilizar también azúcares nucleósido monofosfato (CMP NeuAc) u otras moléculas que contengan fosfatos. Las glicosiltransferasas dependientes de azúcares nucleótido mono o difosfato se denominan enzimas Leloir en honor a Luis F. Leloir, descubridor del primer azúcar nucleótido y premio Nobel de química en 1970<sup>[8]</sup>. Las glicosiltransferasas que no utilizan nucleótidos como dadores se denominan glicosiltransferasas no Leloir, estas enzimas utilizan otros dadores como poliprenol fosfato, poliprenol pirofosfato, azúcar-1-fosfato o azúcar-1-pirofosfato.

Los sustratos aceptores utilizados por las glicosiltransferasas suelen ser glúcidos, pero pueden ser también lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, antibióticos y otras moléculas de bajo peso molecular<sup>[8]</sup>.

Del mismo modo que las glicosidasas, las glicosiltransferasas se pueden clasificar según los sustratos que utilizan, por la configuración anomérica del enlace formado y por la posición en la que se transfiere<sup>[3]</sup>. Por ejemplo  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferasa (Figura 1.1.3 B).



**Figura 1.1.3.** Ejemplo de glicosidasas y glicosiltransferasas. A)  $\alpha$ -L-fucosidasa. B)  $\alpha$ -1,3-L-fucosiltransferasa

### 1.1.1 Mecanismo de glicosidasas y glicosiltransferasas

#### **Mecanismo de glicosidasas**

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico libera un azúcar hemiacetal con la misma configuración que el sustrato o con configuración opuesta, retención o inversión de la configuración anomérica respectivamente (Figura 1.1.1.1)<sup>[9]</sup>.

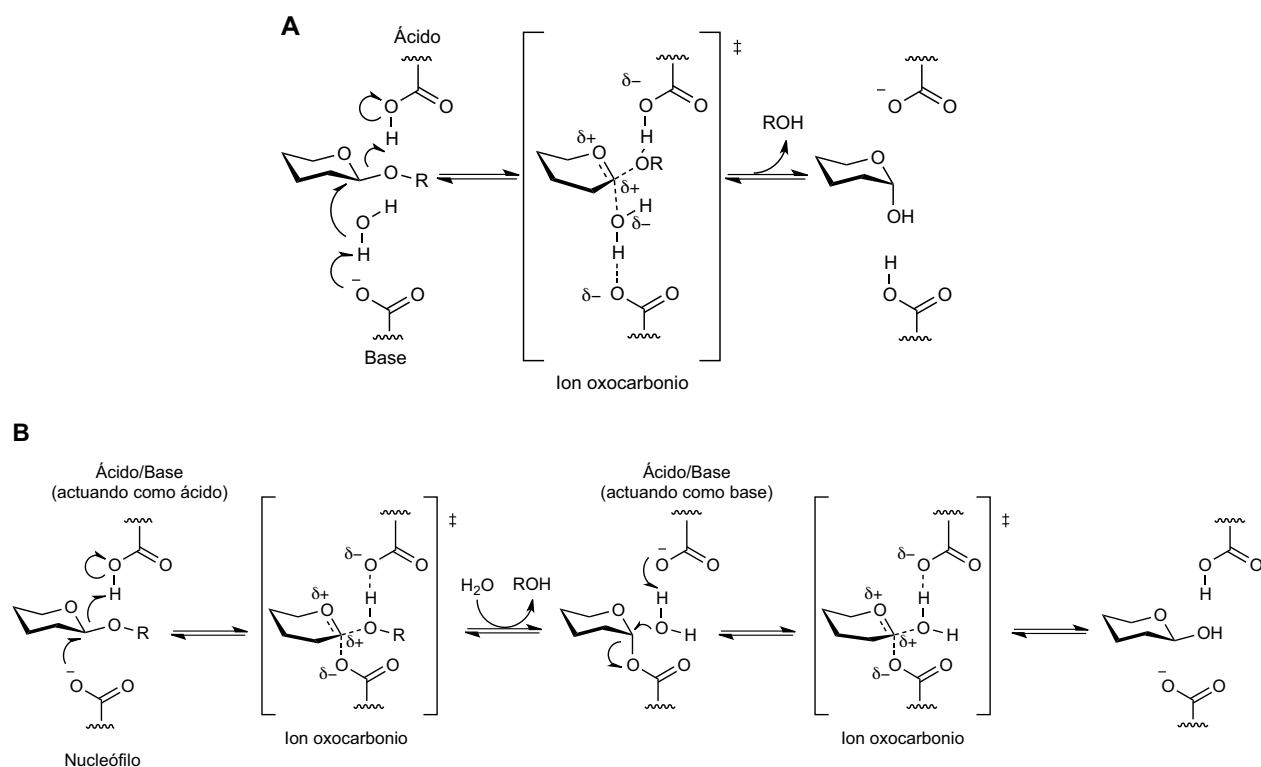
El primer mecanismo catalítico fue propuesto por Koshland en 1953<sup>[10]</sup>, y después de casi 60 años, con algunas excepciones, ha sido confirmado por la mayoría de investigaciones<sup>[4, 7, 9, 11]</sup>.

En general, las glicosidasas contienen dos residuos carboxilato (aspártico/glutámico) responsables de la hidrólisis en su centro catalítico.

La inversión de la estereoquímica sucede en un solo paso que permite al sustrato y a la molécula de agua unirse simultáneamente (mecanismo S<sub>N</sub>2). En este proceso uno de los residuos catalíticos del enzima actúa como ácido y el otro como base. El

residuo que actúa como ácido protona el oxígeno glicosídico y la base desprotona una molécula de agua produciéndose el ataque nucleofílico de ésta en el carbono anomérico y la eliminación del grupo saliente con la consecuente inversión de la estereoquímica<sup>[7]</sup> (Figura 1.1.1.1 A).

La retención de la estereoquímica es un mecanismo de doble desplazamiento que consiste en dos pasos de inversión (Figura 1.1.1.1 B). En este proceso intervienen dos residuos carboxílicos (residuos catalíticos) del enzima, uno de los cuales actúa como ácido/base y el otro como especie nucleofílica. Durante el primer paso de la reacción (glicosilación) el residuo ácido/base actúa como ácido y protona el oxígeno glicosídico, al mismo tiempo se produce el ataque nucleofílico del otro residuo en el carbono anomérico, que conduce a la formación del intermediario covalente glicosil-enzima con configuración anomérica invertida. Se trata de un intermediario del tipo ion oxocarbonio que estabiliza el estado de transición. En el segundo paso (deglicosilación) el residuo ácido/base actúa como base y desprotona una molécula de agua activando su nucleofilia, lo que facilita el ataque en el carbono anomérico y el desplazamiento del glicósido<sup>[7]</sup>.



**Figura 1.1.1.1.** Mecanismo de hidrólisis de las glicosidasas. (A) Inversión de la estereoquímica.(B)

Retención de la estereoquímica<sup>[3, 12]</sup>

### ***Mecanismo de glicosiltransferasas***

El mecanismo de las glicosiltransferasas es menos conocido que el de las glicosidasas y más difícil de estudiar principalmente por dos motivos: porque suele tratarse de enzimas asociadas a la membrana celular, que son difíciles de obtener en gran cantidad, en forma soluble y activa; y porque, al tratarse de enzimas que catalizan reacciones bimoleculares que requieren dos sustratos, dador y aceptor, los procesos que catalizan son más complejos <sup>[2]</sup>.

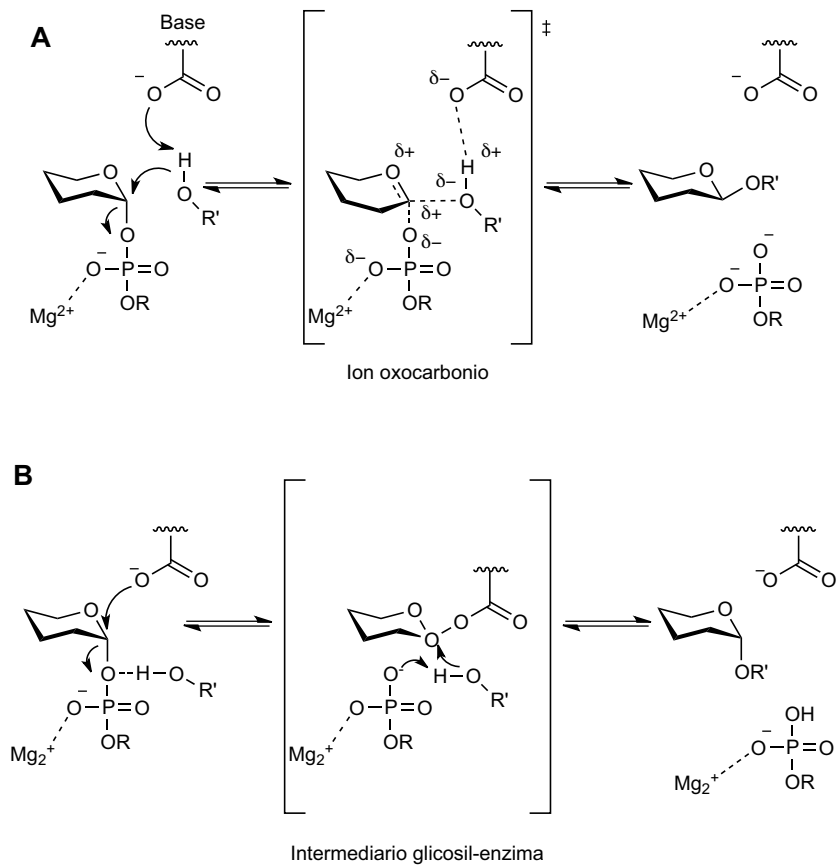
Sin embargo, por lo que se refiere al mecanismo catalítico, existe cierta homología con el de las glicosidasas, ya que la transferencia del glucósido para generar el enlace glicosídico, puede dar lugar también a inversión o retención de la estereoquímica (Figura 1.1.1.2) <sup>[8]</sup>.

Se ha propuesto que las glicosiltransferasas que invierten la estereoquímica utilizan un mecanismo de desplazamiento directo  $S_N2$  donde la salida del grupo de salida y el ataque nucleofílico cursan simultáneamente (Figura 1.1.1.2 A). Este ataque está facilitado por la transferencia de protón de la base catalítica. La base catalítica es en general un residuo con un grupo carboxilo, pero puede tratarse también de un residuo histidina que interactúe con un grupo carboxilo cercano <sup>[2]</sup>.

Aunque el mecanismo de retención es menos conocido existen algunas teorías que proponen un mecanismo de doble inversión análogo al de las glicosidasas vía intermediario covalente, recientemente se ha sugerido que esto se produce por un mecanismo del tipo  $S_Ni$  (sustitución nucleofílica interna) <sup>[13]</sup> (Figura 1.1.1.2 B).

Las glicosiltransferasas resueltas hasta la fecha adoptan tres tipos de estructuras diferentes que conforman tres súper familias: GT-A, GT-B y GT-C <sup>[8]</sup>.

Las glicosiltransferasas de la familia GT-A son dependientes de iones metálicos divalentes, por ejemplo  $Mg^{2+}$ , que estabilizan la carga negativa del grupo fosfato para ayudar a la salida de este grupo <sup>[8]</sup>. Las enzimas de la familia GT-B no dependen de iones metálicos, utilizan residuos cargados positivamente del centro activo o una hélice  $\alpha$  para estabilizar la carga negativa <sup>[2]</sup>. Las glicosiltransferasas de la última familia, GT-C, se conocen poco. La primera estructura de este grupo se resolvió recientemente, y se cree que se trata de una familia de proteínas integrales de membrana <sup>[3]</sup>.



**Figura 1.1.1.2.** Mecanismo propuesto para las glicosiltransferasas. **(A)** Inversión de la estereoquímica. **(B)** Retención de la estereoquímica <sup>[8]</sup>

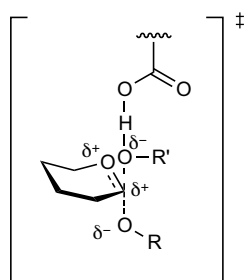
### 1.1.2 Inhibidores de Glicosidasas y glicosiltransferasas

Debido a su papel esencial en los procesos biológicos, glicosidasas y glicosiltransferasas constituyen importantes dianas terapéuticas. La posibilidad de modular su actividad ha cobrado interés en los últimos años, en los que se están diseñando y sintetizando nuevos inhibidores. Además, estos inhibidores, constituyen herramientas importantes para el estudio de los mecanismos de las diferentes familias de enzimas a las que inhiben<sup>[3]</sup>.

#### ***Inhibidores de glicosidasas***

Linus Pauling postuló en los años 40 que los inhibidores de glicosidasas que imitaban mejor las características del estado de transición de la reacción enzimática eran los

que presentaban mayor afinidad por la enzima<sup>[14]</sup>. Hoy día existe cierta controversia en este campo, puesto que no se ha demostrado que esta regla se cumpla en todos los casos, no está claro aún si los inhibidores de glicosidasas son miméticos del estado de transición, si mimetizan al sustrato en su estado natural o si forman interacciones fortuitas con la enzima<sup>[2, 7, 11, 15]</sup>. A pesar de ello, en general, los inhibidores de glicosidasas siguen considerándose análogos del estado de transición del proceso enzimático, que se forma durante un corto espacio de tiempo, en el proceso de hidrólisis. La estructura formada durante el estado de transición posee carácter de ión oxocarbonio (carbocación), que estructuralmente consiste en uniones parcialmente formadas entre el carbono anomérico, el oxígeno glicosídico y la molécula de agua responsable del ataque, y entre el carbono anomérico y el nucleófilo (Figura 1.1.2.1).



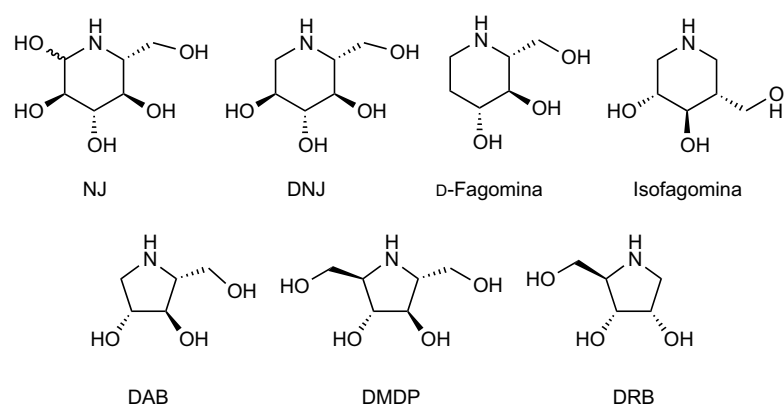
**Figura 1.1.2.1.** Estructura propuesta para el estado de transición de las glicosidasas<sup>[3]</sup>

El inhibidor protonado mimetiza por tanto, el estado de transición del sustrato natural protonado. Para ello son importantes tanto la analogía estructural como la forma y la carga. Así, los inhibidores de glicosidasas pueden clasificarse en cuatro grupos en función de las características del estado de transición que mimetizan: a) miméticos de carga; b) miméticos de forma; c) miméticos de carga y forma; y d) miméticos de combinación aglicona<sup>[3]</sup>.

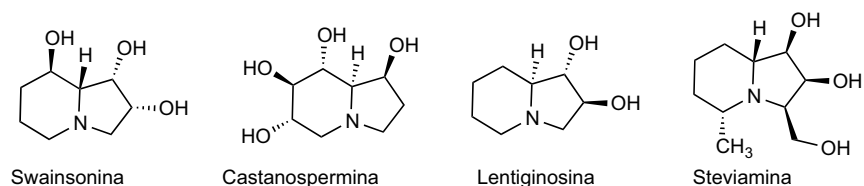
#### *a) Miméticos de carga*

Los miméticos de carga son, en general, anillos de cinco (pirrolidinas), seis (piperidinas) o siete (azepanos) carbonos que contienen un átomo de nitrógeno. Estas moléculas mimetizan la distribución de carga del ion oxocarbonio en el estado de transición. El nitrógeno toma la posición del oxígeno endocíclico del sustrato

análogo (iminociclitolos o iminoazúcares), o del carbono anomérico (isoiminoazúcares). Por ejemplo las piperidinas nojirimicina (NJ), 1-deoxinojirimicina (DNJ), D-fagomina e isofagomina; pirrolidinas como 4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (DAB), 2,5-dideoxi-2,5-imino-D-manitol (DMDP), 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol (DRB) (Figura 1.1.2.2), así como sistemas de anillos fusionados, swainsonina, castanospermina, lentiginosina y steviamina (Figura 1.1.2.3). Estos compuestos y sus derivados han demostrado ser inhibidores de una gran variedad de glicosidasas<sup>[16]</sup>.



**Figura 1.1.2.2.** Estructura de iminociclitolos monocíclicos miméticos de carga



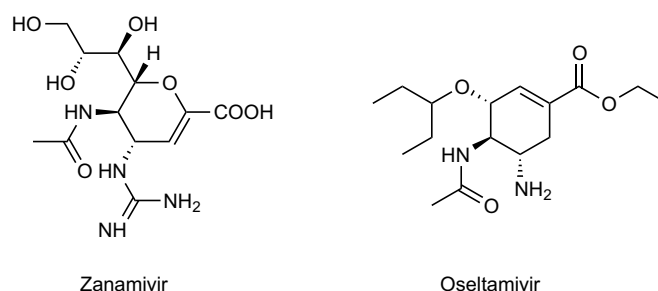
**Figura 1.1.2.3.** Estructura de iminociclitolos bicíclicos miméticos de carga

#### b) Miméticos de forma

Los miméticos de forma son compuestos que emulan la geometría planar del estado de transición mediante la incorporación de un centro trigonal en el centro anomérico y/o el oxígeno endocíclico del sustrato correspondiente, como por ejemplo los inhibidores de neuraminidasa viral, zanamivir (Relenza) y oseltamivir (Tamiflu) (Figura 1.1.2.4), que incorporan un doble enlace endocíclico. Estos compuestos han sido aprobados como agentes terapéuticos y se encuentran



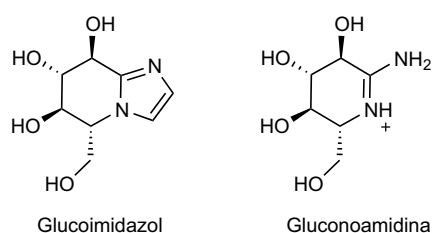
disponibles en el mercado como fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por *influenzavirus*<sup>[17]</sup>.



**Figura 1.1.2.4.** Estructura de compuestos miméticos de forma

### c) Miméticos de carga y forma

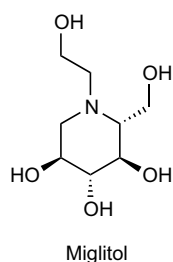
Los miméticos de carga y forma son moléculas más sofisticadas que incorporan características estructurales que les confieren tanto planaridad como carga positiva. Por ejemplo los derivados de glucoimidazol y gluconoamidina (Figura 1.1.2.5)<sup>[16]</sup>.



**Figura 1.1.2.5.** Estructura de compuestos miméticos de carga y forma<sup>[3]</sup>

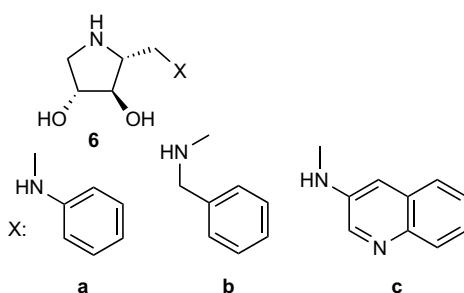
### d) Miméticos de combinación aglicona

Los miméticos de combinación aglicona, incorporan características que les permiten, mimetizando la forma y/o la carga de los sustratos naturales, ocupar el lugar de unión del grupo de salida (aglicona). Una de las estrategias para obtener este tipo de compuestos es la alquilación del nitrógeno endocíclico de los iminociclitoles (miméticos de carga) para incorporar hidrofobicidad<sup>[18]</sup>. Este es el caso del miglitol (Figura 1.1.2.6), un derivado *N*-alquilado de la deoxinojirimicina (Figura 1.1.2.2).



**Figura 1.1.2.6.** Estructura del compuesto miglitol, un derivado de DNJ mimético de aglicona

También se puede mimetizar la aglicona, incorporando grupos aromáticos a los miméticos de forma y carga. Por ejemplo los derivados de **DAB** que incorporan aminas aromáticas (Figura 1.1.2.7) sintetizados en nuestro grupo de investigación por Concia *et al*<sup>[19]</sup>.



**Figura 1.1.2.7.** Estructura de derivados de **DAB** miméticos de aglicona<sup>[19]</sup>

Además, la adición de grupos aromáticos a los miméticos de carga y forma permite obtener inhibidores que incorporen las tres características<sup>[3]</sup>.

En este trabajo de tesis se estudia el efecto de los inhibidores de glicosidasas del tipo iminociclitol o iminoazúcar (miméticos de carga) y del tipo combinación aglicona.

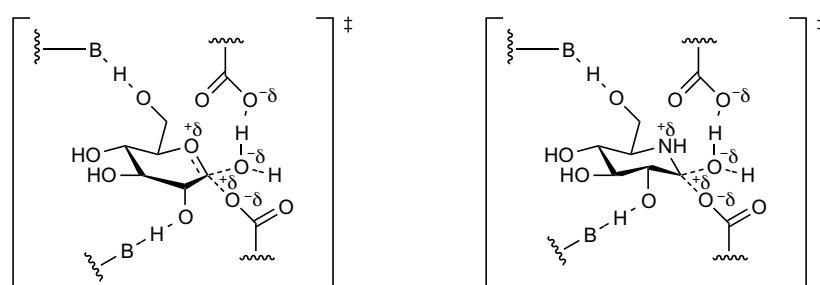
### ***Inhibidores de glicosiltransferasas***

Existen pocos estudios que definan las estructuras que se forman en el estado de transición durante la catálisis de las glicosiltransferasas, pero como en el caso de las glicosidasas, parece que posee carácter de ión oxocarbonio<sup>[8]</sup>. Se pueden aplicar muchos de los principios explicados para los inhibidores de glicosidasas, sin embargo, al tratarse de enzimas que catalizan reacciones bisustrato (dador y

aceptor), su mecanismo presenta ciertas diferencias: presentan especificidad de unión para el aceptor, pero también requieren especificidad de unión para el dador. La especificidad del dador proviene del azúcar pero también de la base y del grupo fosfato. Por esta razón muchos inhibidores de glicosidasas que mimetizan únicamente al azúcar no ejercen efecto de inhibición sobre las glicosiltransferasas<sup>[2]</sup>. Además, la falta de inhibidores de estas enzimas hace que no existan estructuras tridimensionales de complejos ternarios con los que describir el centro catalítico y determinar la geometría del proceso de transferencia. Se ha observado que el efecto de los inhibidores miméticos de azúcar sobre las glicosiltransferasas se potencia en presencia de UDP, lo que indica que existe un fenómeno de sinergia entre las dos moléculas, probablemente porque para que tenga lugar la inhibición es necesaria tanto la unión de la parte glicosídica como de la base y del grupo fosfato<sup>[20]</sup>.

## 1.2 Iminociclitoles

Los iminociclitoles, también conocidos como iminoazúcares o aza azúcares, son compuestos cíclicos, análogos de carbohidratos, de origen natural o sintético, en los que el oxígeno endocíclico del carbohidrato está sustituido por un nitrógeno (Figura 1.2.1).

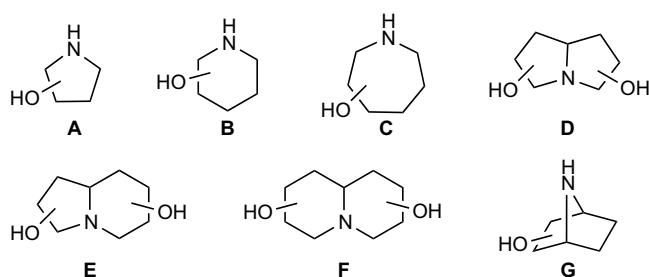


**Figura 1.2.1.** Estructuras formadas durante el estado de transición en  $\alpha$ -glucosidasas, sustrato natural a la izquierda y DNJ a la derecha

Los iminociclitoles mimetizan el estado de transición de la hidrólisis de carbohidratos. El átomo de N presenta mayor densidad de carga positiva y es más estable que el sustrato natural, lo que facilita la interacción dipolo-dipolo entre el par iónico inhibidor-residuo y el anión carboxilato del centro activo. Otros factores que influyen en el poder de inhibición de estos compuestos son el grado de

hidroxilación (número, posición y configuración de los grupos hidroxilo), el tamaño, la flexibilidad conformacional del anillo, las interacciones de la aglicona con el centro activo de la enzima y la formación de puentes de hidrógeno u otras fuerzas que estabilizan las interacciones enzima-sustrato en el centro catalítico.

La mayoría de iminociclitos derivan de pirrolidinas (A), piperidinas (B), pirrolizidinas, azepanos (C), indolizidinas (D), quinolizidinas (E) y nortropanos (F) polihidroxilados (Figura 1.2.2)<sup>[21]</sup>.



**Figura 1.2.2.** Estructuras más comunes de los iminociclitos naturales y sintéticos (A) pirrolidinas, (B) piperidinas, (C) azepanos, (D) pirrolizidinas, (E) indolizidinas, (F) quinolizidinas, (G) nortropanos.

Además de grupos hidroxilo, estas estructuras pueden contener otros sustituyentes con distintas funcionalidades. Los iminociclitos naturales contienen ácidos carboxílicos y amidas, pero sus análogos sintéticos, pueden contener otras variaciones<sup>[22]</sup>. Estos compuestos presentan, además, características químicas de monosacáridos y disacáridos, por ejemplo, la configuración espacial de sus grupos hidroxilo coincide con la de los monosacáridos del tipo glucosa, galactosa, manosa, fucosa y ramnosa, facilitando el reconocimiento por glicosidasas y glicosiltransferasas, en algunos casos de forma competitiva con el sustrato natural<sup>[23]</sup>.

Se han aislado alrededor de 100 iminociclitos con actividad inhibidora de glicosidasas y glicosiltransferasas de plantas y microorganismos. La principal fuente de estos alcaloides polihidroxilados es vegetal pero existen algunos ejemplos de origen bacteriano, como la nojirimicina (NJ)<sup>[24]</sup> (Figura 1.1.2.2) o la Swainsonina (Figura 8), una indolizidina descubierta inicialmente en *Swainsona canescens*, y que

se obtuvo posteriormente a partir de cultivos de los hongos *Rhizoctonia leguminicola* y *Metarhizium anisopliae* <sup>[21]</sup>.

El papel de estas moléculas en la naturaleza no está claro, parece que se trata de metabolitos secundarios, que por su capacidad inhibidora de glicosidasas podrían actuar como repelentes de diferentes tipos de depredadores como insectos y aves <sup>[25]</sup>.

### **1.3 Uso terapéutico de los iminociclitoles como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas**

El uso de extractos vegetales ricos en iminociclitoles con fines terapéuticos empezó en las medicinas tradicionales, principalmente en china, dónde era habitual el empleo de hojas de *Morus alba* (morera), posteriormente descubierta como una fuente muy rica en iminociclitoles <sup>[26]</sup>, para el tratamiento del *Xiao-ke*<sup>1</sup><sup>[27]</sup>. Existe constancia también de su uso en occidente, concretamente en el siglo XVII en Europa se recomendaba el aceite de Haarlem<sup>2</sup>, para el tratamiento de la diabetes entre otros usos<sup>[26]</sup>. Sin embargo, a pesar de haber sido usados y de ser beneficiosos para el tratamiento de estas y otras enfermedades, no fue hasta los años 60 cuando se despertó el interés científico por conocer los principios activos (iminociclitoles) de estos extractos<sup>[28]</sup>.

La nojirimicina (NJ) (Figura 1.1.2.2) fue el primer mimético natural de glucosa con actividad inhibidora de  $\alpha$ - y  $\beta$ - glicosidasas descubierto. Este compuesto se obtuvo en 1966 en cultivos de *Streptomyces roseochromogenes* y *Streptomyces nojiriensis* <sup>[24]</sup>. Al tratarse de un producto muy inestable, a partir de él se sintetizó la 1-deoxynojirimicina (DNJ)<sup>[29]</sup> (Figura 1.1.2.2), uno de los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa más potentes. La DNJ resultó ser también un producto natural que fue aislado posteriormente de las raíces de *Morus alba* así como de microorganismos y plantas<sup>[21]</sup>. Estos compuestos, solubles en agua, habían pasado desapercibidos inicialmente, cuando las investigaciones se centraban la obtención de nuevos

---

<sup>1</sup> Diabetes

<sup>2</sup> Un extracto de hojas de *Morus alba*

compuestos de las fracciones orgánicas de los extractos <sup>[22]</sup>. Miglitol, un derivado de la **DNJ** fue el primer fármaco del tipo iminociclitol comercializado para el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) (1996, Glyset)<sup>[30] [29a]</sup>.

Los inhibidores de glicosidasas son interesantes desde el punto de vista terapéutico ya que pueden modificar la actividad tanto de las enzimas que actúan sobre la síntesis y degradación de carbohidratos y glicoconjugados como de las proteínas implicadas en su reconocimiento<sup>[31]</sup>. Este efecto puede aprovecharse para modular procesos como el metabolismo de carbohidratos y glicoconjugados en el aparato digestivo; las interacciones celulares mediadas por carbohidratos (célula-célula o célula huésped-agente infeccioso); la modificación del patrón de glicosilación en células eucariotas; y el plegamiento y transporte de glicoproteínas en el aparato de Golgi y en el retículo endoplasmático<sup>[31]</sup>.

Además, los iminociclitoles presentan ventajas frente a otras moléculas polares de bajo peso molecular ya que: i) son solubles en agua y metabólicamente estables, debido a su alta oxigenación; ii) se absorben en el intestino delgado (en mayor o menor grado dependiendo de la polaridad del compuesto); iii) se metabolizan, o lo hacen en bajo o nulo porcentaje; y iv) son excretados rápidamente e intactos, por vía renal<sup>[32]</sup>.

Aunque hoy en día existen pocos iminociclitoles disponibles en el mercado se está investigando su posible aplicación principalmente como agentes antidiabéticos, anti infecciosos, anti cancerígenos, así como destinados a paliar el efecto acumulativo de las moléculas que no pueden ser degradadas y que se acumulan en el lisosoma en las enfermedades de almacenamiento lisosomal<sup>[22-23, 32]</sup>. En nuestro grupo de investigación se han estudiado las propiedades de los iminociclitoles como agentes antidiabéticos, antiinfecciosos y anticancerígenos.

### **1.3.1 Agentes antidiabéticos**

La diabetes mellitus de tipo 2, o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) es la forma más común de diabetes, según la OMS (Organización Mundial de la Salud) representa el 90% de los casos (300 millones de personas). Es un trastorno

metabólico asociado a obesidad y caracterizado por una elevada concentración de glucosa en sangre (hiperglicemia) debida a una disfuncionalidad de la insulina o de sus receptores en hígado, músculo y tejido adiposo (resistencia a la insulina). En condiciones normales, la insulina es responsable de desencadenar una serie de señales que permiten al organismo mantener un equilibrio entre la disponibilidad y la demanda de nutrientes, por ejemplo activando transportador de glucosa (GLUT 4) en tejido adiposo, muscular y hepático, facilitando así la captación de glucosa de la sangre en estos tejidos. La resistencia a la insulina dificulta este proceso durante el estado postprandial y conduce a una persistencia de la hiperglicemia. Las causas de la resistencia a la insulina no están claras aún, hasta el momento existen tres mecanismos principales que explican su patogénesis: la acumulación ectópica de lípidos; el desarrollo de estrés en el retículo endoplasmático; y la contribución de la inflamación sistémica<sup>[34]</sup>. Durante el estado postprandial, en los individuos sanos, el aumento de glucosa en sangre estimula la liberación de insulina, esta hormona facilita la captación de glucosa en el hígado, el músculo y el tejido adiposo; y estimula además la síntesis de glicógeno; durante el ayuno, la situación se invierte, los niveles de glucosa e insulina bajan y se estimula la liberación de ésta a la sangre a partir de la hidrólisis de glicógeno y la gluconeogénesis en el hígado. En los enfermos de NIDDM resistentes a insulina, la concentración de glucosa se mantiene elevada en el estado postprandial y la insulina se libera más lentamente, siendo incapaz de estimular la captación de glucosa en los tejidos; durante el ayuno la concentración de glucosa en sangre sigue por encima de los niveles normales ya que no ha sido captada en los tejidos, en cambio el hígado sigue liberándola a la sangre a partir de la glicogenólisis y la gluconeogénesis.

Una estrategia para tratar de paliar los efectos tóxicos que tiene para el organismo la elevada concentración de glucosa en sangre, consiste en suplementar la dieta con productos que bloqueen alguna de las vías que contribuyen a aumentar su concentración, usando, por ejemplo, inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas, como los iminociclitolos. Estos compuestos pueden ayudar al control del estado hiperglicémico por dos vías: inhibiendo la hidrólisis de carbohidratos a glucosa en el intestino, reduciendo así la absorción de glucosa<sup>[35]</sup> o

inhibiendo la hidrólisis de glicógeno en el hígado, evitando así la liberación de glucosa a la sangre a partir de este órgano<sup>[36]</sup>.

#### ***1.3.1.1 Inhibidores de glicosidasas intestinales: control de la digestión de carbohidratos y modulación de la glicemia postprandial***

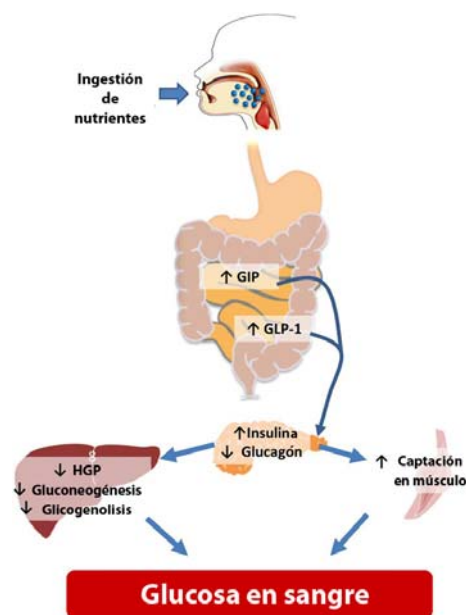
Los carbohidratos representan la fuente de energía principal en la mayoría de dietas, siendo el almidón y la sacarosa los más importantes en la alimentación humana. Estos polímeros y oligómeros deben ser escindidos mediante hidrólisis enzimática en el aparato digestivo para transformarse en moléculas más cortas y finalmente en monosacáridos absorbibles. El proceso de digestión de carbohidratos en mamíferos es un mecanismo complejo en el que están implicadas diferentes enzimas que actúan, de forma secuencial y en paralelo, a lo largo del tracto digestivo. La actividad de estas enzimas se localiza principalmente en la saliva y en la mucosa intestinal, concretamente en las microvellosidades de la membrana apical de los enterocitos del intestino delgado.

La digestión empieza en la boca dónde la entrada del alimento activa la enzima  $\alpha$ -amilasa de las glándulas salivares, que inicia la hidrólisis del almidón. Al entrar en el estómago, esta actividad enzimática se para debido al ambiente ácido del mismo. El vaciado del estómago está influenciado por el nivel de glucosa en sangre, siendo la hiperglicemia un factor que lo enlentece, así como los niveles séricos de GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1), y la composición de la dieta. La degradación de los polisacáridos sigue en el duodeno, donde la  $\alpha$ -amilasa pancreática hidroliza los carbohidratos complejos a oligosacáridos. Éstos se unen a la sacarasa-isomaltasa y otras disacaridasas de la membrana apical de los enterocitos del yeyuno.

Las disacaridasas intestinales, sacarasa ( $\alpha$ -glucosidasa), maltasa ( $\alpha$ -glucosidasa), trehalasa y lactasa ( $\beta$ -galactosidasa), son responsables de la hidrólisis de los disacáridos en sus correspondientes monómeros que son inmediatamente absorbidos. Aunque la mayor parte de los carbohidratos son digeridos y absorbidos en la zona proximal del yeyuno, una parte llega a la zona distal y al íleo donde los niveles de estas disacaridasas son bajos.



La presencia de carbohidratos y de glucosa en el intestino estimula hormonas gastrointestinales que ayudan a las células beta pancreáticas a aumentar la secreción de insulina, adecuándola a la cantidad de carbohidratos: en el duodeno y en la zona proximal del yeyuno, cuando la glucosa es transportada a través de los enterocitos se estimula la liberación de GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) a la sangre; y en el íleo, la presencia de carbohidratos en el lumen estimula la liberación de GLP-1 de las células de la mucosa a la sangre (Figura 1.3.1.1.1).



**Figura 1.3.1.1.1.** Control periférico de la homeostasis de la glucosa después de la ingesta<sup>[37]</sup>. La presencia de carbohidratos en el tracto digestivo estimula la liberación de GIP en el estómago y GLP-1 en el intestino delgado. Estas hormonas estimulan a su vez la liberación de insulina que estimula la captación de glucosa en el hígado, músculo y tejido adiposo; y además inhibe la liberación de esta desde el hígado, reduciendo la gluconeogénesis y la glicogenólisis.

En la NIDDM están alterados muchos aspectos de la regulación gastrointestinal del metabolismo de carbohidratos: la hiperglicemia retrasa el vaciado del estómago; se alteran los niveles de hormonas gastrointestinales; las células beta pancreáticas se hacen relativamente insensibles a la glucosa y se produce un retraso en la secreción de insulina después de la ingesta; y disminuye la captación de glucosa por las células de los tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo), ya que no responden a

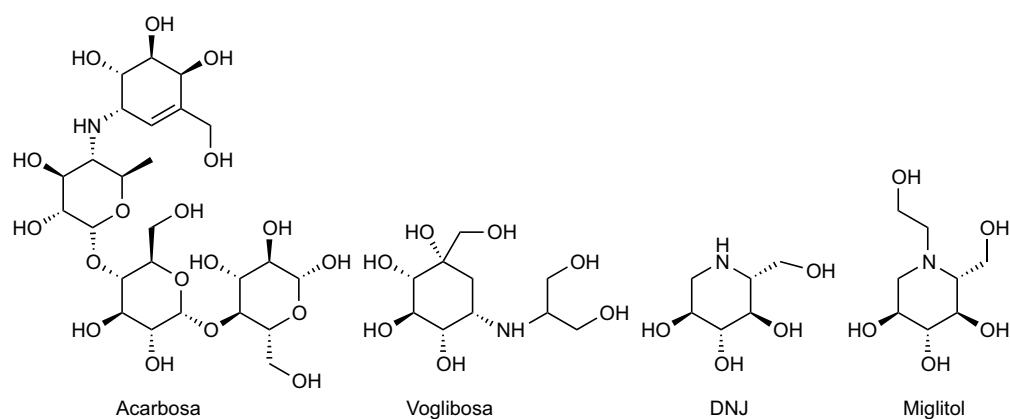
la hormona secretada (resistencia a la insulina), de manera que la hiperglicemia persiste<sup>[35b]</sup>.

Una estrategia para combatir la hiperglicemia y sus consecuencias en el tratamiento de la NIDDM y otros trastornos relacionados consiste en administrar productos que interfieran en la digestión de carbohidratos en el tracto gastrointestinal, concretamente inhibidores de las enzimas responsables de su hidrólisis a glucosa<sup>[28]</sup>.

La inhibición de las enzimas implicadas en la escisión de carbohidratos ( $\alpha$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas y otras disacaridasas), limita su hidrólisis normal, imprescindible para su absorción y en consecuencia, alarga el proceso de digestión a lo largo del tracto intestinal y retrasa la absorción de glucosa, lo que conduce a la reducción de su concentración postprandial<sup>[35a]</sup>. Estos inhibidores deben administrarse con las comidas que contengan carbohidratos pero no glucosa, porque como se ha demostrado, no tienen un efecto significativo sobre la absorción de ésta<sup>[35b-d]</sup>.

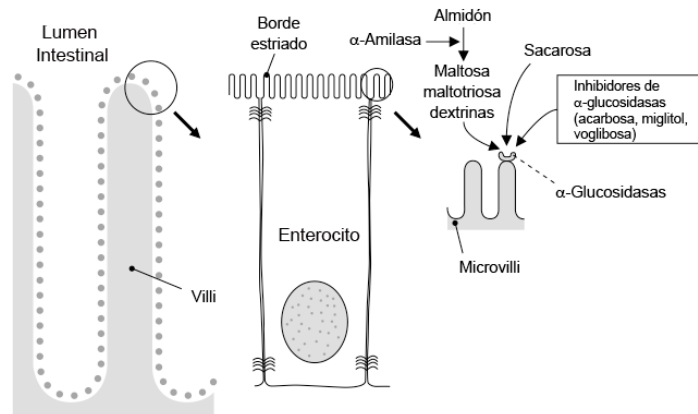
Teniendo en cuenta que estos productos desplazan la absorción de glucosa a zonas más distales del tracto intestinal, alteran la liberación de hormonas gastrointestinales que potencian la secreción de insulina. La liberación de GIP, que se produce principalmente en la mucosa del yeyuno, se reduce y la secreción de GLP-1 en la mucosa del íleo aumenta. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas y  $\alpha$ -amilasas ejercen, por tanto, un efecto indirecto sobre la secreción de hormonas dependientes de glucosa, es decir que atenuando el aumento de los niveles de glucosa postprandial contribuyen también a reducir la concentración de insulina postprandial<sup>[35d]</sup>. La inhibición de las disacaridasas intestinales y de la  $\alpha$ -amilasa pancreática permiten, por tanto, regular la absorción de monosacáridos en el intestino delgado<sup>[35a]</sup>.

Actualmente existen en el mercado tres inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas intestinales indicados para el tratamiento de la NIDDM: la acarbosa (Glucoby®), un pseudotetrasacárido que contiene nitrógeno, que se introdujo en el mercado en Alemania en 1990; la **voglibosa** (Basen®), un derivado de la valiolamina; y el **miglitol** (Glyset®), un derivado de la **DNJ** que se comercializa desde 1996<sup>[35d, 38]</sup> (Figura 1.3.1.1.2).



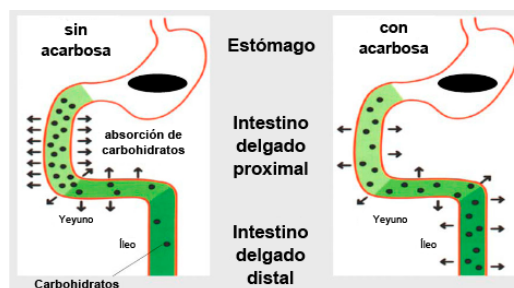
**Figura 1.3.1.1.2.** De izquierda a derecha, estructuras de los inhibidores comerciales de  $\alpha$ -glucosidasas: **acarbosa**, **voglibosa** y **miglitol** (y su precursor **DNJ**)

Mientras los dos primeros proceden de microorganismos, el tercero es de origen sintético. La **acarbosa** fue aislada de cepas de *Actinoplanes sp.* y es un inhibidor de las enzimas de la mucosa intestinal maltasa y sacarasa ( $\alpha$ -glucosidasas) y de la enzima  $\alpha$ -amilasa pancreática<sup>[39]</sup>. La voglibosa es un derivado *N*-sustituido de la **valiolamina** (producida por *Streptomyces hygroscopicus*)<sup>[40]</sup>, que se sintetizó para potenciar su efecto inhibitor sobre las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales sacarasa y maltasa, su efecto sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa pancreática es bajo<sup>[41]</sup>. El compuesto 1-deoxinojirimicina (**DNJ**), uno de los inhibidores más potentes de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*, se había descartado como fármaco por dos motivos: a causa de que su eficacia *in vivo* no es la esperada<sup>[42]</sup>; y por no presentar actividad frente a  $\alpha$ -amilasa. Por estas razones, con el objetivo de optimizar su actividad, se sintetizaron diferentes derivados, entre ellos el **miglitol**. Estudios posteriores replantean la posible aplicación de **DNJ** en el tratamiento de la NIDDM<sup>[43]</sup>. En la figura 1.3.1.1.3 se describen esquemáticamente tanto el mecanismo, como el lugar en el que actúan estas moléculas.



**Figura 1.3.1.1.3.** Mecanismo y lugar de acción de los inhibidores de  $\alpha$ -glicosidasas <sup>[35d]</sup>

**Acarbosa, voglibosa y miglitol** inhiben competitivamente las glucosidasas presentes en la mucosa del intestino delgado. Esta inhibición retrasa la digestión de los carbohidratos complejos (Figura 1.3.1.1.4) en la parte alta del intestino delgado y en consecuencia retrasa la absorción de glucosa y reduce la hiperglicemia postprandial [44].



**Figura 1.3.1.1.4.** Efecto de los inhibidores de  $\alpha$ -glicosidasas sobre la absorción de glucosa a lo largo del tracto digestivo <sup>[38b]</sup>

La acarbosa se absorbe poco, la mayor parte se excreta intacta en heces y el 30% es metabolizada vía fermentación por la microbiota del colon. La voglibosa que también se absorbe poco y lentamente, es rápidamente excretada en heces, dónde hasta la fecha no se han identificado metabolitos<sup>[45]</sup>. En cambio, el miglitol es absorbido completamente en el intestino delgado y excretado rápidamente e intacto en orina<sup>[46]</sup>.

Por su mecanismo de acción, estos productos dan lugar a un conjunto de efectos secundarios. La inhibición de la hidrólisis de carbohidratos en las partes altas del

tracto digestivo hace que éstos lleguen intactos al intestino grueso, dónde son fermentados por la microbiota dando lugar a flatulencia, dolor abdominal y en ocasiones diarrea <sup>[35d]</sup>. Por esta razón se recomienda empezar los tratamientos con dosis bajas de estos compuestos e ir aumentándolas progresivamente para favorecer la adaptación de la flora intestinal. Las dosis recomendadas (tres veces al día) son: acarbosa 100 mg; voglibosa 0,2 mg; y miglitol 50 mg <sup>[35c, 38b, 46]</sup>. La efectividad de estos tratamientos para reducir la concentración de glucosa postprandial depende de la dosis y de la cantidad de carbohidratos ingeridos, y además, para que puedan ejercer su efecto, estos compuestos deben ingerirse al inicio de las comidas <sup>[47]</sup>.

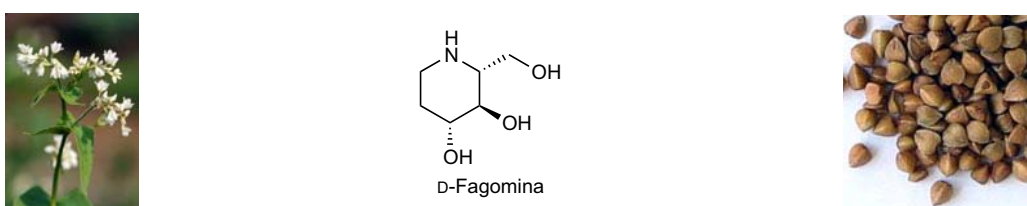
Como los iminociclitolos son miméticos de carbohidratos, en nuestro grupo de investigación se ha planteado además, un nuevo mecanismo de acción de estos compuestos, que es la inhibición selectiva de la adhesión mediada por proteína-carbohidrato de ciertos grupos de bacterias que forman parte de la microbiota intestinal a la mucosa intestinal. Cada vez hay más evidencias de la contribución de la microbiota intestinal al balance energético del organismo huésped, ya que estas bacterias transforman los componentes no digeribles de la dieta en nutrientes absorbibles vía fermentación en el intestino grueso <sup>[48]</sup>, además la microbiota intestinal está modulada por la dieta y tiene un efecto en el fenotipo del huésped, notabmlemente en la acumulación de lípidos. Se ha demostrado la existencia de una relación entre la composición de la microbiota, es decir la abundancia relativa de las principales bacterias fecales, *Bacteroides* y *Firmicutes* <sup>[49]</sup>, y de otros grupos minoritarios, como las *Proteobacterias* y la acumulación de grasa. Demostrándose que una dieta alta en grasa y sacarosa induce un incremento de *E. coli* (*Enterobacteriaceas, Proteobacterias*) <sup>[50]</sup>, y que la acumulación de grasa aumenta en animales que reciben dietas supelementadas con *E. coli*. <sup>[51]</sup>

#### *D-fagomina*

El compuesto (2*R*,3*R*,4*R*)-2-hydroxymethylpiperidine-3,4-diol (**D-fagomina**) (Figura 1.3.1.1.5) es un iminociclitol análogo de la D-glucosa, que se aisló por primera vez de

las semillas del trigo sarraceno<sup>3</sup>[52] y que presenta actividad inhibitoria moderada de  $\alpha$ -glucosidasa<sup>[53]</sup>. Nuestro grupo fue pionero en el descubrimiento de la primera estrategia enzimática, en dos etapas, para la síntesis de este compuesto<sup>[54]</sup>.

Se trata del único iminociclitol conocido presente en la alimentación tradicional<sup>[38a]</sup> en productos elaborados con trigo sarraceno, como las *crêpes* de Bretaña, los soba japoneses, la polenta italiana entre otros<sup>[55]</sup>. Estudios con extractos de trigo sarraceno han demostrado reducir la concentración de glucosa plasmática en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina<sup>[56]</sup>.



**Figura 1.3.1.1.5.** De izquierda a derecha: *fagopyrum esculentum* (trigo sarraceno); **D-fagomina**; y semillas de trigo sarraceno

Por su analogía con los monosacáricos, se ha postulado que los iminociclitoles, como la **D-fagomina**, que presenta la configuración de la D-manosa en los carbonos C3, C4 y C5, un azúcar de unión a lectina (*lectin-binding sugars*), podrían tener un efecto aglutinante selectivo de ciertas enterobacterias fimbriadas de la microbiota intestinal, como *E. coli* y *S. enterica Typhimurium*, inhibiendo su adhesión a la mucosa intestinal debido a su afinidad por las lectinas<sup>[57]</sup>, pero no el de otras especies probióticas no fimbriadas como *Lactobacillus spp.* ó *Bifidobacterium spp.*, que expresan otro tipo de adhesinas en su superficie, que las mantienen fuertemente adheridas a la mucosa intestinal<sup>[58]</sup>. En nuestro grupo de investigación se han realizado diversos estudios para determinar este efecto aglutinante de la **D-fagomina**<sup>[59]</sup> y además se están estudiando, sus efectos sobre el aumento de Enterobacterias en la microbiota intestinal, asociado al consumo de dietas ricas en grasa y azúcares<sup>[50]</sup>.

---

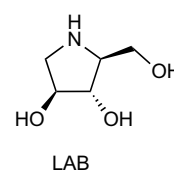
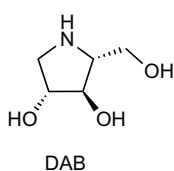
<sup>3</sup> *Fagopyrum esculentum* Moench

Los efectos de la **D-fagomina** sobre la actividad de las disacaridasas intestinales y sobre la microbiota intestinal podrían explicar en parte las propiedades beneficiosas para la salud asociadas al consumo de alimentos que contienen trigo sarraceno, una fuente rica en **D-fagomina**<sup>[60]</sup>, sugiriendo la posible introducción de este componente como nuevo ingrediente dietético o como alimento funcional<sup>[60]</sup>.

En esta tesis se demostrará que este producto reduce de forma eficiente la concentración de glucosa postprandial (ver capítulo 3, apartado 3.3.1).

#### DAB y LAB

El compuesto 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol (**DAB**) (Figura 1.3.1.1.6) es un producto natural obtenido de *Aratiniodes standishii* y del fruto de *Angylocalyx boutiqueanus*<sup>[61]</sup> y posteriormente de las hojas y raíces de *Morus spp*<sup>[62]</sup> y de esponjas marinas<sup>[63]</sup>. Tanto este producto como su enantiómero sintético 1,4-dideoxi-1,4-imino-L-arabinitol (**LAB**) (Figura 1.3.1.1.6), que presentan estructuras similares a azúcares naturales, han demostrado ser también inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas<sup>[28]</sup>.



**Figura 1.3.1.1.6.** De izquierda a derecha: *Aratiniodes standishii*; **DAB**, 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinitol; y **LAB**, 1,4-dideoxi-1,4-imino-L-arabinitol, su enantiómero sintético

Los iminociclitoles **DAB** y **LAB** son inhibidores de  $\alpha$ -glicosidasas de diferentes orígenes, y son particularmente activos frente a disacaridasas (sacarasas y maltasas) de la mucosa intestinal<sup>[64]</sup>. Estudios con extractos hojas de *Morus alba* que contienen iminoazúcares como **D-fagomina** y **DAB**, describen su carácter inhibitor de disacaridasas intestinales en ratas y en humanos y su efecto reductor de los niveles de glucosa postprandial en ratas<sup>[65]</sup>. Además otros estudios demuestran su efecto anti hiperglicémico en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina<sup>[27]</sup>. En este trabajo se estudiaron los efectos de estos compuestos y de sus derivados sobre la

digestión de carbohidratos en la mucosa intestinal y sobre la glicemia postprandial, demostrándose que estos compuestos ejercen un efecto modulador de la digestión de carbohidratos en el intestino<sup>[19]</sup> (capítulo 3 apartado 3.3.2).

#### *Otros iminociclitoles*

Otros productos, análogos de indolizidinas y quinolizidinas (Figura 1.4.4.2), sintetizados en nuestro grupo de investigación<sup>[66]</sup>, que presentan estructuras similares a indolizidinas biológicamente activas como la castanospermina<sup>[64]</sup> y la lentiginosina<sup>[67]</sup> (Figura 1.1.2.3) podrían ejercer también un efecto sobre la digestión de carbohidratos en el tracto digestivo, reduciendo así la concentración de glucosa postprandial.

En este trabajo (capítulo 3, apartados 3.1, 3.2 y 3.3) se determinó el efecto de estos compuestos sobre diferentes glicosidasas, disacaridasas de la mucosa intestinal y otras enzimas relacionadas con la digestión de carbohidratos<sup>[66, 68]</sup>

#### ***1.3.1.2 Inhibidores de glicógeno sintasa y glicógeno fosforilasa: modulación de la síntesis e hidrólisis de glicógeno en hígado, músculo y cerebro***

La acumulación de glicógeno es la respuesta fisiológica de los mamíferos al aumento de la concentración de glucosa en sangre tras la ingesta. Este proceso está alterado en enfermedades como la NIDDM, caracterizada por un estado constante de hiperglicemia y por la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos (músculo, hígado y tejido adiposo). En esta enfermedad se produce un aumento de la producción de glucosa hepática durante el estado post absorción, que contribuye al mantenimiento del estado hiperglicémico.

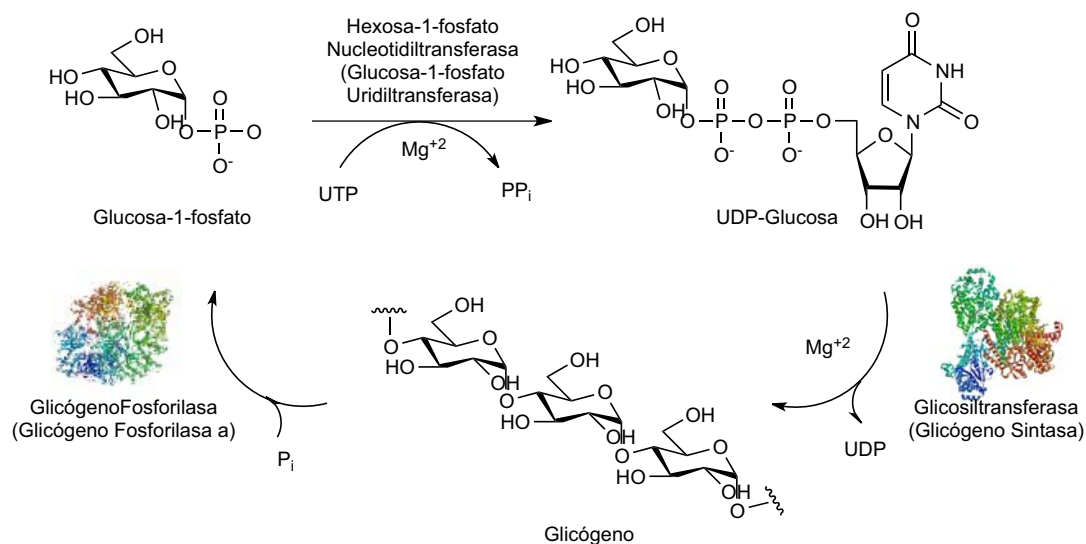
En el estado normal el hígado contribuye a la regulación de la concentración de glucosa en sangre captándola y formando glicógeno o liberándola. La producción de glucosa en el hígado tiene lugar por dos mecanismos diferentes: glicogenolisis (hidrólisis de glicógeno) y gluconeogénesis (biosíntesis de glucosa). El primero es el responsable del 70 % de la liberación de glucosa<sup>[36e]</sup>.

En la ruta metabólica que conduce a la síntesis y degradación de glicógeno están implicadas principalmente dos enzimas: glicógeno sintasa (GS) y glicógeno fosforilasa



(GP). La primera cataliza la síntesis de glicógeno mediante la adición de residuos de glucosa al extremo no reducido de la cadena de glicógeno con la formación de enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos usando UDP-glucosa como sustrato; y la segunda es responsable de la fosforólisis del glicógeno liberando glucosa-1-fosfato, el primer paso para la degradación de glicógeno. La enzima glicógeno fosforilasa presenta dos formas interconvertibles, la forma activa fosforilada (GP<sub>a</sub>) y la forma inactiva defosforilada (GP<sub>b</sub>) (Figura 1.3.1.2.1).

Existen tres isoformas de cada una de estas enzimas (hepática, muscular y cerebral)<sup>[69]</sup>. En el músculo la glucosa-1-P se utiliza vía glucólisis para generar energía mientras que en el hígado la mayor parte de la glucosa-1-P generada por la estimulación hormonal de la glicogenólisis se convierte en glucosa por la vía de la glucosa 6-P para mantener la concentración de glucosa en sangre (homeostasis).



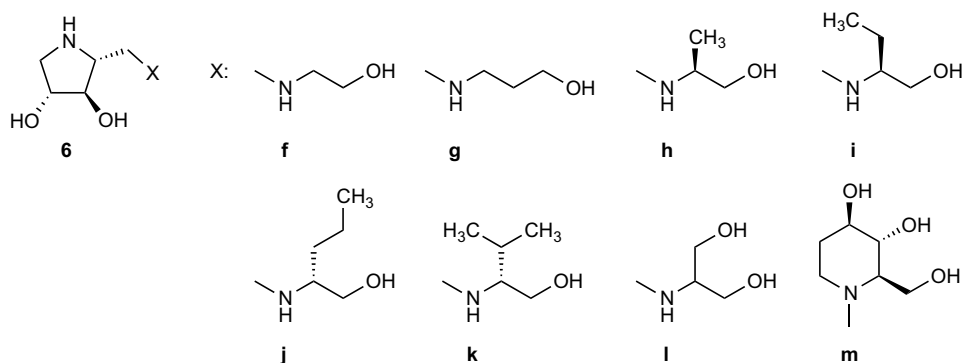
**Figura 1.3.1.2.1.** Representación esquemática de las vías de síntesis y degradación de glicógeno

Además de la inhibición de la hidrólisis de polímeros de glucosa en el intestino, otra de las estrategias para tratar de reducir la concentración de glucosa en sangre y controlar la glicemia en enfermedades como la NIDDM consiste en la inhibición de la hidrólisis de glicógeno en el hígado evitando la liberación de glucosa a la sangre mediante el desarrollo de compuestos que interfieran en la actividad de la enzima

responsable de esta degradación, la forma activa de la glicógeno fosforilasa hepática (GPa).

Se ha descrito que algunos iminoazúcares actúan como inhibidores de esta enzima<sup>[36d]</sup>, en concreto, el compuesto natural **DAB** (Figura 1.3.1.1.6), es uno de sus inhibidores más potentes<sup>[70]</sup>. Sin embargo, su enantiómero sintético, **LAB** (Figura 1.3.1.1.6), no presenta ningún tipo de efecto sobre esta enzima<sup>[23]</sup>.

**DAB** inhibe la hidrólisis de glicógeno hepático *in vivo* dando lugar a un efecto anti hiperglicémico en ratones obesos (ob/ob)<sup>[36f]</sup>. Por tanto, éste y sus derivados (Figura 1.3.1.2.2), obtenidos en nuestro grupo de investigación<sup>[19]</sup>, podrían ser interesantes para el tratamiento de la NIDDM porque además de reducir la glicemia postprandial inhibiendo glicosidasas intestinales, tienen la capacidad de regular enzimas que degradan glicógeno.



**Figura 1.3.1.2.2.** Estructura de derivados de **DAB** conjugados con aminoalcoholes, posibles inhibidores de glicógeno fosforilasa<sup>[19]</sup>

Actualmente, en el grupo de Enzimología Estructural del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, se están llevando a cabo estudios para determinar el efecto de estos productos sobre la actividad de las enzimas recombinantes sacarosa sintasa 4, glicógeno sintasa y glicógeno fosforilasa, relacionadas con los procesos de síntesis y degradación de glicógeno.

### **1.3.2 Agentes anti infectivos: antimicrobianos, antivirales y antiparasitarios**

Las enfermedades de tipo infeccioso (víricas, bacterianas o parasitarias) continúan siendo un problema de salud pública. La OMS estima que cada día mueren 50.000 personas a causa de enfermedades como tuberculosis, malaria, gripe, SIDA y hepatitis B<sup>[71]</sup>. Factores como el clima y la aparición de resistencias a los fármacos, influyen en la prevalencia de estos patógenos y crean la necesidad de desarrollar nuevos agentes anti infectivos. Una de las dianas para el desarrollo de nuevos fármacos, es la inhibición de enzimas que intervienen en vías específicas del ciclo de vida del patógeno o en la maquinaria celular del huésped utilizada por el patógeno durante el proceso infeccioso. Muchos de estos procesos están mediados por carbohidratos, por tanto, la modulación de la actividad de las enzimas responsables de su síntesis y degradación mediante iminociclitolos ofrece nuevas posibilidades para el tratamiento de este tipo de infecciones<sup>[32]</sup>.

#### **1.3.2.1 Antibacterianos**

Existen diferencias considerables entre los carbohidratos que forman parte de mamíferos y los bacterianos, tanto en composición como en función. Las bacterias presentan mayor diversidad de monosacáridos, existiendo clases específicas de éstos en los diferentes grupos bacterianos.

Una estrategia para tratar las infecciones causadas por microorganismos consiste en el diseño de compuestos que inhiban enzimas específicas propias de los ciclos de vida de estos patógenos pero no de sus huéspedes, como por ejemplo enzimas relacionadas con la biosíntesis de la pared celular.

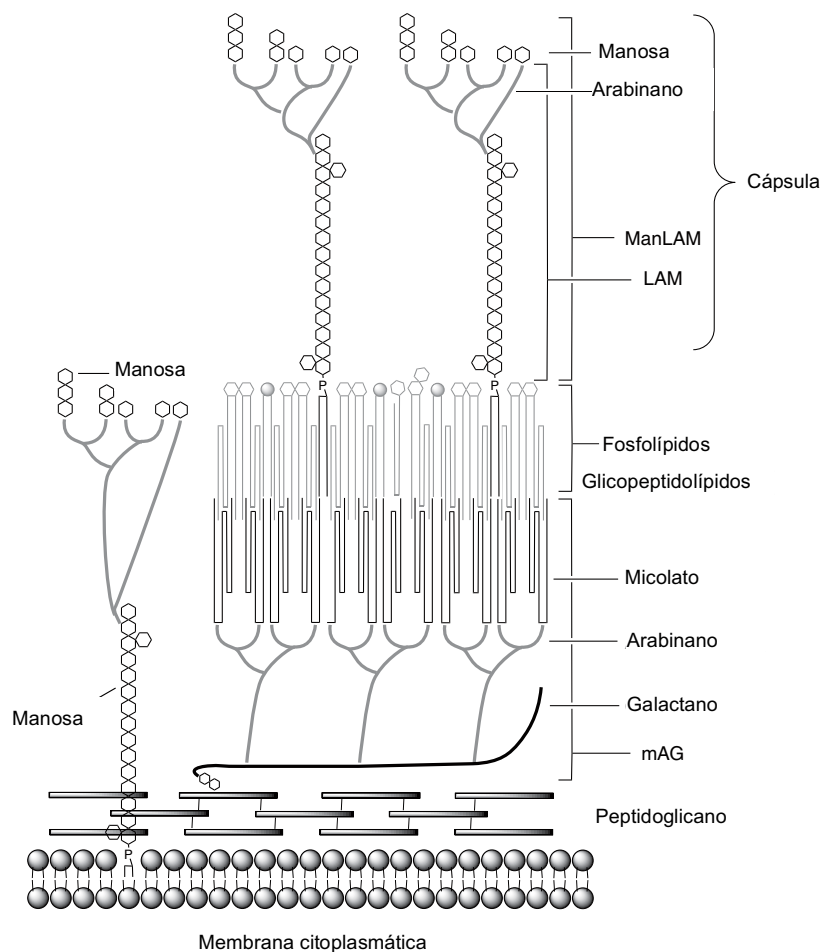
En trabajos de tesis realizados anteriormente en nuestro grupo de investigación se estudiaron los efectos antimicrobianos de los derivados *N*-alquilados de D-fagomina<sup>[54]</sup>. Además en este trabajo de tesis doctoral se presenta el estudio de la capacidad de inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* de quinolizidinas e indolizidinas polihidroxiladas<sup>[66]</sup> y de derivados de **DAB** y de **LAB**<sup>[19]</sup> (capítulo 3, apartado 3.4).

### *Inhibidores de $\alpha$ -L-rhamnosidasa: control del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis**

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente responsable de la tuberculosis. Según la OMS, esta enfermedad es la segunda causa mundial de mortalidad debida a un agente infeccioso, después del SIDA.

El incremento de formas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a los antibióticos existentes, ha hecho necesario el desarrollo de nuevos fármacos para su tratamiento. Uno de los factores que lo dificultan, es la peculiar arquitectura de la pared celular de este microorganismo, formada por polisacáridos y lípidos (Figura 1.3.2.1.1) y esencial para su crecimiento y supervivencia en el organismo huésped<sup>[72]</sup>. Esta estructura presenta múltiples capas, y su envuelta celular, extremadamente hidrofóbica, y poco permeable, actúa como barrera para muchos de los fármacos antibacterianos hidrofílicos.

Según el modelo propuesto por Minnikin,<sup>[73]</sup> la pared celular de *Mycobacterium spp.* está compuesta por dos segmentos: el segmento inferior, que se encuentra por encima de la membrana, contiene el peptidoglicano, que se une covalentemente al arabinogalactano a través de un disacárido fosfodiéster, el arabinogalactano está a su vez esterificado con ácidos micolíticos, formando lo que se denomina complejo micolil arabinogalactano (mAG) (Figura 1.3.2.1.1)<sup>[74]</sup>; y el segmento superior, por encima del mAG, contiene una bicapa lipídica asimétrica compuesta por diferentes lípidos libres (no unidos covalentemente) cuya estructura puede variar dependiendo de la cepa de *mycobacterium*. Se trata de manósidos fosfatidilinositol (PIM), y lipopolisacáridos como lipoarabinomannanos (LAM y ManLAM). En las especies del género *mycobacterium* de crecimiento lento, como *Mycobacterium tuberculosis*, las proteínas y los polisacáridos se encuentran en las capas más externas, que se conocen como cápsula<sup>[75]</sup> (Figura 1.3.2.1.1).

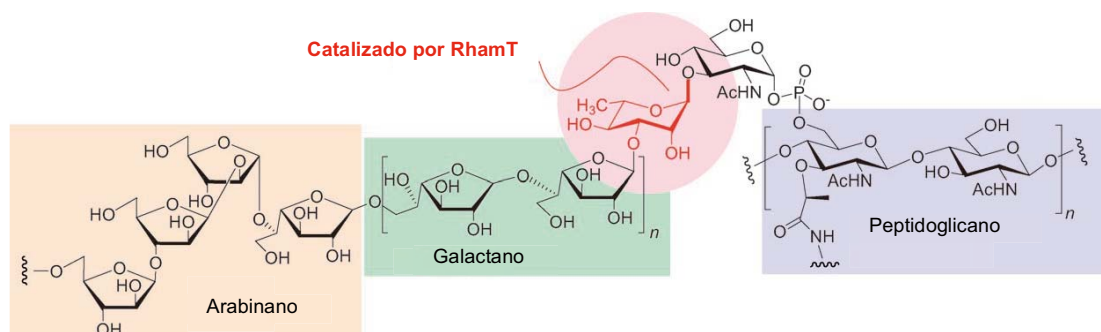


**Figura 1.3.2.1.1.** Representación esquemática de las estructuras que constituyen la pared celular de las micobacterias <sup>[75]</sup>

Teniendo en cuenta que la integridad de la pared celular es esencial para el crecimiento y la supervivencia de *Mycobacterium tuberculosis* en el organismo huésped, una estrategia para combatir las infecciones causadas por este patógeno es bloquear alguna de las enzimas relacionadas con su biosíntesis. Por ejemplo, el antibiótico isoniazida, el más habitual para el tratamiento de esta infección, inhibe la biosíntesis del ácido micólico que forma el mAG<sup>[76]</sup>.

Otra posibilidad, considerando la síntesis de la pared celular como diana terapéutica, es la utilización de iminociclitoles para inhibir las glicosiltransferasas implicadas en la transferencia de los monosacáridos que la componen, como por ejemplo los monosacáridos que forman parte del disacárido fosfodiéster que une el arabinogalactano al peptidoglicano (Figuras 1.3.2.1.1 y 1.3.2.1.2). Esta región

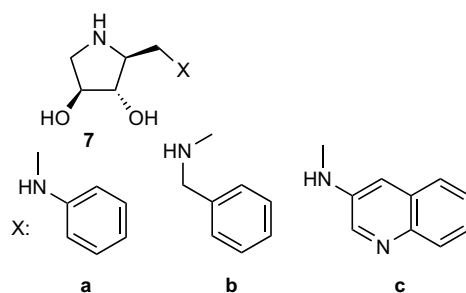
contiene un residuo L-rhamnosil<sup>[72]</sup>. Este monosacárido de seis carbonos no se encuentra en mamíferos y por tanto tampoco la maquinaria enzimática que lo procesa. Esta característica es interesante porque permite el desarrollo de fármacos no tóxicos dirigidos a la inhibición de estas enzimas.



**Figura 1.3.2.1.2.** Pared de *Mycobacterium tuberculosis* y región de unión al peptidoglicano<sup>[72]</sup>

En *Mycobacterium tuberculosis* la síntesis del linker Rha- $\alpha$ -(1->3)-GlcNac está mediada por una rhamosiltransferasa (Rham T), que cataliza la transferencia de un residuo  $\alpha$ -L-rhamnosil fosfato desde el dador dTDP-L-rhamnosa (dTDP-Rha) a decaprenyldiphosphoryl- $\alpha$ -D-N-acetylglucosamina (GlcNac-P-P-DP) para formar  $\alpha$ -L-Rhap-(1->3)- $\alpha$ -D-GlcNac-P-P-DP, que posteriormente se alarga con unidades galactofuranosa (GalF) y arabinofuranosa (AraF), para dar lugar al arabinogalactano que finalmente es micolilado y unido al peptidoglicano<sup>[75]</sup>.

Los iminoazúcares son inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas, pero existen pocos estudios de su efecto sobre L-rhamnosidasas y L-rhamnosiltransferasas<sup>[72, 77]</sup>. Los iminociclitos miméticos de L-rhamnosa podrían actuar como inhibidores tanto de la biosíntesis de timidina difosfato-(dTDP)-rhamnosa desde dTDP-glucosa como de la incorporación de L-rhamnosa a la pared celular de la micobacteria. Teniendo en cuenta la similitud de los sustratos dTDP-rhamnosa y L-rhamnosa se ha sugerido una posible correlación entre la inhibición de la naringinasa ( $\alpha$ -rhamnosidasa) y la inhibición de la biosíntesis de dTDP-rhamnosa ( $\alpha$ -rhamnosiltransferasa)<sup>[77]</sup> por pirrolidinas rhamnomiméticas derivadas de LAB<sup>[19]</sup> (Figura 1.3.2.1.5) y quinolizidinas e indolizidinas<sup>[66]</sup> sintetizadas en nuestro grupo de investigación.



**Figura 1.3.2.1.3.** Estructura de derivados de LAB miméticos de aglicona inhibidores de *α*-rhamnosidasa<sup>[19]</sup>

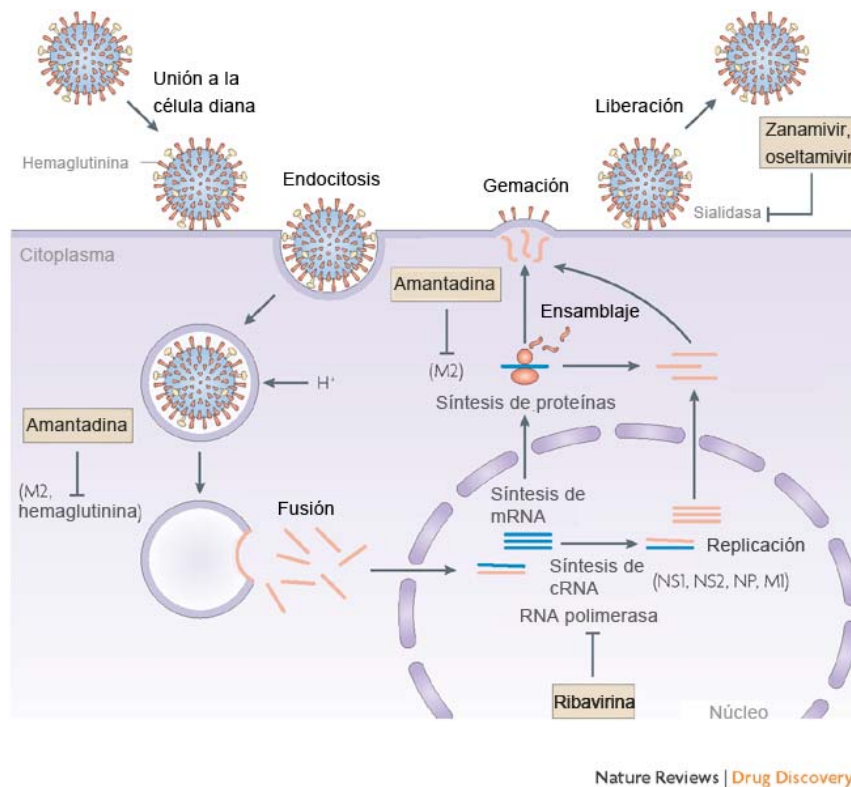
### 1.3.2.2 Agentes antivirales

El descubrimiento de nuevos fármacos antivirales no tóxicos supone también un reto importante porque debido a la proximidad entre los procesos metabólicos de los virus y los ciclos celulares de sus huéspedes, existen pocas dianas terapéuticas específicas exclusivamente de los ciclos celulares de estos agentes infecciosos<sup>[71]</sup>.

#### *Inhibidores de neuraminidasa*

Las neuraminidasas constituyen una amplia familia de enzimas presentes en multitud de organismos. La más conocida es la neuraminidasa viral, que se encuentra en la superficie del virus de la gripe (influenzavirus). Se trata de un virus RNA perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Es un agente muy infeccioso causante de enfermedades pulmonares agudas. Causa neumonía, que es especialmente grave en niños y pacientes con problemas cardiopulmonares. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado cuatro agentes antivirales para tratar la infección de este virus: amantadina, rimantadina, zanamivir y oseltamivir. También conocida como sialidasa, la neuraminidasa cataliza la hidrólisis de residuos terminales de ácido siálico, esta enzima está implicada en el proceso de infección y liberación de viriones de la célula infectada, y es esencial para el movimiento del virus en el tracto respiratorio (Figura 1.3.2.2.1). Oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza®) (Figura 1.1.2.4) son inhibidores de neuraminidasa comerciales indicados para el tratamiento de infecciones causadas por el virus de la influenza<sup>[78]</sup>.

Por su estructura, algunos iminociclitoles derivados de **DAB** (Figura 1.3.1.2.2) y de **LAB** (Figura 1.3.2.1.5) sintetizados en nuestro grupo de investigación<sup>[19]</sup>, se han propuesto como inhibidores de este enzima, y por tanto como nuevos agentes potencialmente activos para el tratamiento de este tipo de infección vírica.

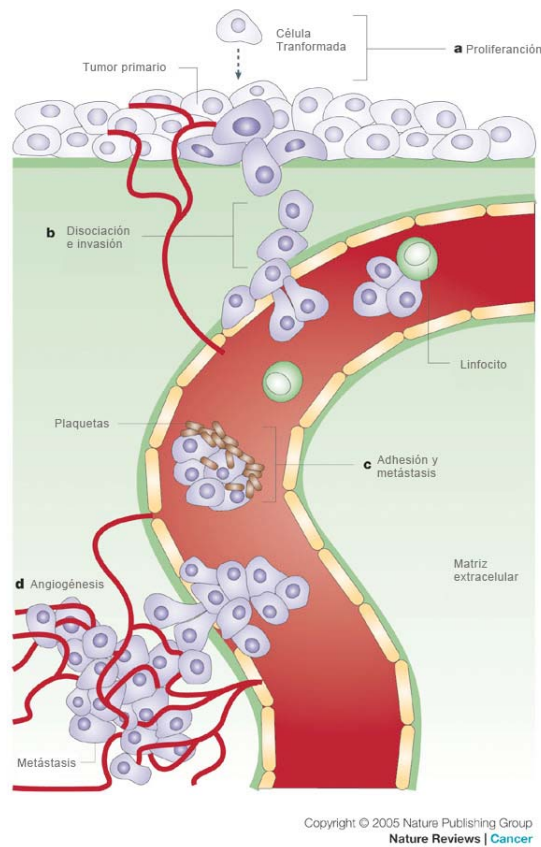


**Figura 1.3.2.2.1.** Efecto de diferentes compuestos antivirales sobre el ciclo de vida del virus de la influenza. Ejemplo de los inhibidores de sialidasa<sup>[17]</sup>

### 1.3.3 Agentes anticancerígenos

El cáncer es una enfermedad compleja con diferentes orígenes y sintomatología clínica que durante su evolución pasa por tres fases: oncogénesis; progresión tumoral; y metástasis (Figura 1.3.3.1). En estas etapas, la arquitectura de la matriz extracelular se ve alterada<sup>[1]</sup>





**Figura 1.3.3.1. Fases del proceso tumoral en el cáncer**<sup>[79]</sup>

Durante la oncogénesis los diferentes glicanos de la superficie celular se unen a proteínas encargadas de regular la proliferación y diferenciación celular, estos glicanos pueden actuar como promotores o supresores de la proliferación celular, por lo que se requiere un equilibrio entre las diferentes estructuras de la superficie de la célula para su funcionamiento normal<sup>[1]</sup>.

En la progresión, el crecimiento tumoral se acompaña de un proceso de *angiogénesis* que garantiza el aporte de nutrientes a las células. En este proceso también están implicados glicanos que se unen a factores de crecimiento que promueven la proliferación y diferenciación de las células que recubren las paredes de los vasos sanguíneos<sup>[1]</sup>.

En la última etapa, las células tumorales se desprenden y entran en el torrente sanguíneo. A través del sistema circulatorio son capaces de alcanzar e invadir tejidos

alejados del tumor original (metástasis). Para ello, es necesario que la célula se libere de las células que la rodean y se adhiera a otro tejido. En este proceso están implicadas principalmente dos tipos de glicoproteínas, selectinas e integrinas<sup>[1]</sup>, que actúan como receptores de adhesión, expresados en plaquetas, leucocitos y células endoteliales y que se unen a receptores de glicanos específicos.

### ***1.3.3.1 Inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas y cáncer***

Teniendo en cuenta que los procesos de invasión y metástasis en células tumorales implican estructuras de glicanos de la membrana celular que median las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, una de las estrategias para el tratamiento de esta enfermedad consiste en alterar la biosíntesis de estos oligosacáridos, utilizando por ejemplo iminociclitol para inhibir glicosidasas y glicosiltransferasas<sup>[80]</sup>. El compuesto más estudiado por su efecto antitumoral, es el iminociclitol swainsonina (Figura 1.1.2.3). La swainsonina, un inhibidor de la  $\alpha$ -manosidasa II del aparato de Golgi, que tiene un modo de acción complejo, por un lado inhibe el crecimiento de la célula tumoral y previene la diseminación de las células malignizadas del tumor primario a otros lugares (metástasis); y por otro lado, es capaz de estimular el sistema inmune<sup>[81]</sup>.

### ***1.3.3.2 Inhibidores $\alpha$ -L-fucosiltransferasas: terapia anti cáncer***

Muchos de los oligosacáridos antigénicos de la superficie celular están fucosilados. La biosíntesis de estos oligosacáridos fucosilados requiere la acción de diferentes glicosiltransferasas, donde el último paso del proceso biosintético es la fucosilación que llevan a cabo las fucosiltransferasas. En procesos de cáncer se han observado alteraciones en la expresión de estos oligosacáridos fucosilados<sup>[82]</sup> lo que ha conducido a que estas estructuras que contienen L-fucosa se hayan considerado antígenos para el desarrollo de procesos oncogénicos ya que se acumulan en gran cantidad de cánceres humanos<sup>[83]</sup>. La expresión aberrante de estos antígenos fucosilados en diferentes tipos de cáncer se debe a una alteración en la actividad de las enzimas responsables de su síntesis y degradación, fucosiltransferasas y

fucosidasas. Por esta razón, el desarrollo de inhibidores de estas enzimas puede ser una herramienta para el tratamiento de esta enfermedad<sup>[83]</sup>.

Mientras que la  $\alpha$ -L-fucosidasa es la exoglucosidasa que cataliza la hidrólisis de residuos L-fucosa del extremo no reducido de oligosacáridos y gliconjugados, las fucosiltransferasas catalizan la transferencia de una unidad L-fucosa desde guanosina difosfato  $\beta$ -L-fucosa (GDP-fucosa) al glicoconjugado correspondiente.  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferasas V (Figura 3B) es responsable de la síntesis de sialil Lewis X un ligando de E-selectina<sup>[83-84]</sup>. Durante la fase de metástasis las células tumorales expresan grandes cantidades de antígenos pro adhesivos sialil Lewis X que les permiten la adhesión al endotelio<sup>[79]</sup>.

En el trabajo de máster previo a esta tesis, se seleccionó la enzima  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga marítima*, cuya estructura está cristalizada<sup>[85]</sup>, como modelo para probar el efecto de los diferentes derivados *N*-alquilados de **D-fagomina** (Figura 1.4.1 compuestos **3a-f**) y otros iminociclitoles de tipo pirrolidina (Figura 1.4.2.3 compuestos **13-17**) sintetizados en nuestro grupo de investigación como inhibidores de fucosidasas y fucosiltransferasas. Los mejores inhibidores fueron ensayados, como potenciales inhibidores de fucosiltransferasas sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano<sup>[86]</sup>. Estos estudios fueron realizados por el grupo de Diferenciación en Carcinogénesis Gástrica del Parc de Recerca Biomèdica (PRBB) del Instituto de Investigaciones Médicas del Hospital del Mar (IMIM).

## 1.4 Síntesis de iminociclitoles

A pesar de su potencial terapéutico existen muy pocas moléculas del tipo iminociclitol que hayan llegado a explotarse comercialmente por la industria farmacéutica, principalmente por dos motivos: por un lado su síntesis es compleja y sus propiedades químicas dificultan las tareas de análisis, separación, y purificación que requieren técnicas especiales; y por otro lado, y más importante, existe un problema de selectividad, ya que los iminociclitoles pueden inhibir un amplio espectro de glicosidasas afectando diversas funciones biológicas. Es por ello que las investigaciones se dirigen en primer lugar a la búsqueda de nuevas herramientas que

simplifiquen su síntesis; y en segundo lugar, a la producción de análogos más selectivos.

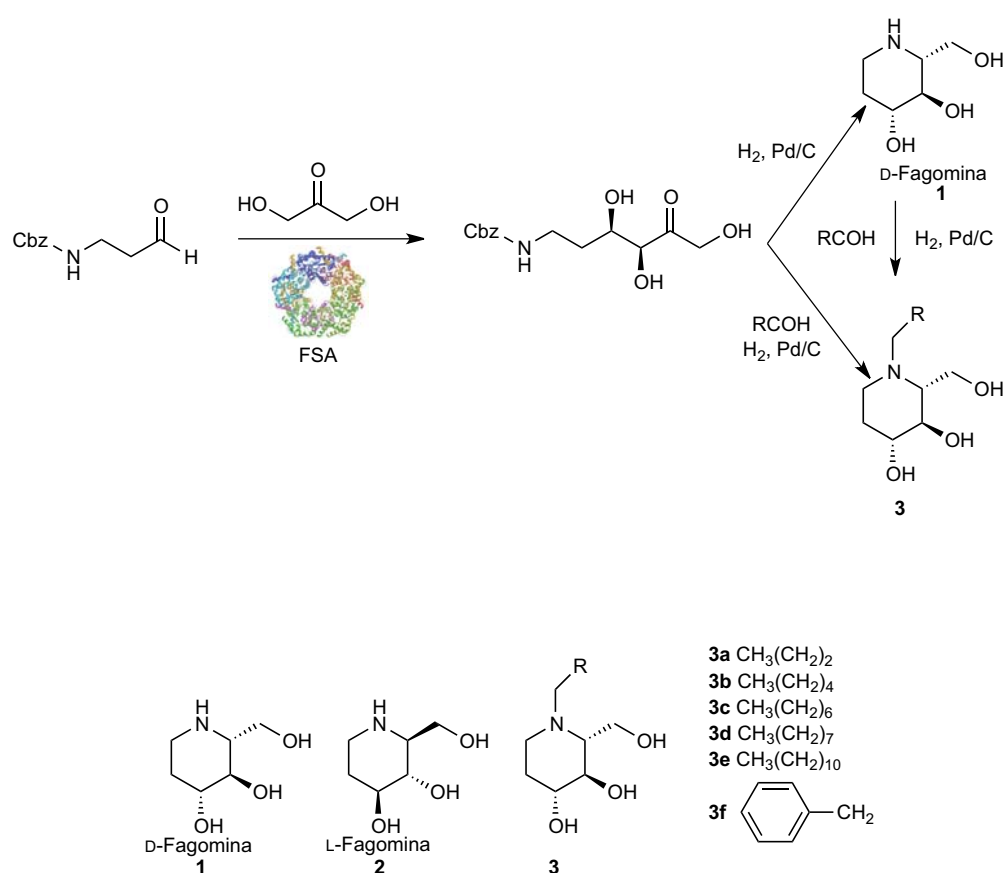
Una de las estrategias biotecnológicas (biotecnología blanca) para la síntesis de iminociclitoles es la utilización de aldolasas, un grupo de liasas que catalizan la formación o escisión estereoselectiva de enlaces carbono-carbono mediante una reacción aldólica o retroaldólica, respectivamente. Las aldolasas catalizan la transferencia reversible de compuestos carbonílicos (dadores) a aldehídos (aceptores). La utilización de enzimas para la síntesis de estos compuestos ofrece ventajas sobre las metodologías químicas clásicas. En primer lugar, son altamente estereoselectivas y eficaces desde el punto de vista catalítico, lo que las hace útiles para la síntesis asimétrica de compuestos naturales complejos; y en segundo lugar, las enzimas funcionan en medios acuosos bajo condiciones de reacción suaves. Esto unido a su biodegradabilidad las convierte en una opción ambientalmente muy atractiva que contribuye al desarrollo de lo que se conoce como química sostenible o química verde<sup>[87]</sup>.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado metodologías basadas en aldolasas que han permitido la preparación de colecciones de iminociclitoles con diversidad funcional y configuracional. El paso clave de esta metodología es la adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y análogos no fosfatados a *N*-cbz-aminoaldehídos. Los aductos así obtenidos son tratados con H<sub>2</sub> en presencia de Pd/C para desproteger el grupo Cbz y al mismo tiempo llevar a cabo la aminación reductora que conduce a la obtención del iminociclitol.

Los productos que se incluyen en esta tesis han sido sintetizados en nuestro laboratorio de investigación mediante estas estrategias quimio enzimáticas. Estas síntesis están descritas en otras tesis y publicaciones del grupo, por lo tanto, la descripción y discusión de su preparación queda fuera del contexto de esta tesis. En este apartado se recogen a modo de resumen los esquemas para la obtención de los diferentes productos estudiados en este trabajo y las respectivas publicaciones y/o tesis doctorales a las que han dado lugar.

### 1.4.1 Síntesis quimo-enzimática de D-fagomina y sus derivados N-alquilados

En la síntesis de **D-fagomina**, el paso clave es la formación estereoselectiva del enlace C-C entre la dihidroxiacetona (DHA) y el *N*-Cbz-amino-1-propanal (Figura 1.4.1). En nuestro grupo<sup>[54]</sup> se encontró una alternativa usando la aldolasa D-fructosa-6-fosfato (FSA) de *E. coli* como catalizador de la reacción aldólica<sup>[88]</sup>. La ventaja más importante de esta enzima es que utiliza DHA como nucleófilo, un sustrato económicamente más asequible que la DHAP.



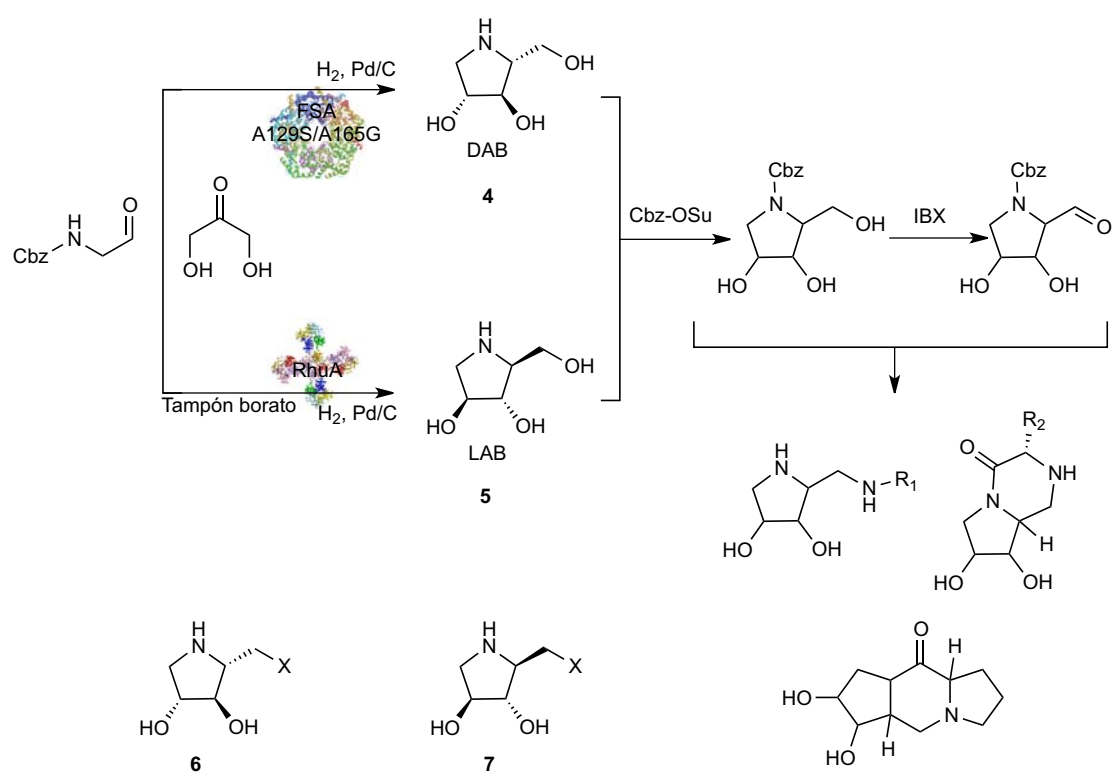
**Figura 1.4.1** Síntesis quimo enzimática de **D-fagomina** (1) y derivados *N*-alquilados (3a-f)<sup>[54]</sup>, se añade la estructura de su enantiómero sintético **L-fagomina** (2).

### 1.4.2 Síntesis quimo-enzimática de DAB, LAB y conjugados, usando FSA 129S/A165G y RhuA respectivamente

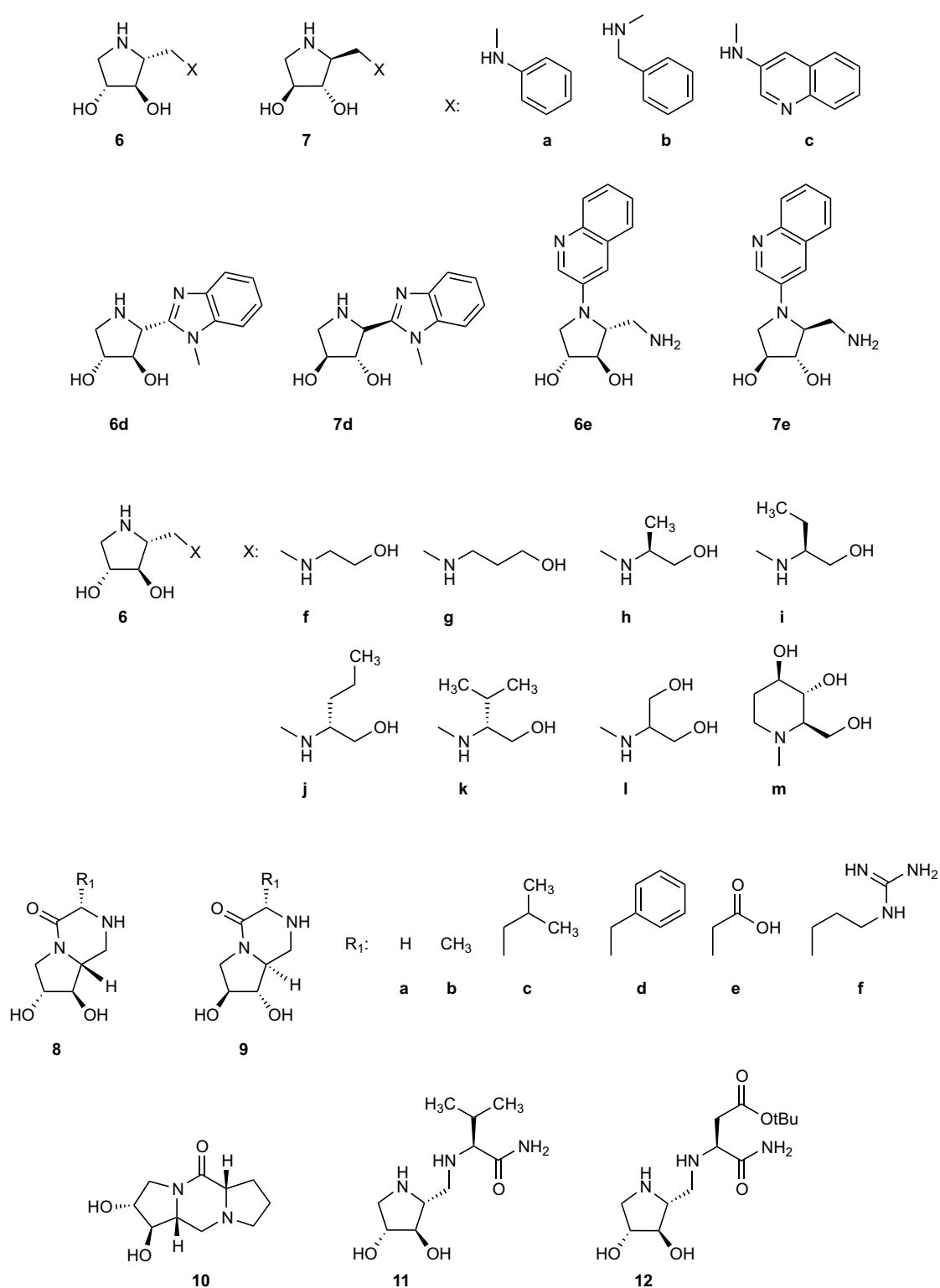
Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una metodología para la síntesis de **DAB** y de **LAB**<sup>[89]</sup>.

La síntesis de sus derivados se basa en la preparación de **DAB** y **LAB** seguida de la modificación química de su funcionalidad hidroximetilo para proporcionar diversos derivados 2-aminometilo<sup>[19]</sup> (Figura 1.4.2.1).

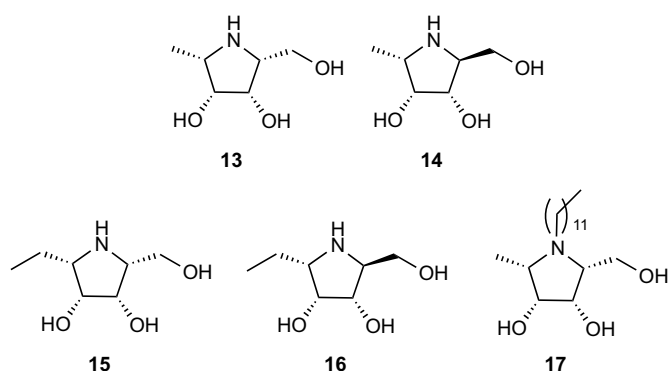
Esta estrategia da lugar a nuevos derivados aromáticos, aminoalcoholes y conjugados 2-oxopiperazina de **DAB** y de **LAB**, cuyas estructuras se resumen en la figura 1.4.2.2.



**Figura 1.4.2.1** Síntesis quimo enzimática de conjugados de **DAB** y **LAB** con aminas aromáticas, aminoalcoholes y aminoácidos. La estrategia se basa en la adición aldólica enzimática estereoselectiva seguida de la introducción química de nuevos grupos funcionales<sup>[90]</sup>.



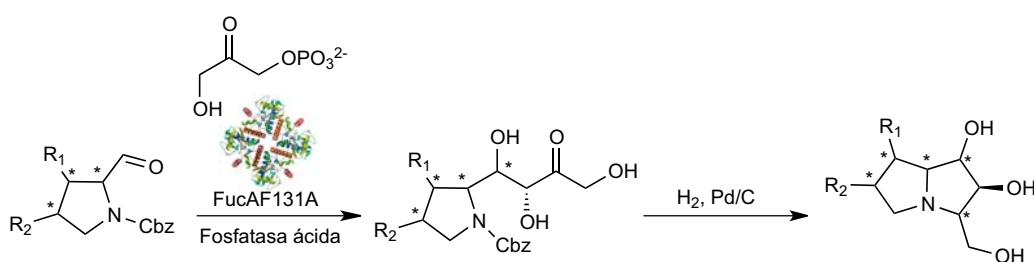
**Figura 1.4.2.2** Derivados de **DAB** y de **LAB** conjugados con aminas aromáticas (**6a-e**; **7a-e**); derivados de **DAB** conjugados con aminoalcoholes (**6f-m**); y derivados de **DAB** y de **LAB** conjugados con aminoácidos (**8a-f**; **9a-f**; y **10**, **11** y **12**)



**Figura 1.4.2.3** Otros derivados de pirrolidinas sintetizadas por Espelt et al.<sup>[91]</sup> y Calveras et al.<sup>[92]</sup> estudiados sobre  $\alpha$ -L-fucosidasa.

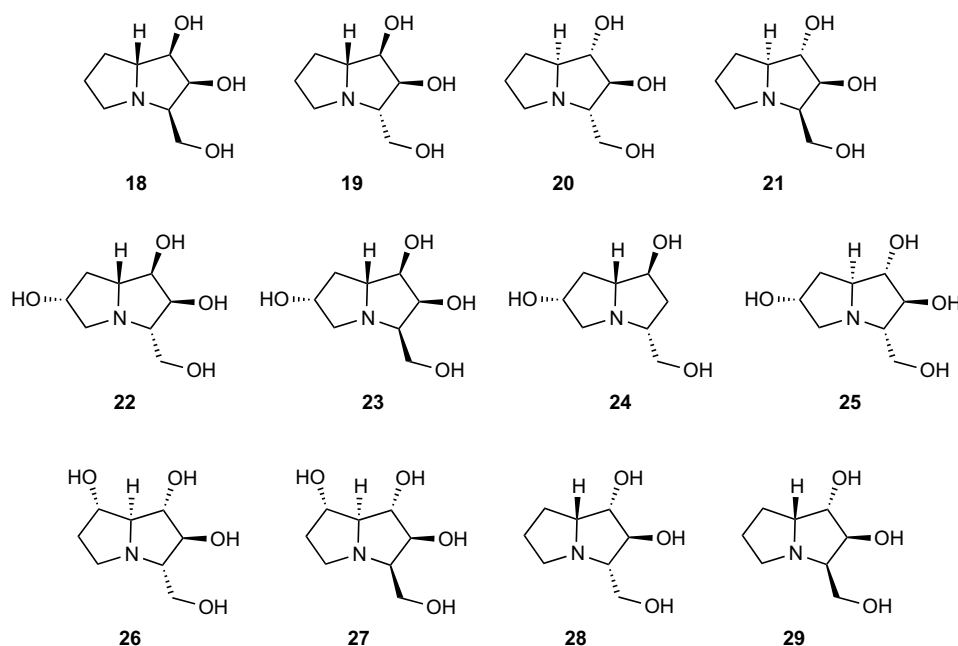
### 1.4.3 Síntesis quimo-enzimática de pirrolizidinas usando la aldolasa L-fuculosa-1-fosfato (FucA) con la mutación F131A

Para la síntesis de pirrolizidinas polihidroxiladas de estructuras similares a hiacintacinas y alexinas se siguió una estrategia quimo enzimática<sup>[68]</sup> en la que se utiliza la aldolasa L-fuculosa 1-fosfato de *E. coli* como catalizador de la adición aldólica (Figura 1.4.3.1). Mediante esta estrategia se sintetizaron una serie de pirrolizidinas, cuyas estructuras se resumen en la figura 1.4.3.2



**Figura 1.4.3.1** Síntesis quimo-enzimática de derivados de pirrolizidinas polihidroxiladas<sup>[68]</sup>. La adición aldólica está catalizada por la aldolasa dependiente de DHAP FucA F131A (en la posición 131 la fenilalanina está sustituida por una alanina)

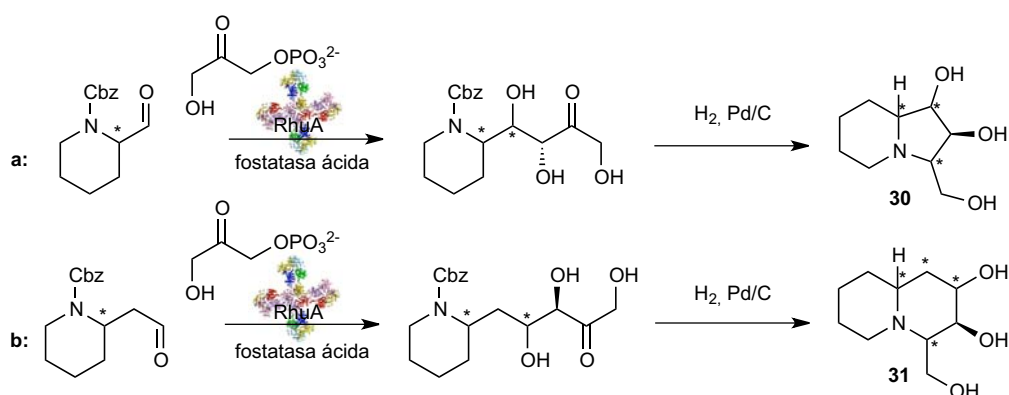




**Figura 1.4.3.2** Pirrolizidinas obtenidas (18-27)<sup>[66]</sup> y 28 y 29<sup>[91, 93]</sup>

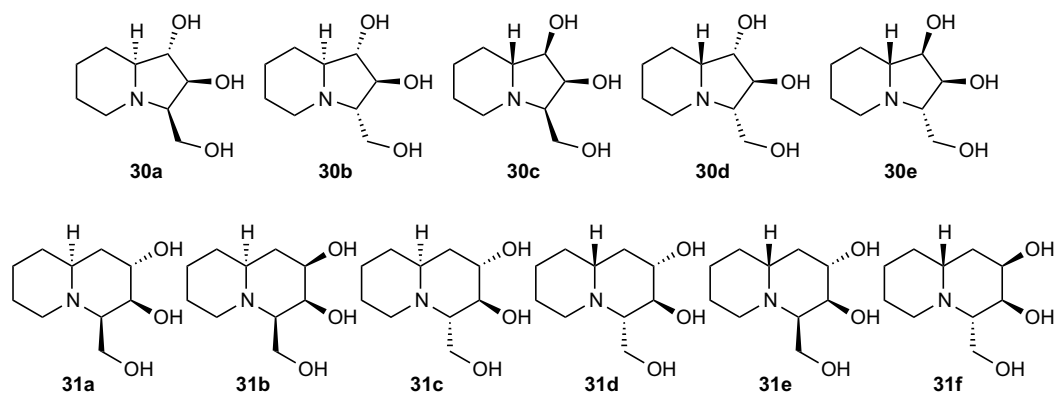
#### 1.4.4 Síntesis quimo-enzimática de indolizidinas y quinolizidinas polihidroxladas

La síntesis de indolizidinas y quinolizidinas polihidroxladas se consigue mediante una estrategia quimo enzimática desarrollada en nuestro laboratorio (Figura 1.4.4.1)<sup>[66]</sup> que consiste en la adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por la aldolasa L-rhamnulosa 1-fosfato (RhuA).



**Figura 1.4.4.1** Síntesis quimo-enzimática de indolizidinas (a) y quinolizidinas (b). Reacción de adición aldólica catalizada por RhuA y aminación reductora<sup>[66]</sup>

Las estructuras de las indolizidinas y quinolizidinas obtenidas siguiendo esta metodología se resumen en la Figura 1.4.4.2.



**Figura 1.4.4.2** Indolizidinas (**30a-e**) y quinolizidinas (**31a-f**) obtenidas<sup>[66]</sup>



## 2. OBJETIVOS

---



## 2.1 Objetivos generales

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinar cuyo fin es la obtención, mediante técnicas químico enzimáticas, de productos activos frente a glicosidasas y glicosiltransferasas. El punto clave es el desarrollo de nuevas metodologías que permitan el control de la diversidad constitucional y configuracional de los productos en función del biocatalizador y de los reactivos de partida.

El presente estudio, enmarcado dentro de este proyecto, tiene como objetivo la evaluación de las propiedades inhibitorias de la colección de productos. La diversidad constitucional y configuracional de los derivados de iminociclitoles sugiere que los ensayos de actividad se realicen sobre un conjunto amplio de glicosidasas y glicosiltransferasas. La finalidad es doble: en primer lugar determinar la potencial aplicación terapéutica de cada compuesto y, en segundo lugar, obtener cabezas de serie cuya modificación estructural permita optimizar su actividad, selectividad y toxicidad.

## 2.2 Objetivos Concretos

2.2.1 Evaluación de los iminociclitoles **D-fagomina**, **L-fagomina**, **DAB** y **LAB**, de nuevos derivados de **DAB**, **LAB**, y nuevas pirrolizidinas, indolizidinas y quinolizidinas, sobre la actividad de diferentes glicosidasas de origen comercial,  $\alpha$ -D-glucosidasa de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) y de arroz,  $\beta$ -D-glucosidasa de almendra dulce,  $\beta$ -D-galactosidasa de hígado bovino,  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (naringinasa) de *Penicillium decumbens*,  $\alpha$ -D-manosidasa de judía (*Canavalia*) y  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón bovino

2.2.2 Efecto de estos compuestos sobre la actividad de disacaridasas de la mucosa intestinal, la digestión de almidón en este tejido y sobre otras enzimas relacionadas con la digestión de carbohidratos, como amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasas

2.2.3 Evaluación de la actividad de iminoclitoles sobre la digestión de sacarosa y almidón *in vitro* e *in vivo* utilizando como modelo ratas macho de la cepa Sprague-Dawley

- Estudio de la actividad *in vitro* del compuesto **D-fagomina** sobre la digestión de sacarosa en la mucosa intestinal y modulación de la glicemia postprandial tras su administración junto a sacarosa y almidón. Comparación de sus propiedades con las de los inhibidores comerciales **Acarbosa, Miglitol y DNJ**
- Efecto a largo plazo de **D-fagomina** en una dieta combinada rica en grasas y carbohidratos
- Evaluación de las propiedades de **DAB** y **LAB** sobre la digestión de sacarosa y almidón *in vitro*. Y sobre la modulación de la glicemia postprandial tras su administración junto a sacarosa y almidón

2.2.4 Efecto de las indolizidinas y quinolizidinas y de los derivados de **LAB** activos frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (naringinasa de *Penicillium decumbens*) sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* el agente causal de la tuberculosis

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





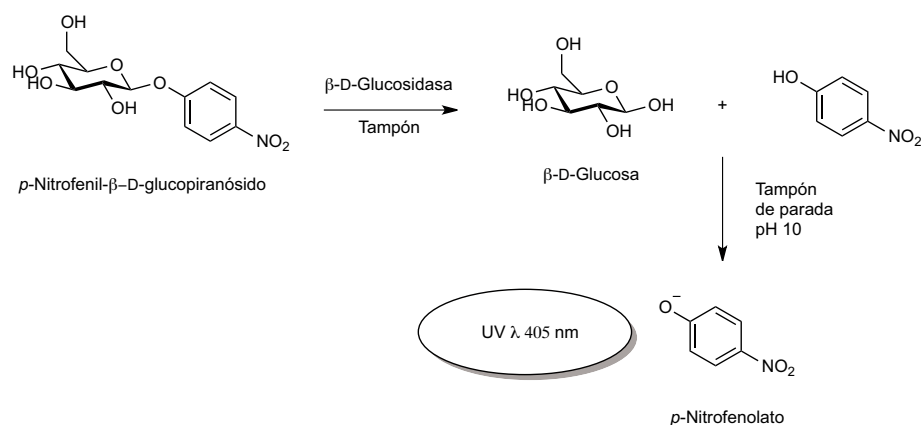
### 3.1 Iminociclitoles como inhibidores de la actividad de glicosidasas comerciales de diferentes orígenes

Los compuestos del tipo iminociclitol se ensayaron como inhibidores de una selección de glicosidasas comerciales. Este estudio se considera una aproximación preliminar para establecer las propiedades inhibitorias de estos productos y sus potenciales dianas terapéuticas. Con este fin se determinó su actividad inhibitoria frente a las enzimas del tipo glicosidasa:  $\alpha$ -D-glucosidasa de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) y de arroz,  $\beta$ -D-glucosidasa de almendra dulce,  $\beta$ -D-galactosidasa de hígado bovino,  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (naringinasa) de *Penicillium decumbens*,  $\alpha$ -D-manosidasa de judía (*Canavalia*) y  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón bovino. Estas enzimas son las más utilizadas en la literatura por su disponibilidad comercial, y además, algunas de ellas son aceptadas como moldelos válidos de glicosidasas humanas en base a sus estructuras cristalográficas y a su grado de homología<sup>[94]</sup>. Y pueden considerarse por ello, modelos de dianas terapéuticas para el diseño de inhibidores dirigidos al tratamiento de diferentes enfermedades: a) los inhibidores de  $\alpha$ -D-glucosidasa pueden inhibir también oligo- y disacaridasas intestinales y ser aplicados como reguladores de la absorción de carbohidratos en el tratamiento de la NIDDM<sup>[39]</sup>. También pueden ser inhibidores de la neuraminidasa viral (sialidasa) y aplicarse en tratamientos contra infecciones causadas por el virus influenza<sup>[95]</sup>; b) se ha comprobado que algunos inhibidores competitivos de  $\beta$ -D-glucosidasa y  $\beta$ -D-galactosidasa a baja concentración pueden asistir al plegamiento de proteínas actuando como chaperonas químicas aplicables al tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal como las enfermedades de Gaucher y de Fabry<sup>[95]</sup>; c) por la presencia de un residuo  $\alpha$ -L-rhamnosil en la pared celular de algunas bacterias del género micobacterium se ha sugerido que los iminociclitoles miméticos de este residuo, inhibidores de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa pueden ser también, por su homología estructural, inhibidores de las enzimas responsables de la síntesis de algunos de los componentes de la pared celular, y por tanto del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis<sup>[72]</sup>; e) los inhibidores de  $\alpha$ -D-manosidasa, como la indolizidina swainsonina, han demostrado tener propiedades anticancerígenas<sup>[95]</sup>; y por último, f) en procesos tumorales se observan alteraciones en la expresión de oligosacáridos fucosilados<sup>[82]</sup> como sialil Lewis X, un

ligando de E-selectina<sup>[83-84]</sup>, que facilita su adhesión al endotelio y está relacionado con el proceso de metástasis<sup>[79]</sup>, por ello se ha postulado que los inhibidores de  $\alpha$ -L-fucosidasa podrían ser también inhibidores de fucosiltransferasas, como la  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferasas V, responsable de la síntesis de sialil Lewis X.

La actividad de las glicosidasas comerciales, y el efecto de los iminociclitolos sobre esta actividad se determinó siguiendo un método colorimétrico basado en la utilización de monosacáridos conjugados con *p*-nitrofenol en presencia de los iminociclitolos. En el proceso de hidrólisis el *p*-nitrofenol es liberado del monosacárido y es detectado espectrofotométricamente a 405 nm (figura 3.1).

Esta metodología, descrita previamente en la bibliografía y reportada en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación<sup>[92, 96]</sup>, se detalla en la sección experimental de este trabajo (capítulo 5, apartado 5.2).



**Figura 3.1** Esquema del ensayo enzimático, ejemplo de la  $\beta$ -D-glucosidasa

Los resultados obtenidos se describen en los siguientes apartados (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4). Para cada uno de los compuestos activos se determinó el valor de concentración inhibitoria del 50% de la actividad ( $IC_{50}$ ), la constante de inhibición ( $K_i$ ) y el tipo de inhibición (i.e. competitiva, no competitiva o acompetitiva<sup>[96]</sup>). Las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk empleadas para la determinación de los valores de  $k_i$  y los tipos de inhibición de cada uno de los compuestos activos forman parte del material adicional y pueden consultarse en el CD adjunto.

Los valores obtenidos para cada uno de los compuestos activos, se compararon con los de **DAB**, el **LAB**, la **D-fagomina** y la **L-fagomina** descritos en la bibliografía y cuyas estructuras están relacionadas con las de los nuevos iminociclitoles estudiados en este trabajo<sup>[64]</sup>.

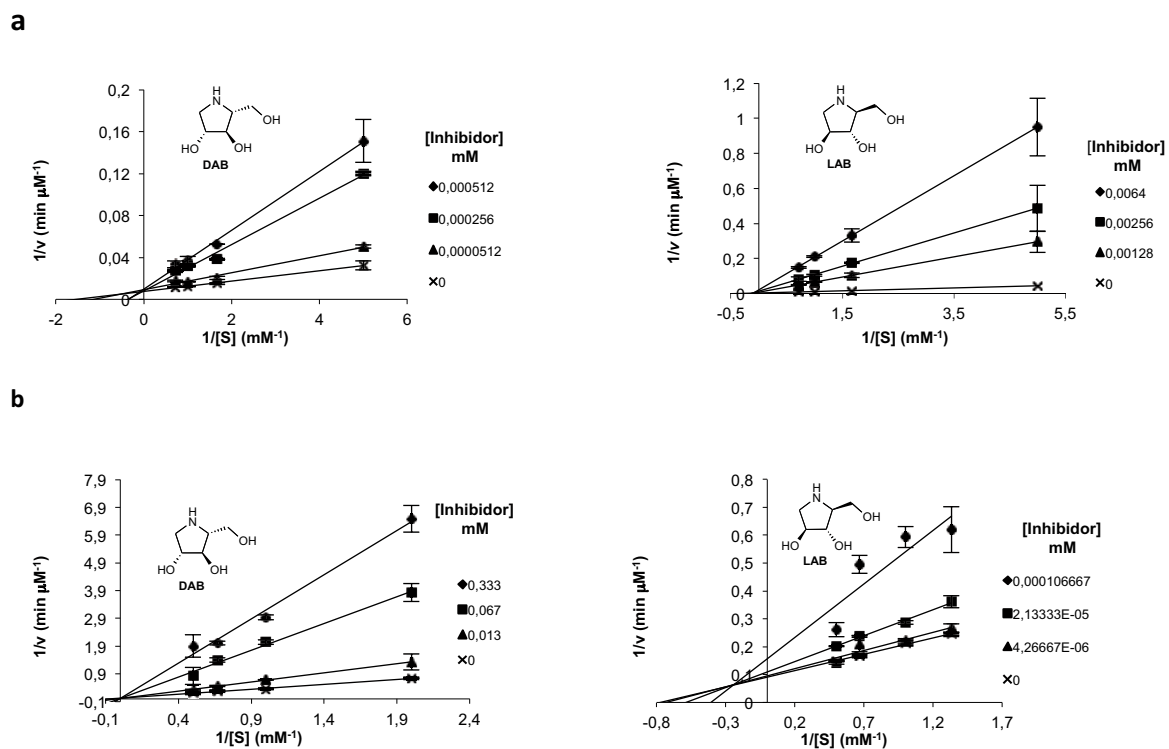
### 3.1.1 Propiedades inhibitorias de **DAB**, **LAB**, **D-fagomina** y **L-fagomina**

Se estudiaron las propiedades inhibitorias del **DAB**, el **LAB**, la **D-fagomina** y la **L-fagomina**. Estos compuestos, que ya habían sido descritos anteriormente como inhibidores de glicosidasas<sup>[23]</sup>, resultaron activos frente a varias de las enzimas estudiadas. Los valores de  $IC_{50}$ ,  $K_i$ , así como los tipos de inhibición se resumen en la tabla 3.1.1, resultando sus propiedades inhibitorias consistentes con las publicadas previamente<sup>[97]</sup>. Por estas razones se usaron como referencia para los estudios de determinación de actividad de los nuevos iminociclitoles<sup>[66, 68, 98]</sup>.

De los resultados obtenidos con estos productos, cabe destacar que los compuestos **DAB** y **LAB** resultaron ser inhibidores potentes de la mayoría de glicosidasas estudiadas (tabla 3.1.1), sin embargo presentaron diferencias en su potencia y selectividad.

**DAB** resultó ser inhibidor competitivo de las D-glucosidasas mientras que su enantiómero sintético **LAB**, resultó no competitivo, tal y como se describe en la bibliografía<sup>[95, 99]</sup>, dónde se sugiere que los compuestos de la serie D- presentan inhibición competitiva para las D-glucosidasas, mientras que los de la serie L- son del tipo no competitivo<sup>[95, 97, 99-100]</sup> (figura 3.1.1). Posiblemente los compuestos de la serie D- y los de la serie L- no actúen en el mismo centro activo del enzima<sup>[97]</sup>. Tal y como se describe en la literatura<sup>[97]</sup>, el compuesto natural **DAB**, resultó ser el inhibidor más potente de  $\alpha$ -glucosidasa de levadura de los estudiados, y su enantiomero, **LAB** resultó ser el más potente frente a  $\alpha$ -glucosidasa de arroz.

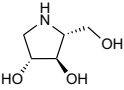
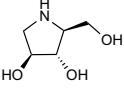
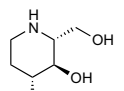
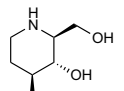
**DAB** presentó además, actividad frente a la enzimas  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\alpha$ -L-fucosidasa pero no frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa, contrariamente a su enantiómero sintético **LAB**, el cual fue activo frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa y no presentó actividad frente a  $\alpha$ -D-manosidasa ni frente a  $\alpha$ -L-fucosidasa (tabla 3.1.1).



**Figura 3.1.1** Diagramas dobles recíprocos de Lineweaver-Burk de a)  $\alpha$ -D-glucosidasa de levadura, b)  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz

**D-Fagomina** y **L-fagomina** resultaron ser inhibidores menos potentes que **DAB** y **LAB** pero más selectivos, presentando actividad frente a la enzima  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz, siendo el primero el más activo. **L-Fagomina** fue el único en presentar cierto efecto frente a  $\beta$ -D-galactosidasa de hígado bovino.

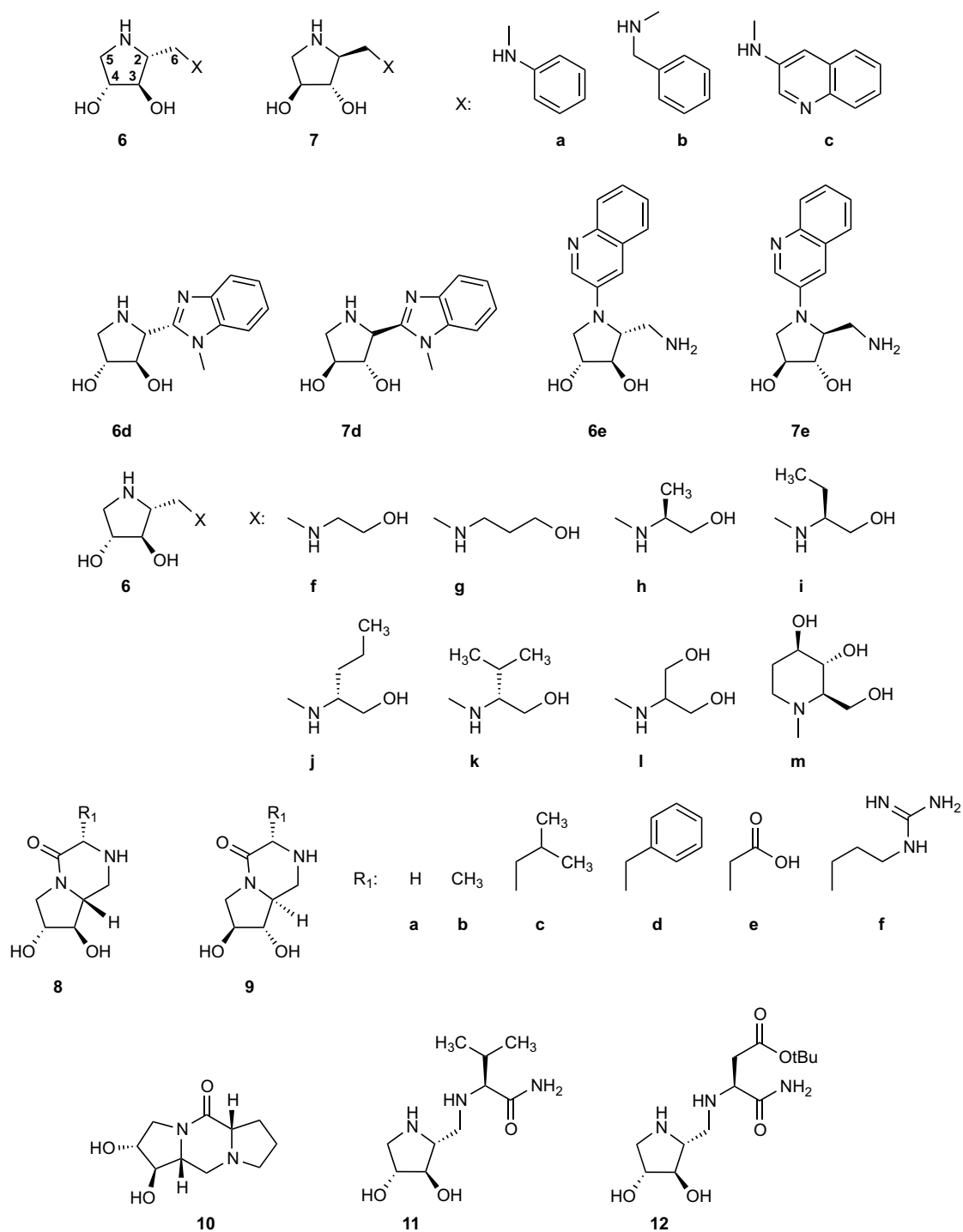
**Tabla 3.1.1** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM) (entre paréntesis), de los compuestos de referencia frente a glicosidasas comerciales.

Com.	Estructura	α-D- glucosidasa <sup>[a]</sup>	α-D- glucosidasa <sup>[b]</sup>	β-D- glucosidasa	β-D- galactosidasa	α-L- rhamnosidasa	α-D- mannosidasa	α-L- fucosidasa
<b>DAB</b> <b>4</b>		0.33 ± 0.02 (0.17±0.01) C	218 ± 3.7 (104 ± 75) C	276 ± 25 (100 ± 64) C	n.i.	n.i.	286 ± 27 (111 ± 60) NC	20 ± 1 (5 ± 1) C
<b>LAB</b> <b>5</b>		1.8 ± 0.1 (0.8 ± 0.1) NC	0.05 ± 0.01 (0.04 ± 0.01) NC	685 ± 112 (1014 ± 81) NC	n.i.	56 ± 5 (98 ± 5) NC	n.i.	n.i.
<b>D- Fagomina</b> <b>1</b>		n.i.	61 ± 7 (18 ± 8) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>L- Fagomina</b> <b>2</b>		n.i.	126 ± 7 (236 ± 61) C	n.i.	154 ± 22 (76 ± 21) C	n.i.	n.i.	n.i.

Valores expresados como promedio de triplicados ± error estándar de la media (SEM). [a] de levadura de cerveza y [b] de arroz. C inhibición competitiva; NC inhibición no competitiva; AC inhibición acompetitiva; y n.i. no inhibición a la concentración de 1 mM

### 3.1.2 Propiedades inhibitorias de derivados de DAB) y LAB

Los derivados de **DAB** y **LAB** (Figura 3.1.2.1) se probaron como inhibidores de la actividad de diferentes glicosidasas comerciales.



**Figura 3.1.2.1** Derivados de **DAB** y de **LAB** conjugados con aminas aromáticas (**6a-e**; **7a-e**); conjugados con aminoalcoholes (**6f-m**); y conjugados con aminoácidos (**8a-f**; **9a-f**; y **10**, **11** y **12**)

Los valores de  $IC_{50}$  y de  $K_i$ , así como los tipos de inhibición, se resumen en diferentes tablas: tabla 3.1.2.1, derivados de **DAB** y de **LAB** conjugados con aminas aromáticas (compuestos **6a-d** y **7a-d**); tabla 3.1.2.2, derivados de **DAB** conjugados con aminoalcoholes (compuestos **6f-m**); y tabla 3.1.2.3, derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminoácidos (**8a-f**, **9a-f**), y derivados de tipo 2-oxopiperacina (**10-12**). Su actividad inhibitoria se comparó con la **DAB** y **LAB**, determinada previamente en este trabajo y descrita en el apartado anterior (apartado 3.1.1 tabla 3.1.1), constatándose que los perfiles de inhibición de los nuevos derivados difieren considerablemente de los de los productos **DAB** y **LAB**. Los compuestos **6d**, **6h**, **6l**, **8a**, **8d** y **10** no presentaron efecto inhibitor (IC<sub>50</sub> ≥ 1 mM) frente a las glicosidasas estudiadas, por esta razón no se incluyeron en las tablas.

A continuación se describen los efectos más destacados de los nuevos derivados sobre cada una de las glicosidasas estudiadas.

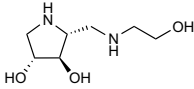
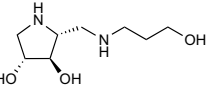
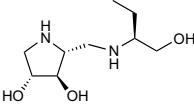
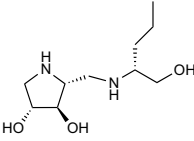
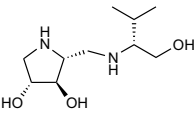
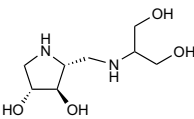
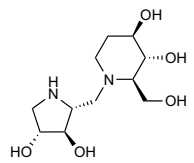


**Tabla 3.1.2.1** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM) (entre paréntesis), de los derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminas aromáticas frente a glicosidasas comerciales.

Compuesto	Estructura	α-D-glucosidasa <sup>[a]</sup>	α-D-glucosidasa <sup>[b]</sup>	β-D-glucosidasa	β-D-galactosidasa	α-L-rhamnosidasa
<b>6a</b>		n.i.	n.i.	370 ± 11 (215 ± 18) C	155 ± 19 (406 ± 128) NC	n.i.
<b>7a</b>		40 ± 6 (44 ± 13) NC	620 ± 29 (236 ± 61) C	n.i.	n.i.	15.6 ± 0.5 (38 ± 12)
<b>6b</b>		n.i.	n.i.	832 ± 105 (338 ± 116) C	n.i.	n.i.
<b>7b</b>		136 ± 13 (208 ± 102) NC	n.i.	38 ± 4 (41 ± 13) C	n.i.	274 ± 34 (699 ± 467)
<b>6c</b>		165 ± 44 (170 ± 95) C	n.i.	n.i.	263 ± 50 (308 ± 55) NC	n.i.
<b>7c</b>		247 ± 26 (100 ± 66) NC	n.i.	n.i.	401 ± 66	132 ± 31 (132 ± 27) C
<b>7d</b>		n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	320 ± 130 (331 ± 19) NC

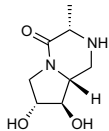
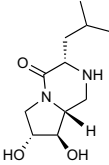
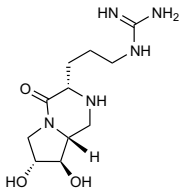
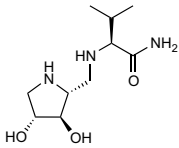
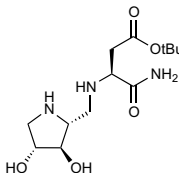
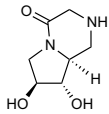
Valores expresados como promedio de triplicados ± error estándar de la media (SEM). [a] de levadura de cerveza y [b] de arroz. C inhibición competitiva; NC inhibición no competitiva; AC inhibición acompetitiva; y n.i. no inhibición a la concentración de 1 mM. Los derivados aromáticos de DAB y LAB no resultaron activos frente a α-D-mannosidasa ni frente a α-L-fucosidasa, por esta razón, estas enzimas no se incluyeron en la tabla.

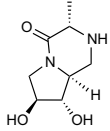
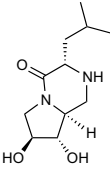
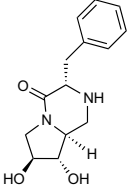
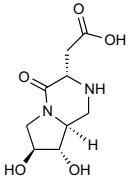
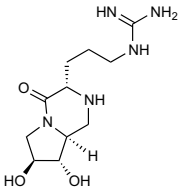
**Tabla 3.1.2.2.** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM) (entre paréntesis), de los compuestos derivados de **DAB** conjugados con aminoalcoholes frente a glicosidasas comerciales.

Compuesto	Estructura	α-D-glucosidasa <sup>[a]</sup>	α-D-glucosidasa <sup>[b]</sup>	β-D-glucosidasa
<b>6f</b>		273 ± 31 (358 ± 52) NC	n.i.	n.i.
<b>6g</b>		158 ± 25 (153 ± 8) NC	n.i.	n.i.
<b>6i</b>		n.i.	n.i.	260 ± 100 (734 ± 19) NC
<b>6j</b>		4.6 ± 1.6 (2.1 ± 0.8) C	342 ± 90 (144 ± 90) C	150 ± 71 (223 ± 9) NC
<b>6k</b>		110 ± 13 (96 ± 10) NC	n.i.	n.i.
<b>6l</b>		n.i.	n.i.	460 ± 353 (561 ± 30) NC
<b>6m</b>		n.i.	466 ± 64 (186 ± 21) C	n.i.

Valores expresados como promedio de triplicados ± error estándar de la media (SEM). [a] de levadura de cerveza y [b] de arroz. C inhibición competitiva; NC inhibición no competitiva; AC inhibición acompetitiva; y n.i. no inhibición a la concentración de 1 mM. Los derivados de DAB y LAB conjugados con aminoalcoholes no resultaron activos frente a β-D-galactosidasa, α-L-rhamnosidasa, α-D-mannosidasa ni frente a α-L-fucosidasa, por esta razón, estas enzimas no se incluyeron en la tabla.

**Tabla 3.1.2.3.** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM) (entre paréntesis), de los compuestos derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminoalcoholes y del tipo 2-oxopiperazina frente a glicosidasas comerciales.

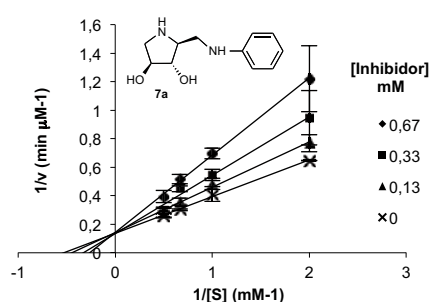
Compuesto	Estructura	α-D-glucosidasa <sup>[a]</sup>	α-D-glucosidasa <sup>[b]</sup>	β-D-glucosidasa	β-D-galactosidasa	α-D-mannosidasa
<b>8b</b>		n.i.	76 ± 19 (39 ± 2) NC	n.i.	1116 ± 28	n.i.
<b>8c</b>		9.2 ± 1.5 (7.1 ± 1.5) C	208 ± 23 (261 ± 29) C	285 ± 15 (394 ± 19) C	n.i.	n.i.
<b>8f</b>		n.i.	60 ± 19 (21 ± 7) C	n.i.	n.i.	n.i.
<b>11</b>		1.1 ± 0.1 (54 ± 20) NC	448 ± 214 (190 ± 33) C	n.i.	n.i.	n.i.
<b>12</b>		3.9 ± 3.1 (16.7 ± 7.8) C	685 ± 110 (451 ± 170) C	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9a</b>		401 ± 35 (323 ± 65) NC	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

<b>9b</b>		239 ± 9 (323 ± 64) NC	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9c</b>		340 ± 25 (337 ± 84) NC	14 ± 2 (13 ± 2) C	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9d</b>		50 ± 14 (76 ± 8) AC	148.0 ± 49.6 (87.1 ± 25.2) C	n.i.	690.5 ± 85.9	174.4 ± 12.4 (103.2 ± 26.8) NC a = 1
<b>9e</b>		41 ± 8 (181 ± 24) AC	382 ± 41 (176 ± 4) C	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9f</b>		140 ± 44 (124 ± 13) NC	n.i.	n.i.	n.i.	709 ± 56

Valores expresados como promedio de triplicados ± error estándar de la media (SEM). [a] De levadura. [b] de arroz. C inhibición competitiva; NC inhibición no competitiva; AC inhibición acompetitiva; y n.i. no inhibición a la concentración de 1 mM. Los derivados de DAB y LAB conjugados con aminoácidos y del tipo 2-oxopiperazina no resultaron activos frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa ni frente a  $\alpha$ -L-fucosidasa, por esta razón, estas enzimas no se incluyeron en la tabla.

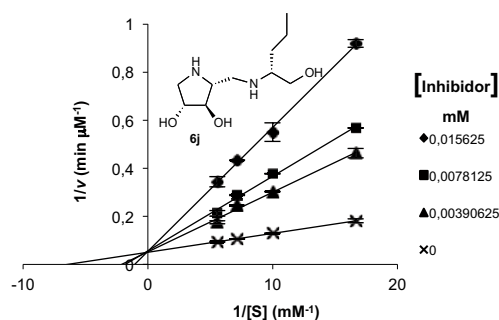
*α-D-Glucosidasa de Saccharomyces cerevisiae y de arroz:*

Los conjugados aromáticos **6a-c** y **7a-d** presentaron propiedades inhibitorias frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de *S. cerevisiae*, con eficiencias mucho menores que los compuestos de los que derivan, **DAB** y **LAB** (tablas 3.1.1 y 3.1.2.1). Siendo los compuestos **6a** y **6b**, derivados de **DAB**, totalmente inactivos. De los compuestos activos **6c**, **7a**, **7b** y **7c**. Sólo **7a** mostró inhibición moderada del tipo no competitivo frente a esta enzima ( $k_i = 44 \pm 13 \mu\text{M}$ ) y fue el único con actividad frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz (figura 3.1.2.2).



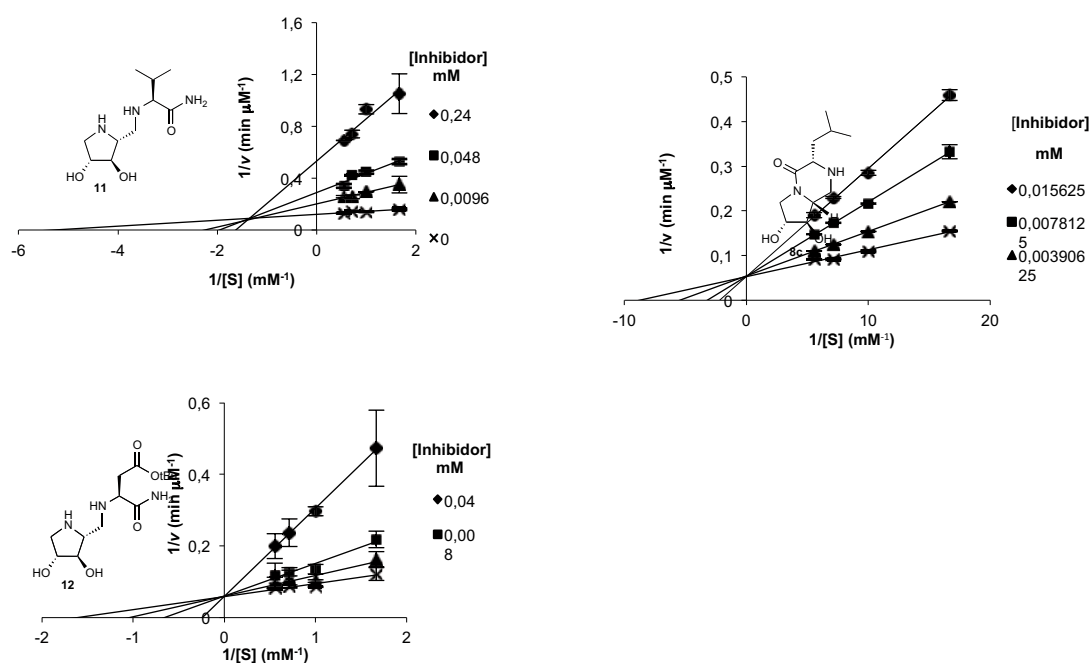
**Figura 3.1.2.2** Diagramas dobles recíprocos de Lineweaver-Burk del compuesto **7a** frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz

En general, los derivados de **DAB** conjugados con aminoalcoholes ganaron especificidad respecto a **DAB**, resultando únicamente inhibidores de  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasas. Los compuestos **6f**, **6g**, **6j**, y **6k** resultaron inhibidores de  $\alpha$ -D-glucosidasa de *Saccharomyces*, siendo el compuesto **6j** el más potente ( $k_i = 2.1 \pm 0.8 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.2.2), con un valor de  $K_i$  del mismo orden que el **DAB** (tabla 3.1.1) y de tipo competitivo (figura 3.1.2.3).



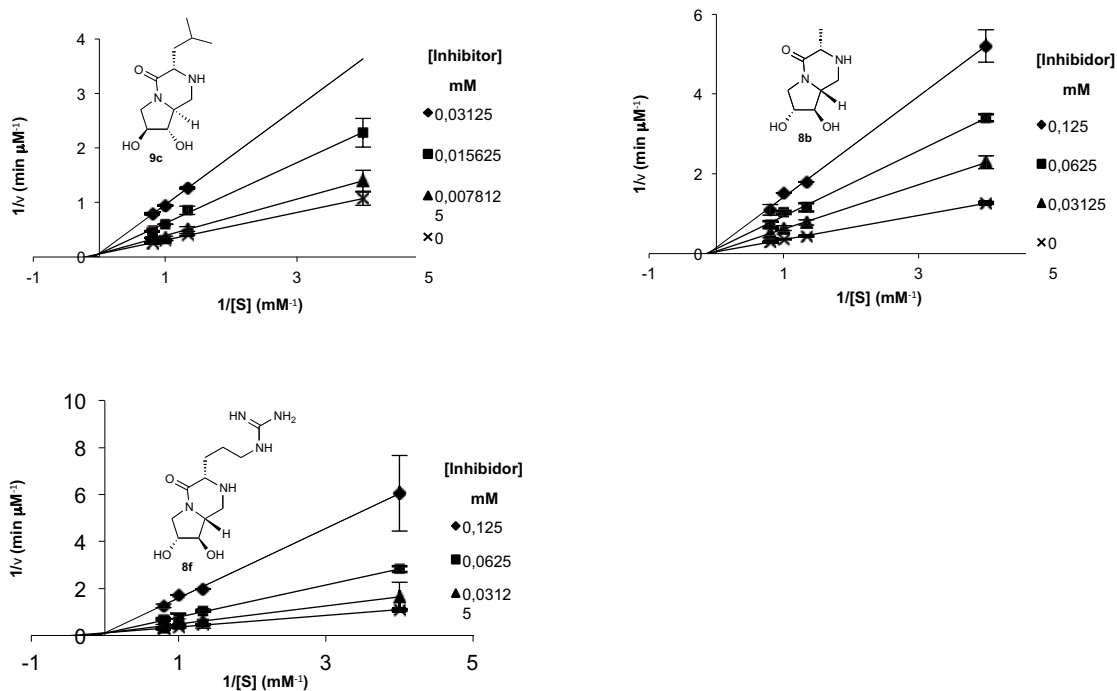
**Figura 3.1.2.3** Diagrama de Lineweaver-Burk del producto **6j** sobre la enzima  $\alpha$ -D-glucosidasa de *S. Cerevisiae*

De los compuestos derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminoácidos y del tipo 2-oxipiperazina (tabla 3.1.2.3), **8c** ( $k_i = 7.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ) y **12** ( $k_i = 16.7 \pm 7.8 \mu\text{M}$ ), fueron los mejores inhibidores del tipo competitivo (figura 3.1.2.4) de  $\alpha$ -D-glucosidasa de *Saccharomyces*, mientras que el **11** ( $k_i = 54 \pm 20 \mu\text{M}$ ) fue el mejor inhibidor de esta enzima del tipo no competitivo (figura 3.1.2.4). Aunque la estructura de los sustituyentes difiere considerablemente, todos ellos derivan de **DAB**, el compuesto más activo frente a esta enzima ( $k_i = 0.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.1).



**Figura 3.1.2.4** Diagrama de Lineweaver-Burk de los productos **8c**, **11** y **12** sobre la enzima  $\alpha$ -D-glucosidasa de *S. Cerevisiae*

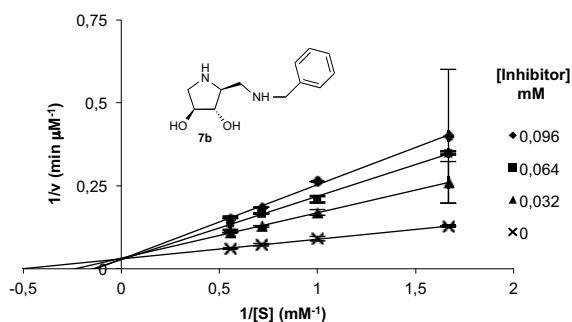
La mayoría de los derivados aromáticos y los conjugados con aminoalcoholes resultaron ser inactivos frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz (tablas 3.1.2.1 y 3.1.2.2). Entre los derivados del tipo 2-oxipiperazina, el compuesto **9c** ( $k_i = 13 \pm 2 \mu\text{M}$ ) fue el inhibidor más potente de esta enzima, de tipo competitivo (figura 3.1.2.5), mientras que los compuestos **8b** ( $k_i = 39 \pm 2 \mu\text{M}$ ) y **8f** ( $k_i = 21 \pm 7 \mu\text{M}$ ), aunque menos potentes, presentaron también propiedades inhibitorias más eficaces que las de **DAB** ( $k_i = 104 \pm 75 \mu\text{M}$ ), el compuesto del cual derivan (tabla 3.1.2.3).



**Figura 3.1.2.5** Diagrama de Lineweaver-Burk de los productos **9c**, **8b** y **8f** sobre la enzima  $\alpha$ -D-glucosidasa arroz

*$\beta$ -D-glucosidasa de almendra dulce:*

El compuesto **7b** ( $k_i = 41 \pm 13 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.2.1) resultó ser un inhibidor competitivo moderado de  $\beta$ -D-glucosidasa (figura 3.1.2.6) mientras que tanto el compuesto del que deriva, **LAB**, como su enantiómero, **DAB**, fueron inhibidores menos potentes de esta enzima. El resto de compuestos evaluados presentaron actividad baja (**6a**, **6b**, **6c**, **6j**, **6l** y **8c**) o resultaron completamente inactivos frente a esta enzima (tabla 3.1.2.2).



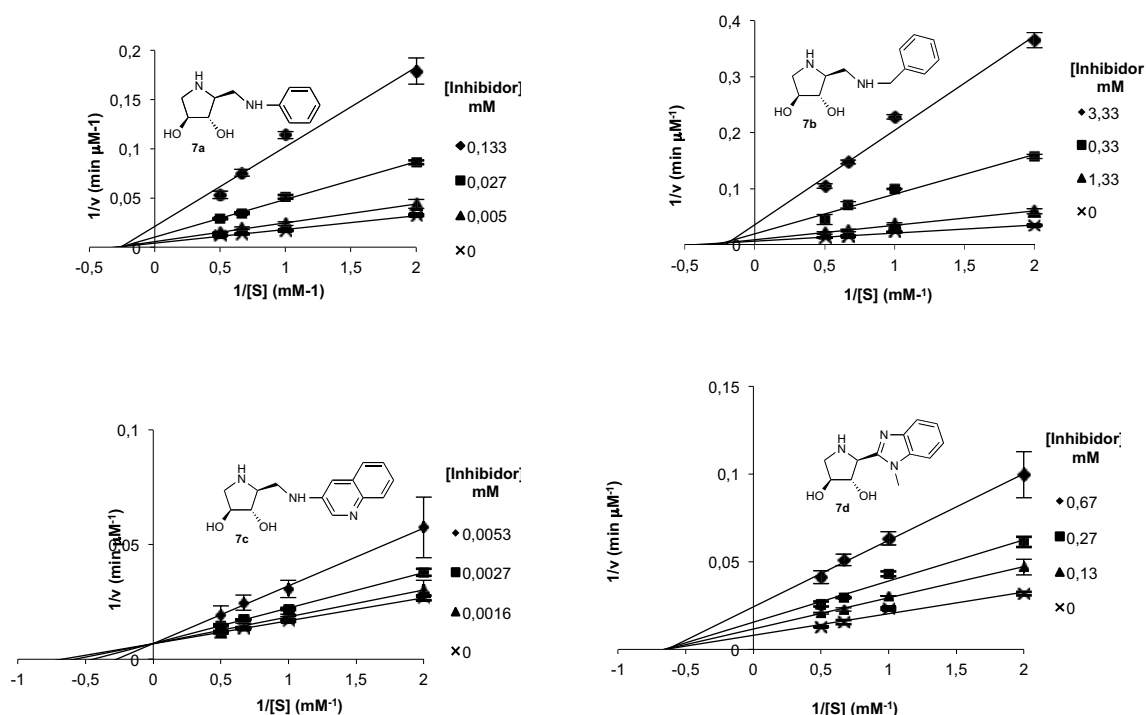
**Figura 3.1.2.6** Diagrama de Lineweaver-Burk del producto **7b** sobre la enzima  $\beta$ -D-glucosidasa de almendra

### *β-D-galactosidasa de hígado bovino:*

Los derivados aromáticos **6a**, **6c** y **7c** fueron inhibidores débiles de *β-D-galactosidasa* mientras que **DAB** y **LAB** fueron inactivos frente a esta glicosidasa. Los datos parecen indicar que la presencia de un grupo funcional aromático es necesaria para la actividad inhibitoria de esta glicosidasa<sup>[101]</sup>. De los derivados de iminociclitolos del tipo 2-oxopiperazina, sólo **9d** ( $IC_{50} = 690 \pm 86 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.2.3), derivado de fenilalanina (i.e. grupo aromático), presentó cierta actividad.

### *α-L-Rhamnosidasa de Penicillium decumbens:*

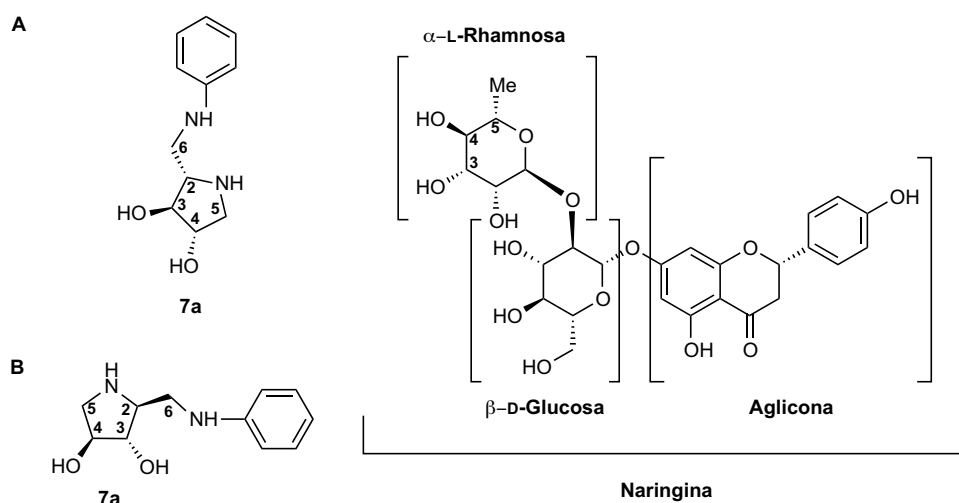
De los compuestos de referencia, solo **LAB** resultó inhibidor de *α-L-rhamnosidasa*. En consecuencia, entre los derivados de **DAB** y **LAB**, de las sustituciones aromáticas, sólo aquellas que presentaban configuración **LAB**, i.e. **7a-d**, fueron activos frente a esta enzima (figura 3.1.2.7). Esto podría indicar que la orientación de los grupos hidroxilo y de la amina aromática son necesarios y para determinan la correcta interacción con esta glicosidasa.



**Figura 3.1.2.7** Diagramas de Lineweaver-Burk de los productos **7a-d** sobre la enzima *α-L-rhamnosidasa* de *P. decumbens*



Se ha sugerido que la inhibición de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa por algunas pirrolidinas puede racionalizarse en términos de similitud estereoquímica con  $\alpha$ -L-rhamnosa<sup>[101-102]</sup>. Considerando la estructura de la naringina, el sustrato natural de esta enzima (figura 3.1.2.2), parece que la estereoquímica de **LAB** y sus derivados **7a-d** (2*S*,3*S*,4*S*) en los carbonos C2, C3 y C4 encaja con la de la  $\alpha$ -L-rhamnosa (figura 3.1.2.2).

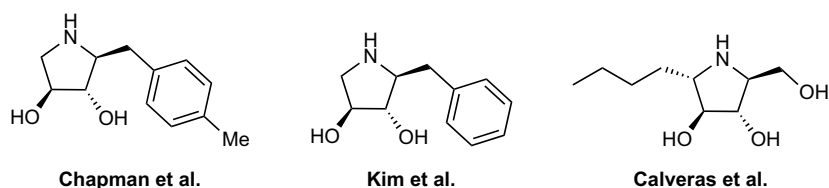


**Figura 3.1.2.8** Representación de la estructura del derivado de **LAB** conjugado con amina aromática, **7a**, el mejor inhibidor de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa comparada con la de su sustrato naringinasa<sup>[92]</sup>

Esto colocaría C6, que contiene el grupo 2-aryl, en la misma posición que el grupo 5-metil de la  $\alpha$ -L-rhamnosa (figura 3.1.2.8), tal y como proponen Chapman *et al.* para el compuesto (2*S*,3*S*,4*S*)-2-benzilpirrolidina-3,4-diol<sup>[101]</sup> (figura 3.1.2.9). En nuestro estudio, el mejor inhibidor de esta enzima fue **7a** ( $k_i = 38 \pm 12 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.2.1), cuya estructura es similar a la reportada por Chapman *et al.* en el trabajo citado anteriormente. Además, otros estudios sobre esta enzima llevados a cabo previamente en nuestro laboratorio por Calveras *et al.*<sup>[92]</sup> con otras pirrolidinas (figura 3.1.2.9) proponen que el grupo 3-butil en C5 ocuparía la posición en el centro activo que el metilo de la  $\alpha$ -L-rhamnosa. Para el **LAB** y sus derivados aromáticos sucedería lo mismo, el sustituyente aromático ocuparía esta posición en el centro activo tal y como indican los estudios de Chapman *et al.*<sup>[101]</sup> y Calveras *et al.*<sup>[92]</sup>.

Existe otra teoría, propuesta por Kim *et al.* <sup>[102]</sup>, que sugiere que estos sustituyentes hidrofóbicos en la posición C2 de las pirrolidinas actúan en el centro activo de la naringinasa, ocupando la posición de la parte aglicona de la naringina.

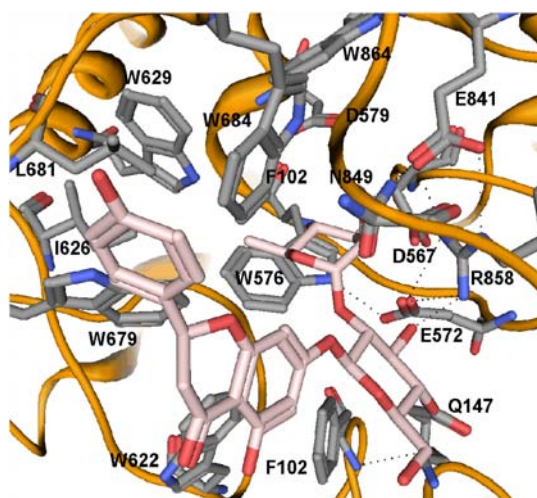
Esto es consistente con la ausencia de propiedades inhibitorias de los derivados del tipo aminoalcohol y 2-oxopiperazina (figura 3.1.2.1), que contienen principalmente grupos funcionales no aromáticos en esta posición.



**Figura 3.1.2.9** Representación de las estructuras de las pirrolidinas inhibidoras de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa reportadas por Chapman *et al.* <sup>[101]</sup>, Kim *et al.* <sup>[102]</sup> y Calveras *et al.* <sup>[92]</sup>

Sin embargo, la ausencia de datos estructurales para la  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens* impide dilucidar cuál es exactamente el modo de acción de los inhibidores del tipo pirrolidina en el centro activo de esta enzima.

Recientemente, se resolvió la estructura cristalográfica de la enzima homóloga de *Bacillus sp.* <sup>[103]</sup>, en la figura 3.1.2.10 se muestra el modo de unión de la naringina en el centro activo de esta enzima.

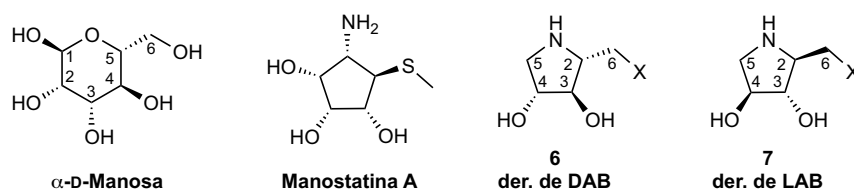


**Figura 3.1.2.10** Representación del centro activo del enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *Bacillus sp.* con la mejor posición obtenida del docking molecular de la naringina (rosa) <sup>[92]</sup>

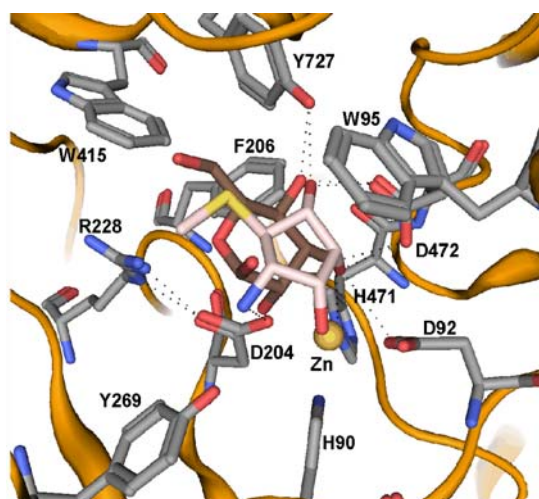
*$\alpha$ -D-Manosidasa de judía y  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón bovino:*

De los productos de referencia, sólo **DAB** presentó actividad sobre  *$\alpha$ -D-manosidasa* y  *$\alpha$ -L-fucosidasa*, pero no sus derivados.

Parece que la disposición en *cis* de los grupos hidroxilo en las posiciones C3 y C4 de los iminociclitos, paralelos a los grupos hidroxilo de los carbonos C2 y C3 de la  *$\alpha$ -D-manosa* (figura 3.1.2.11), es un requerimiento estructural muy fuerte para la inhibición de la enzima  *$\alpha$ -D-manosidasa* por inhibidores del tipo pirrolidina<sup>[92, 104]</sup>. Otras piperidinas como la manostatina A (figura 3.1.2.11), que se sabe que son inhibidoras de esta enzima presentan la misma disposición en *cis*. Sin embargo, **DAB**, **LAB** y sus derivados presentan disposición *trans* en los carbonos C3 y C4 paralelos a los carbonos C2 y C3 de la  *$\alpha$ -D-manosa* (figura 3.1.2.11).



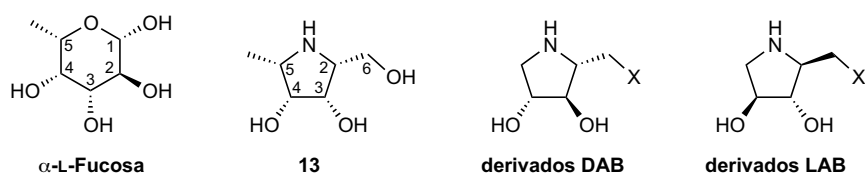
**Figura 3.1.2.11.** Representación de las estructuras de la  *$\alpha$ -D-manosa* y de la manostatina A



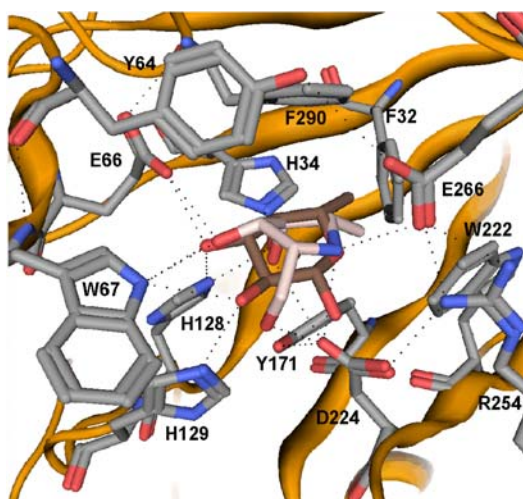
**Figura 3.1.2.12.** Representación del centro activo del enzima  *$\alpha$ -D-manosidasa* de *D. melanogaster* con la mejor posición obtenida del docking molecular de la manostatina A (rosa) y de la manosa (marrón)<sup>[92]</sup>

En la figura 3.1.12 se muestra el modo de unión de la manostatina A y de la manosa en el centro activo de  $\alpha$ -D-manosidasa. El hecho de que los iminociclitolos probados en este trabajo no posean disposición *cis* en los carbonos C3 y C4 es probablemente la razón de su incapacidad para inhibir esta glicosidasa.

De forma similar a la  $\alpha$ -D-manosidasa, la  $\alpha$ -L-fucosidasa posee una gran demanda estereoquímica en el centro activo<sup>[92]</sup> (figura 3.1.2.14). Los derivados pirrolidínicos con estereoconfiguración (3*S*,4*R*,5*S*) fueron descritos previamente como inhibidores potentes de  $\alpha$ -L-fucosidasa<sup>[92, 105]</sup> (compuesto **13**, figura 3.1.2.13), mientras que los análogos diastereoméricos presentaron un efecto débil o moderado<sup>[106]</sup>. Los derivados de **DAB** y **LAB** estudiados en este trabajo<sup>[19]</sup> presentan configuración (3*R*,4*R*) y (3*S*,4*S*), por eso no presentan actividad inhibitoria de la actividad de esta enzima.



**Figura 3.1.2.13** Representación de las estructuras de la  $\alpha$ -L-fucosa, del compuesto **13**, y de los derivados de **DAB** y **LAB**



**Figura 3.1.2.14** Representación de la estructura cristalina de la L-fucosa (marrón) en centro activo del enzima  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (PDB 1ODU) con la mejor posición obtenida del docking molecular del compuesto **13**(rosa)<sup>[92]</sup>

### 3.1.3 Propiedades inhibitorias de los nuevos iminociclitoles del tipo pirrolizidina

Se estudió el efecto de las pirrolizidinas polihidroxiadas **18-27** sintetizadas para este trabajo<sup>[68]</sup> sobre la actividad de la selección de glicosidasas comerciales citadas en los apartados anteriores (3.1.1 y 3.1.2) y además, se incluyeron en el estudio los compuestos **28** y **29** sintetizados anteriormente en nuestro grupo de investigación en los trabajos de Calveras *et al.*<sup>[93b]</sup> (Figura 3.1.3.1).

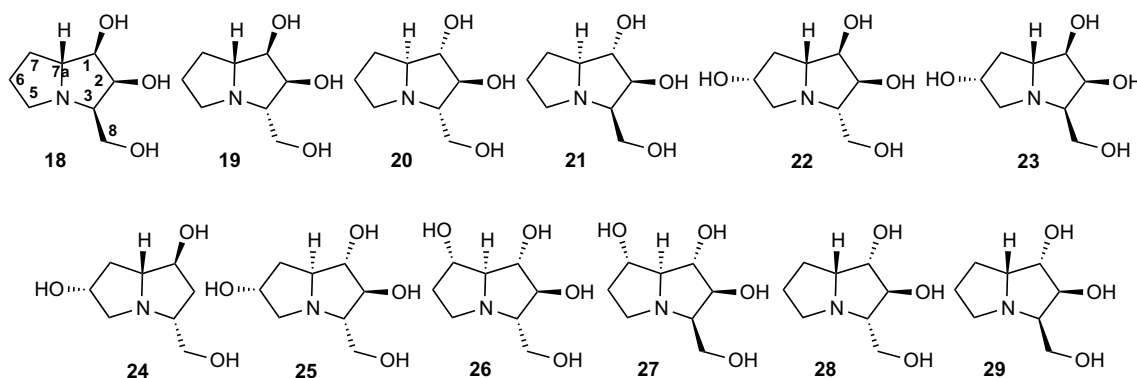


Figura 3.1.3.1. Pirrolizidinas estudiadas (**18-29**)<sup>[68, 91, 93]</sup>

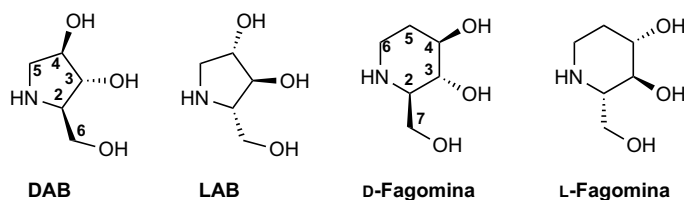


Figura 3.1.3.2. Estructura de los compuestos de referencia

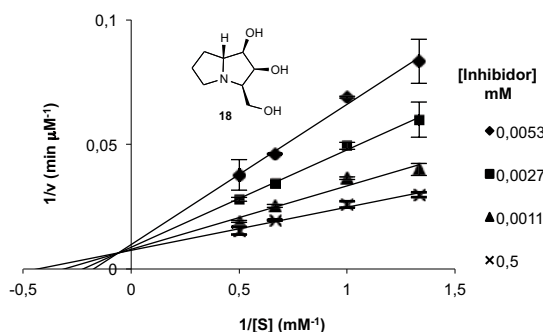
La actividad de las pirrolizidinas polihidroxiadas **18-29** frente al panel de glicosidasas comerciales (tabla 3.1.3) se comparó con la actividad que presentaron los iminociclitoles **DAB**, **LAB**, **D-fagomina** y **L-fagomina** (tabla 3.1.1). Para facilitar la comparación de las estructuras, en la figura 3.1.3.2 se representan las estructuras de los compuestos de referencia en la misma orientación que las pirrolizidinas (figura 3.1.3.1).

Las pirrolizidinas polihidroxiadas fueron activas y selectivas frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz, siendo el producto **20** el más eficaz. El compuesto **20** ( $k_i = 4.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.3) presenta una configuración en C1, C2, C3 y C7a idéntica a la de **LAB**, el más

potente frente a esta enzima ( $k_i = 0.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.1). Según los resultados (tabla 3.1.3), parece que tanto la presencia de grupos hidroxilo en el carbono C6 (**25**) o en el carbono C7 (**26**); como la inversión del estereocentro en C7a (**28**) tienen un efecto reductor del poder de inhibición, es decir que aumentan los valores de  $K_i$  y producen potencias inhibitorias más débiles.

El producto **18** ( $k_i = 2.1 \pm 13 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.3) fue el más eficaz frente a la enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens* con un valor de  $K_i$  10 veces más bajo que el **28** que presenta los estereocentros C1 y C3 invertidos y mucho menor que el de **29** y **19**, que presentan inversión sólo en uno de estos dos centros, o en C1 o en C3. La actividad frente a esta enzima fue de tipo no competitivo (figura 3.1.3.3).

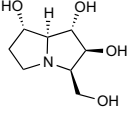
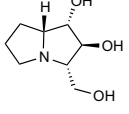
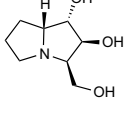
El compuesto **18** presentó además, actividad frente a  $\alpha$ -L-fucosidasa, siendo la pirrolizidina más potente frente a esta enzima de las sintetizadas estudiadas en este trabajo ( $k_i = 18 \pm 16 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.2.1). Esto indica que la presencia de un grupo hidroxilo en C6 (**23**) y la pérdida del grupo hidroxilo en C2 (**24**) disminuyen la actividad frente a  $\alpha$ -L-fucosidasa.



**Figura 3.1.3.3.** Representación de Lineweaver-Burk del producto **18** frente a la enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*

**Tabla 3.1.3.** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM) (entre paréntesis), de los compuestos derivados de pirrolizidinas frente a glicosidasas comerciales

Comp.	Estructura	α-D- glucosidasa <sup>[a]</sup>	α-D- glucosidasa <sup>[b]</sup>	β-D- glucosidasa	β-D- galactosidasa	α-L- rhamnosidasa	α-D- mannosidasa	α-L- fucosidasa
<b>18</b>		n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	2.0 ± 0.2 (2.1 ± 0.8) NC	n.i.	185 ± 9 (18 ± 6) NC
<b>19</b>		n.i.	804 ± 7	n.i.	n.i.	422 ± 12 (340 ± 35) NC	n.i.	264 ± 18 (143 ± 33) C
<b>20<sup>[c]</sup></b>		n.d.	30 (4.7 ± 0.5) C	n.i.	n.i.	115 (57 ± 1) C	n.i.	n.i.
<b>21<sup>[c]</sup></b>		n.d.	700 ±	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>22</b>		n.i.	271 ± 138 (357 ± 110) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>23</b>		n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	598 ± 78 (478 ± 80) C	n.i.	n.i.
<b>24</b>		n.i.	690 ± 287 (411 ± 16) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	620 ± 45
<b>25</b>		n.i.	44 ± 9 (25 ± 3) C	448 ± 60 (555 ± 202) NC	447 ± 22 (688 ± 200) NC	n.i.	174 ± 97 (149 ± 19) C	n.i.
<b>26</b>		n.i.	72 ± 22 (311 ± 23) C	n.i.	n.i.	196 ± 31 (221 ± 9) C	95 ± 41 (600 ± 8) C	327 ± 7 (100 ± 4) C

<b>27</b>		n.i.	$31 \pm 11$ $(477 \pm 91)$ C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>28<sup>[c]</sup></b>		n.d.	800	n.i.	n.i.	$90 \pm$ $(33 \pm 1)$ NC	n.i.	n.i.
<b>29<sup>[c]</sup></b>		n.d.	n.i.	n.i.	n.i.	300	n.i.	n.i.

Valores expresados como promedio de triplicados  $\pm$  error estándar de la media (SEM). [a] De Baker's yeast. [b] de arroz. [c] datos obtenidos de estudios anteriores de nuestro grupo de investigación<sup>[93b]</sup>. C inhibición competitiva; NC inhibición no competitiva; AC inhibición acompetitiva; y n.i. no inhibición a la concentración de 1 mM<sup>[96]</sup>.



### 3.1.4 Propiedades inhibitorias de nuevos iminociclitolos de tipo indolizidina y quinolizidina

Del mismo modo que en los apartados anteriores, se determinaron la propiedades inhibitorias de las indolizidinas polihidroxiladas (**30a-e**, figura 3.1.4.1) y de las quinolizidinas (**31a-f**, figura 3.1.4.2) <sup>[66]</sup> sobre la actividad de diferentes glicosidasas comerciales (tabla 3.1.4).

Sus valores se compararon con los de los de **DAB**, **LAB**, **D-fagomina** y **L-fagomina** (tabla 3.1.1).

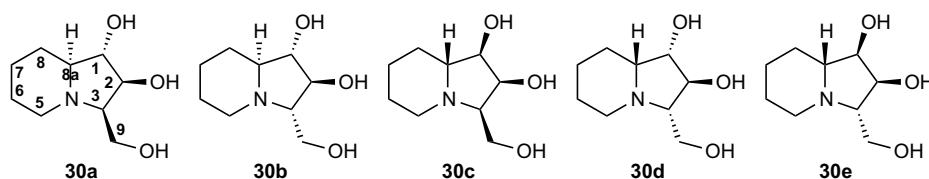


Figura 3.1.4.1. Indolizidinas (**30a-e**) y quinolizidinas (**16a-f**) estudiadas<sup>[66]</sup>

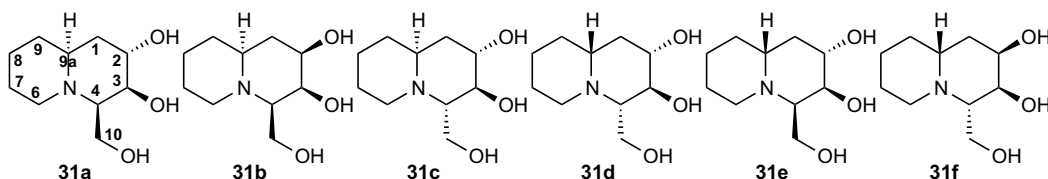


Figura 3.1.4.2. Quinolizidinas (**31a-f**) estudiadas<sup>[66]</sup>

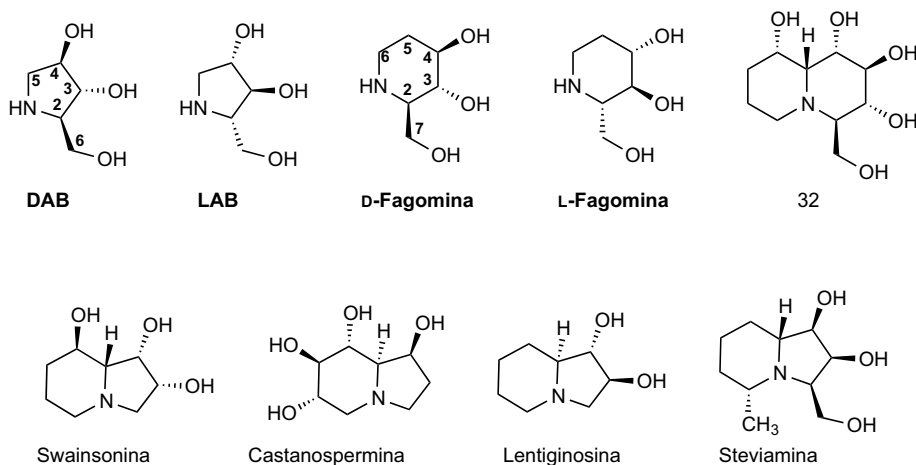


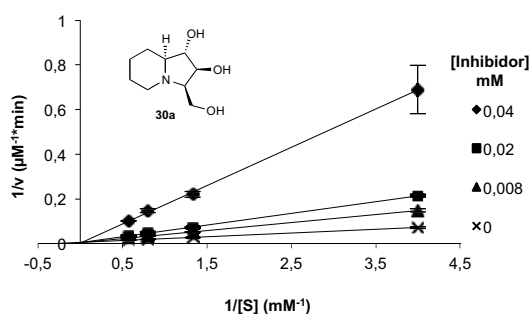
Figura 3.1.4.3. Estructura de los compuestos de referencia para el estudio de indolizidinas y quinolizidinas

### Indolizidinas

Las indolizidinas **30a-e** pueden ser consideradas análogos extendidos de los anillos pirrolidínicos **DAB** y **LAB** pero también análogos de los compuestos lentiginosina y swainsonina (Figura 3.1.4.3). La lentiginosina es un conocido inhibidor selectivo de las amiloglucosidasas de *Aspergillus niger* y de *Rhizopus* pero no es inhibidor ni de  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasas, ni de  $\alpha$ -manosidasa [67]. En cambio, la swainsonina (figura 3.1.4.3), es un inhibidor selectivo y potente de  $\alpha$ -manosidasa de diferentes orígenes, con un valor de  $IC_{50}$  igual a 0.1  $\mu$ M frente a la  $\alpha$ -manosidasa de *Genus canavalia* [94b, 107].

De los resultados obtenidos, cabe destacar los efectos de las indolizidinas **30a** ( $k_i = 3.0 \pm 0.8 \mu$ M, tabla 3.1.4) y **30c** ( $k_i = 21 \pm 2 \mu$ M, tabla 3.1.4), inhibidoras selectivas de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*, resultando **30c**, además, inhibidora de  $\alpha$ -D-manosidasa ( $k_i = 89 \pm 1 \mu$ M, tabla 3.1.4) y  $\alpha$ -L-fucosidasa ( $k_i = 135 \pm 28 \mu$ M, tabla 3.1.2.1); y de **30b** ( $k_i = 229 \pm 44 \mu$ M, tabla 3.1.4), que presentó actividad inhibitoria frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz.

**30a** resultó ser la más potente sobre  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens* ( $k_i = 3.0 \pm 0.8 \mu$ M, tabla 3.1.4). La actividad frente a esta enzima fue de tipo no competitivo (figura 3.1.4.4). Este producto fue selectivo para esta enzima, pues no presentó inhibición significativa sobre la actividad del resto de enzimas del estudio.



**Figura 3.1.4.4.** Representación de Lineweaver-Burk del producto **30a** frente a la enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*

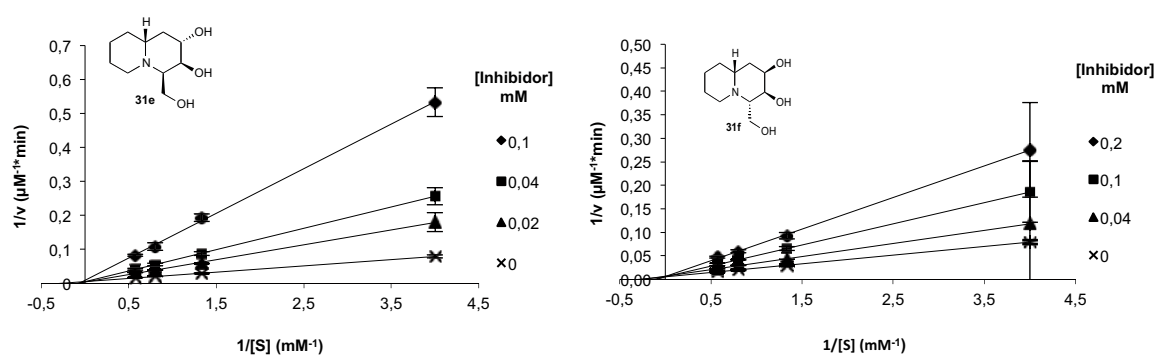
Los resultados obtenidos sugieren que un cambio en la configuración de cualquiera de los centros estereogénicos tiene como consecuencia la pérdida dramática de las propiedades inhibitorias.

### Quinolizidinas

Las quinolizidinas polihidroxiadas pueden ser consideradas análogos de **D-fagomina** y **L-fagomina** y de la quinolizidina (**32**) reportada por Liu et al <sup>[108]</sup> (Figura 3.1.4.2), un inhibidor potente de  $\alpha$ -D-glucosidasa de riñón de cerdo ( $IC_{50}=0.15 \mu\text{M}$ )

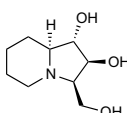
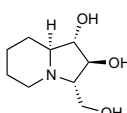
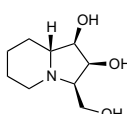
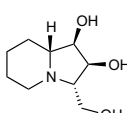
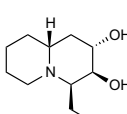
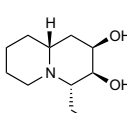
De las quinolizidinas estudiadas, sólo **31e** ( $k_i = 17 \pm 2 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.4) y la **31f** ( $k_i = 76 \pm 7 \mu\text{M}$ , tabla 3.1.4) resultaron ser inhibidoras competitivas (figura 3.1.4.5) selectivas de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa.

El resto de compuestos no presentaron actividad a las concentraciones estudiadas.



**Figura 3.1.4.5.** Representaciones de Lineweaver-Burk de los productos **31e** y **31f** frente a la enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*

**Tabla 3.1.4.1** IC<sub>50</sub> (μM) y K<sub>i</sub> (μM) (entre paréntesis), de los compuestos derivados de indolizidinas y quinolizidinas frente a glicosidasas comerciales

Compuesto	Estructura	α-D- glucosidasa <sup>[b]</sup>	α-D- glucosidasa <sup>[c]</sup>	α-L- rhamnosidasa <sup>[f]</sup>	α-D- mannosidasa <sup>[g]</sup>	α-L- fucosidasa <sup>[h]</sup>
<b>30a</b>		n.i.	n.i.	3.3 ± 0.2 (3.0 ± 0.8) NC	n.i.	n.i.
<b>30b</b>		n.i.	237 ± 68 (229 ± 44) C	113 ± 30 (84 ± 9) NC	n.i.	n.i.
<b>30c</b>		n.i.	n.i.	35 ± 2 (21 ± 2) C	82 ± 9 (89 ± 1) C	593 ± 86 (135 ± 28) C
<b>30e</b>		n.i.	n.i.	55 ± 4 (52 ± 3) C	n.i.	n.i.
<b>31e</b>		n.i.	n.i.	26 ± 5 (17 ± 2) C	n.i.	n.i.
<b>31f</b>		n.i.	n.i.	85 ± 24 (76 ± 7) C	n.i.	n.i.

Valores expresados como promedio de triplicados ± error estándar de la media (SEM). [a] De levadura. [b] de arroz. C inhibición competitiva; NC inhibición no competitiva; AC inhibición acompetitiva; y n.i. no inhibición a la concentración de 1 mM<sup>[96]</sup>. Las indolizidinas y las quinolizidinas no resultaron activas frente a β-D-glucosidasa ni frente a β-D-galactosidasa, por esta razón, estas enzimas no se incluyeron en la tabla.

### 3.1.5 Discusión

De los resultados, resumidos en las tablas anteriores muestran que en general, los productos que presentaron efecto inhibitor de la actividad de alguna de las glicosidasas estudiadas, lo hicieron con menor potencia que los compuestos **DAB** y **LAB**, pero que, por el contrario, resultaron ser más selectivos.

La pérdida de potencia no tiene por qué suponer un problema para el diseño de coadyuvantes o fármacos basados en estas moléculas, si se trata de moléculas no tóxicas a alta concentración, las limitaciones son únicamente sintéticas.

La selectividad es fundamental para el diseño de fármacos o coadyuvantes basados en iminoclitoles porque las enzimas a las que inhiben, glicosidasas y glicosiltransferasas, están involucradas en gran cantidad de procesos y mecanismos biológicos. La ausencia de selectividad puede causar efectos secundarios no deseados o tóxicos derivados de la inhibición de múltiples glicosidasas relacionadas por ejemplo con procesos metabólicos. Nuestro objetivo es, por tanto, la obtención de iminoclitoles selectivos frente a glicosidasas específicas.

Una primera inspección de los resultados obtenidos frente al panel de disacaridasas comerciales muestra que los iminoclitoles estudiados ganaron selectividad principalmente frente a las enzimas  $\alpha$ -D-glucosidasa y frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa.

En primer lugar, la inhibición selectiva de  $\alpha$ -D-glucosidasas sugirió que los compuestos activos, podrían ser inhibidores de la hidrólisis de sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa, llevada a cabo por disacaridasas de la mucosa intestinal, por lo que se decidió continuar este estudio siguiendo esta línea de investigación para tratar de explorar el efecto de estos compuestos frente a disacaridasas de la mucosa intestinal de rata. Estos resultados se exponen y discuten en el siguiente apartado de este capítulo (apartado 3.2).

Además la selectividad de los derivados del tipo iminoclitol frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens* planteó su posible capacidad inhibitoria de la biosíntesis de deoxitimidina difosfato (dTDP)-L-rhamnosa en la pared celular de

*Mycobacterium tuberculosis*, constituyendo potenciales agentes quimioterapéuticos no tóxicos para el tratamiento de la tuberculosis, ya que esta enzima no se encuentra en mamíferos. Por esta razón se estableció un estudio colaborativo con la Dra. Cristina Vilaplana y el Profesor Dr. Pere Joan Cardona del la Unitat de Tuberculosis Experimental (UTE) de la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol de la Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERES. Los productos activos frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa se ensayaron sobre cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Los resultados se describen en el apartado 3.4 de este capítulo.

Por último, se especuló sobre la posible actividad de los derivados de **LAB** y **DAB** conjugados con aminas aromáticas y con aminoácidos frente a la enzima neuraminidasa (sialidasa) viral y su posible aplicación en el tratamiento de infecciones causadas por el virus influenza. Para determinar el efecto de estos productos sobre esta enzima, se procedió a la realización de un ensayo fluorimétrico *in vitro* utilizando como modelo la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* y 4-methylumbelliferil- $\alpha$ -D-neuraminic acid como sustrato <sup>[78]</sup>. La hidrólisis de este sustrato da como productos ácido neuramínico y 4-metilumbelliferona. La concentración de 4-metilumbelliferona es proporcional a la actividad y puede determinarse fluorimétricamente (longitud de onda de excitación 365 nm y longitud de onda de emisión 450 nm)<sup>[78]</sup>. Se realizaron estas pruebas utilizando el compuesto zanamivir como control. Sin embargo por problemas metodológicos no se pudieron determinar las propiedades de estos derivados ya que su espectro de emisión resultó del mismo rango que el de la 4-metilumbelliferona. Se intentaron sin éxito otras metodologías y finalmente se decidió postponer esta línea de investigación.



### **3.2 Propiedades inhibitorias de los iminociclitoles sobre las disacaridasas de la mucosa intestinal y otras enzimas relacionadas con la digestión de carbohidratos en el tracto digestivo**

Las disacaridasas intestinales, sacarasa, maltasa, isomaltasa, lactasa y trehalasa localizadas en la mucosa intestinal del intestino delgado digieren los disacaridos provenientes de la ingesta o de la hidrólisis de polisacáridos transformándolos en monosacáridos absorbibles. A finales de los años 70 se demostró que la inhibición de la actividad de estas enzimas permitía regular la absorción de glucosa en el intestino y que los compuestos inhibidores de estas enzimas podrían ser utilizados para el tratamiento oral de la NIDDM<sup>[95][99]</sup>. Algunos iminociclitoles como la **DNJ**, son inhibidores de disacaridasas intestinales. Uno de sus derivados, el compuesto **Miglitol** fue aprobado por la FDA (US Food and Drug Association) e introducido en el mercado en 1999 como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas intestinales indicado para el tratamiento de la NIDDM.

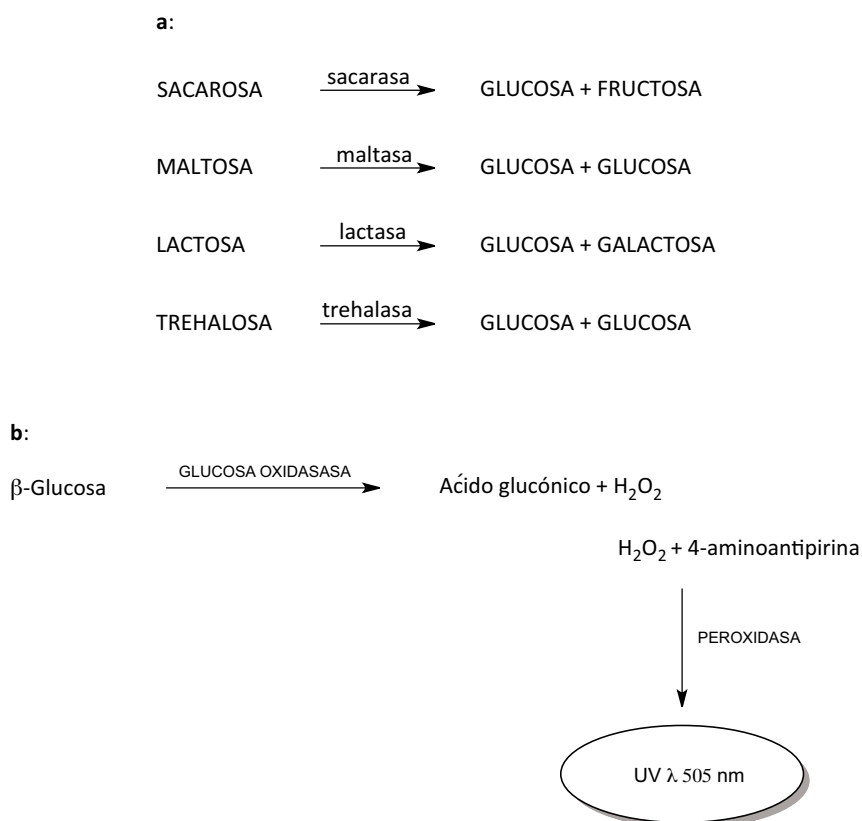
Para determinar si los compuestos sintetizados en nuestro laboratorio poseían estas características se realizó un primer estudio *in vitro* utilizando como modelo la mucosa intestinal de la zona del yeyuno de ratas machos de la cepa Sprague-Dawley. Sobre este modelo se determinó el efecto de los compuestos sobre la digestión de disacáridos y de almidón. Además se estudió su efecto sobre otras enzimas del tipo endo- y exoglucosidasa relacionadas con la hidrólisis de almidón ( $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa).

Con el fin de obtener unos valores de referencia para comparar los efectos de los productos derivados de iminociclitoles sintetizados en nuestro grupo de investigación se incluyeron en el estudio **DAB**, **LAB**, **D-fagomina** y **L-fagomina**.

La determinación de actividad de las disacaridasas intestinales y de la digestión de almidón en la mucosa intestinal se realizó siguiendo el método de Dahlqvist<sup>[109]</sup>, un método colorimétrico en el que se determina la glucosa liberada por la hidrólisis de los sustratos naturales (sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa y almidón) de las disacaridasas de la mucosa intestinal. Se trata de un método enzimático acoplado a glucosa oxidasa y peroxidasa, en el que la glucosa se transforma en ácido glucónico y



peróxido de hidrógeno por acción de la glucosa oxidasa, y la peroxidasa cataliza la combinación de peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina generando un compuesto estable y coloreado detectable a 505 nm (figura 3.2). La metodología utilizada se detalla en la sección experimental de esta tesis (capítulo 5, apartado 5.3).



**Figura 3.2 a:** Primer paso del método de determinación de actividad de las disacaridasas. Las disacaridasas hidrolizan los disacáridos en sus correspondientes monómeros. **b:** La glucosa formada se determina por el método de Dahlqvist<sup>[109]</sup>.

La actividad amiloglicosidasasa se determinó sobre la amiluglicosidasa comercial de *Aspergillus niger* siguiendo el método colorimétrico del *p*-nitrofenol, descrito en el apartado 3.1 para la determinación de actividad de las glicosidasas. Y la actividad α-amilasa se determinó sobre la variante comercial de saliva humana y sobre la de páncreas bovino. Las metodologías empleadas en estos estudios se explican en detalle en el apartado 5.3 del capítulo 5 (sección experimental) de este trabajo.

Se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> de cada uno de los compuestos activos. Las representaciones gráficas de las curvas dosis-respuesta que se emplearon pueden consultarse en el material adicional (CD adjunto).

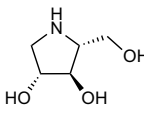
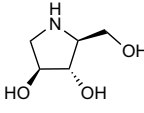
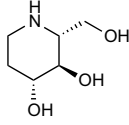
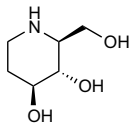
### 3.2.1 Propiedades inhibitorias de los compuestos DAB, LAB, D-fagomina y L-fagomina

#### 3.2.1.1 Efecto sobre las disacaridasas intestinales

Los compuestos de referencia **DAB**, **LAB** **D-fagomina** y **L-fagomina** presentaron valores de  $IC_{50}$  del orden de los descritos en la literatura en estudios anteriores<sup>[64, 97]</sup>. Los valores de  $IC_{50}$ , obtenidos sobre las diferentes disacaridasas estudiadas se resumen a continuación (tabla 3.2.1.1). **DAB** y **LAB** resultaron activos frente a todas las disacaridasas intestinales estudiadas. Siendo **LAB** el inhibidor más potente de las disacaridasas sacarasa ( $IC_{50} = 0.29 \pm 0.02 \mu M$ ) y maltasa ( $IC_{50} = 0.2 \pm 0.1 \mu M$ ).

**D-fagomina** y **L-fagomina** fueron selectivas frente sacarasa y maltasa, aunque su potencia fue dos órdenes de magnitud menor que la de los compuestos anteriores.

**Tabla 3.2.1.1.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) de los compuestos referencia frente a disacaridasas de la mucosa intestinal de rata.

Compuesto	Estructura	Sacarasa	Lactasa	Trehalasa	Maltasa
<b>DAB</b>		22 ± 12	140 ± 84	67 ± 19	50 ± 36
<b>LAB</b>		0.29 ± 0.02	50 ± 36	74 ± 34	0.2 ± 0.1
<b>D-Fagomina</b>		144 ± 26	n.i. <sup>[b]</sup>	n.i.	n.i.
<b>L-Fagomina</b>		484 ± 4	n.i.	n.i.	209 ± 92
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		4.01 ± 0.48	0.75 ± 0.07	2.44 ± 0.41	27.50 ± 3.55

[a] Los experimentos se hicieron por triplicado para cada set de disacaridasas obtenido de una sola rata. Se usaron dos ratas diferentes (n = 2). Las actividades se expresan como media en  $\mu M \pm$  error estándar de la media (SEM); n.i. no inhibición,  $IC_{50} \geq 1$  mM. [b] Definición de actividad: 1 U corresponde a 1 mmol of glucosa formada por hora a 37°C en tampón fosfato a pH 6.8.

### 3.2.1.2 Efecto sobre la hidrólisis de almidón

Para explorar la capacidad de los diferentes compuestos sintetizados de inhibir la hidrólisis de almidón utilizamos como modelo la misma suspensión de mucosa intestinal de rata. El almidón es hidrolizado por las  $\alpha$ -amilasas de saliva y páncreas y por la isomaltasa, liberando glucosa y oligómeros de glucosa como la maltosa que son luego hidrolizados a glucosa por las maltasas de la mucosa intestinal<sup>[110]</sup>.



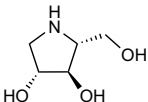
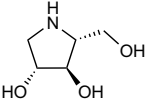
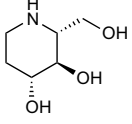
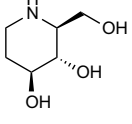
**Figura 1.3.1.1.3.** Esquema de la digestión de almidón que se produce en el intestino delgado <sup>[35d]</sup>

Siguiendo la misma metodología que para las disacaridasas, se determinaron los valores de  $IC_{50}$  de **DAB**, **LAB D-fagomina** y **L-fagomina**, que se resumen en la tabla 3.2.1.2.

Los productos se probaron también como inhibidores de  $\alpha$ -amilasas de saliva y de páncreas, pero ninguno presentó actividad frente a estas enzimas.

También se estudió su efecto sobre la enzima amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (tabla 3.2.1.2) sobre la cual si presentaron efecto inhibitor. **DAB** fue el más potente, siendo la serie D- más potente que la serie L-, frente a esta enzima.

**Tabla 3.2.1.2.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los compuestos para la inhibición de la liberación de glucosa consecuencia de la hidrólisis de almidón por la mucosa intestinal y por la enzima amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*.

Producto	Estructura	Hidrólisis de Almidón <sup>[a]</sup>	Amiloglucosidasa <i>A. niger</i> <sup>[a]</sup>
<b>DAB</b>		15.4 ± 2.1	6.7 ± 1.8
<b>LAB</b>		0.34 ± 0.03	43 ± 14
<b>D-Fagomina</b>		78 ± 13	27 ± 3
<b>L-Fagomina</b>		160 ± 30	98 ± 11
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		20.8 ± 2.4	

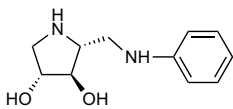
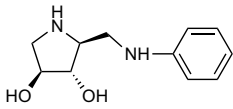
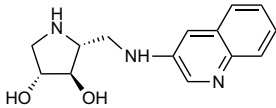
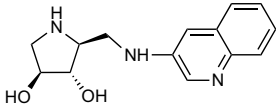
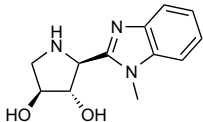
[a] IC<sub>50</sub>: concentración de producto requerida para que se produzca una reducción del 50% de glucosa liberada por hora. [b] Definición de actividad: 1 U corresponde a 1 μmol de glucosa liberada por hora a 37°C en tampón fosfato a pH 6.8.

Los cuatro productos presentaron efecto inhibitor de la hidrólisis de almidón en la mucosa intestinal. **LAB** fue el inhibidor más potente (IC<sub>50</sub> = 0.34 ± 0.03 μM), seguido de **DAB** (IC<sub>50</sub> = 15.4 ± 2.1 μM) y **D-fagomina** (IC<sub>50</sub> = 78 ± 13 μM). **L-fagomina** (IC<sub>50</sub> = 160 ± 30 μM) resultó 10 veces menos potente que **D-fagomina**, siendo el inhibidor más débil de los cuatro.

### 3.2.4 Propiedades inhibitorias de derivados de DAB y de LAB

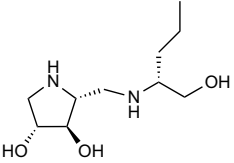
Los derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminas aromáticas **6a-d** y **7a-d**; conjugados con aminoalcoholes **6f-m**; conjugados con aminoácidos y del tipo 2-oxopiperacina **8a-f**, **10**, **11**, **12** y **9a-f**; se probaron frente a las disacaridasas intestinales sacarasa, maltasa y lactasa (Tablas 3.2.2.1, 3.2.2.2 y 3.2.2.3) de la mucosa intestinal. Esta actividad se comparó con la de los compuestos **DAB** y **LAB** (tabla 3.2.1.1).

**Tabla 3.2.2.1.** Actividad,  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ), de los derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminas aromáticas sobre disacaridasas de la mucosa intestinal de rata.

Compuesto	Estructura	Sacarasa	Lactasa	Maltasa
<b>6a</b>		318 ± 101	n.i.	n.i.
<b>7a</b>		538 ± 356	n.i.	n.i.
<b>6c</b>		739 ± 392	n.i.	n.i.
<b>7c</b>		173 ± 72	n.i.	n.i.
<b>7d</b>		824 ± 288	n.i.	n.i.
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		3.91 ± 0.05	0.85 ± 0.07	26.89 ± 1.50

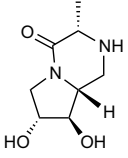
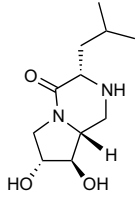
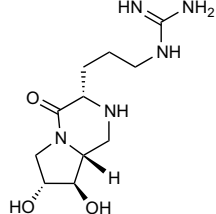
[a] Los experimentos se realizaron por triplicado para cada set de disacaridasas obtenidas de la mucosa de dos ratas ( $n = 2$ ). Valores de  $IC_{50}$  expresados en promedio como  $\mu M \pm$  error estándar de la media (SE); [b] UI ( $\mu mol$  sustrato  $h^{-1} mg^{-1}$  proteína); n.i. no inhibición,  $IC_{50} \geq 1$  mM.

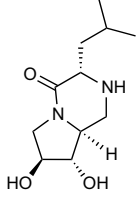
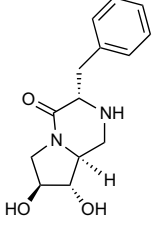
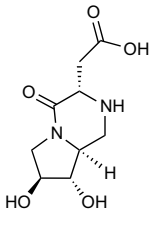
**Tabla 3.2.2.2.** Actividad, IC<sub>50</sub> (μM), de los derivados de **DAB** conjugados con aminoalcoholes sobre disacaridasas de la mucosa intestinal de rata.<sup>[a]</sup>

Compuesto	Estructura	Sacarasa	Lactasa	Maltasa
<b>6j</b>		99 ± 52	n.i.	77 ± 34
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		3.91 ± 0.05 UI	0.85 ± 0.07 UI	26.89 ± 1.50 UI

[a] Los experimentos se realizaron por triplicado para cada set de disacaridasas obtenidas de la mucosa de dos ratas (n = 2). Valores de IC<sub>50</sub> expresados en promedio como μM ± error estándar de la media (SEM); [b] UI (μmol sustrato h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína); n.i. no inhibición, IC<sub>50</sub> ≥ 1 mM.

**Tabla 3.2.2.3.** Actividad, IC<sub>50</sub> (μM), de los derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminoácidos sobre disacaridasas de la mucosa intestinal de rata.<sup>[a]</sup>

Compuesto	Estructura	Sacarasa	Lactasa	Maltasa
<b>8b</b>		57 ± 29	n.i.	119 ± 11
<b>8c</b>		320 ± 57	n.i.	304 ± 23
<b>8f</b>		77 ± 17	n.i.	151 ± 2

<b>9c</b>		19 ± 11	n.i	56 ± 2
<b>9d</b>		174 ± 84	n.i	363 ± 99
<b>9e</b>		342 ± 123	n.i	n.i.
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		3.91 ± 0.05	0.85 ± 0.07	26.89 ± 1.50

[a] Los experimentos se realizaron por triplicado para cada set de disacaridasas obtenidas de la mucosa de dos ratas (n = 2). Valores de IC<sub>50</sub> expresados en promedio como μM ± error estándar de la media (SEM); [b] UI (μmol sustrato h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína); n.i. no inhibición, IC<sub>50</sub> ≥ 1 mM.

Los derivados de **DAB** y **LAB** resultaron activos frente a sacarasa y maltasa. Los productos **6a**, **6c**, **7a**, **7c**, y **7d** (tabla 3.2.2.1) presentaron actividad frente a la enzima sacarasa aunque no resultaron más eficaces que **DAB** y **LAB**. Además, los derivados de **LAB**, **7a-d** perdieron la potente inhibición frente a maltasa del compuesto del que derivan, **LAB**. Entre los derivados conjugados con aminoalcoholes (tabla 3.2.2.2) sólo **6j** presentó actividad frente a sacarasa (IC<sub>50</sub> = 99 ± 52 μM) y maltasa (IC<sub>50</sub> = 77 ± 34 μM). Por lo que se refiere a los derivados de aminoácidos y del tipo 2-oxopiperazina (tabla 3.2.2.3), es importante destacar la actividad de **9c** frente a sacarasa (IC<sub>50</sub> = 19 ± 11 μM) y maltasa (IC<sub>50</sub> = 56 ± 2 μM). Como se describe en el apartado 3.1.2, este compuesto fue el inhibidor más potente de α-glucosidasa de arroz de esta serie. El resto de los compuestos mostraron actividad moderada frente a sacarasa y maltasa. No se observó actividad de los productos en estudio frente a la enzima lactasa.

### 3.2.3 Propiedades inhibitorias de nuevos iminociclitos derivados de pirrolizidinas polihidroxiadas

#### 3.2.3.1 Efecto sobre las disacaridasas intestinales

Se ha reportado que algunas pirrolizidinas polihidroxiadas inhiben disacaridasas de la mucosa intestinal de ratas<sup>[111]</sup>. Por esta razón, estudiamos también la propiedades inhibitorias de las pirrolizidinas **18-27** (Figura 3.2.3.1) sobre disacaridasas de la mucosa intestinal. Se calcularon los valores de IC<sub>50</sub> (tabla 3.2.3.1) de los compuestos activos frente a sacarasa, maltasa, trehalasa y lactasa<sup>[68]</sup>. También se estudiaron las pirrolizidinas **28** y **29** sintetizadas en trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación<sup>[93b]</sup>.

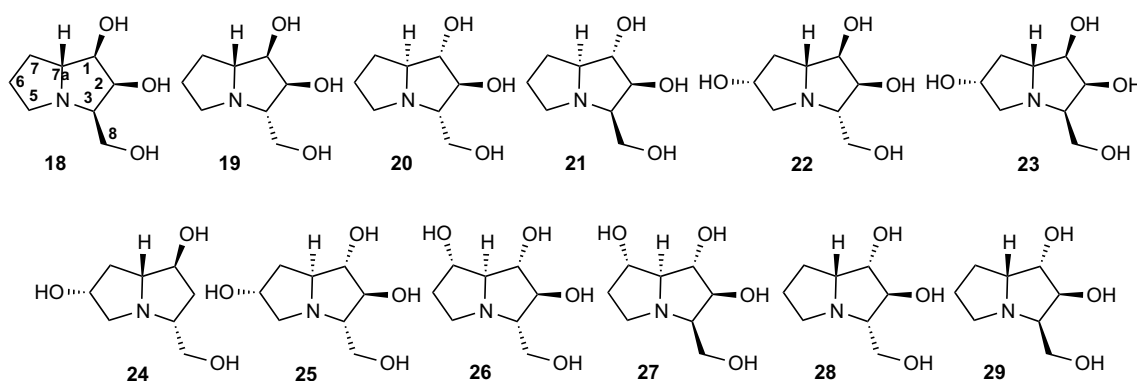


Figura 3.2.3.1. Pirrolizidinas estudiadas (**18-29**)<sup>[68, 91, 93]</sup>

De las pirrolizidinas estudiadas en este trabajo (tabla 3.2.3.1), **25** resultó la más activa frente a sacarasa, lactasa y particularmente frente a maltasa (IC<sub>50</sub> = 88 ± 8 μM), para la que fue selectiva. Este compuesto tiene la misma configuración que **LAB** en los carbonos C1, C2 y C3. Parece que un cambio en el grupo hidroxilo de la posición C6 a la posición C7 (**26**) elimina por completo sus propiedades inhibitorias frente a las disacaridasas, y la inversión de la estereoquímica en el C3 en **26** (**27**) da lugar a la recuperación de cierta actividad. La introducción del grupo hidroxilo en la posición C6 y/o la eliminación del grupo hidroxilo en la posición C2 en **18** (ver compuestos **23**, y **24** respectivamente) también elimina las propiedades inhibitorias. Un cambio en la



configuración de la posición C3 en el compuesto **23** (ver compuesto **22**, figura 3.2.3.1) no tiene efecto en las propiedades inhibitorias.

**Tabla 3.2.3.1.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los compuestos para la inhibición de la liberación de glucosa consecuencia de la hidrólisis de almidón por la mucosa intestinal.

Compuesto	Estructura	Sacarasa	Lactasa	Trehalasa	Maltasa
<b>18</b>		179 ± 56	n.i	n.i.	n.i.
<b>19</b>		463 ± 202	n.i.	n.i.	n.i.
<b>25</b>		138 ± 12	196 ± 12	n.i.	88 ± 8
<b>27</b>		142 ± 55	n.i	224 ± 54	n.i.
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		4.01 ± 0.48	0.75 ± 0.07	2.44 ± 0.41	27.50 ± 3.55

[a] Los experimentos se hicieron performed por triplicado para cada set de disacaridasas obtenido de una sola rata. Se usaron dos ratas diferentes (n = 2). Las actividades se expresan como media en μM ± error estándar de la (SEM); n.i. no inhibición, IC<sub>50</sub> ≥ 1 mM. [b] Definición de actividad: 1 U corresponde a 1 μmol de glucosa formada por hora a 37°C en tampón fosfato a pH 6.8.

## 3.2.4 Propiedades inhibitorias de nuevos iminociclitos del tipo indolizidina y quinolizidina

### 3.2.3.1 Efecto sobre las disacaridasas intestinales

Se estudiaron las propiedades de las indolizidinas polihidroxiadas **30a-e** (figura 3.2.4.1) y las quinolizidinas **31a-f** (figura 3.2.4.2) sintetizadas para este estudio <sup>[66]</sup> frente a disacaridasas de la mucosa intestinal (tabla 3.2.3.1).

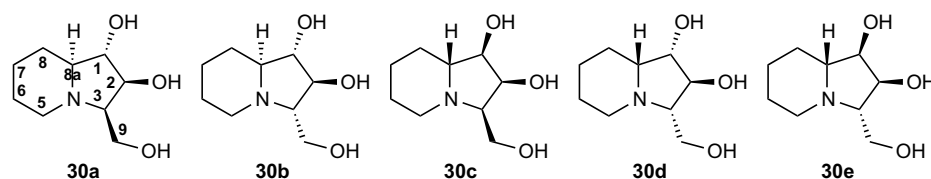


Figura 3.2.4.1. Indolizidinas (**30a-e**) estudiadas<sup>[66]</sup>

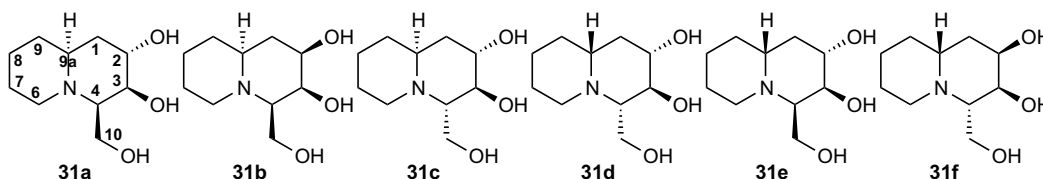


Figura 3.2.4.2. Quinolizidinas (**31a-f**) estudiadas<sup>[66]</sup>

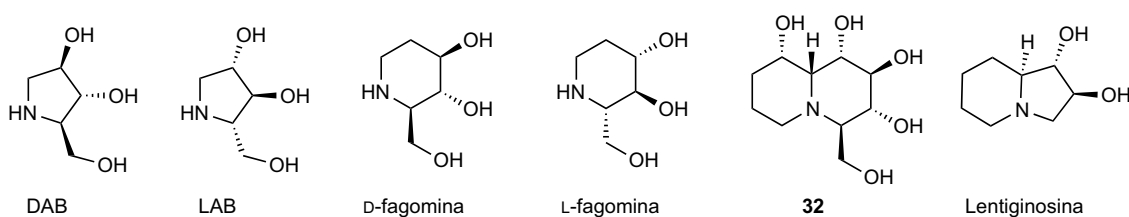


Figura 3.2.4.3. Estructura de los compuestos de referencia para el estudio de indolizidinas y quinolizidinas

### Indolizidinas

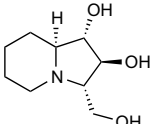
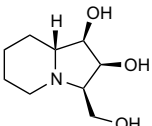
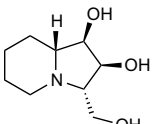
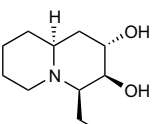
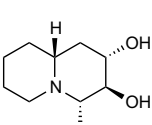
Por lo que respecta a las propiedades inhibitorias de las indolizidinas frente a disacaridasas intestinales, **30b**, **30c** y **30e** fueron inhibitorias selectivas de la sacarasa intestinal (tabla 3.2.4.1). El producto **30b** presenta un valor de  $IC_{50}$  frente a las sacarasa

( $IC_{50} = 62 \pm 3 \mu M$ ) comparable al de **DAB** y menor que los de **D-** y **L-fagomina** (tabla 3.2.1.1).

### Quinolizidinas

Los compuestos **31a** y **31d** resultaron ser selectivos pero poco activos frente a la sacarasa de la mucosa intestinal de rata.

**Tabla 3.2.4.1.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) de los compuestos para la inhibición de la liberación de glucosa consecuencia de la hidrólisis de almidón por la mucosa intestinal.

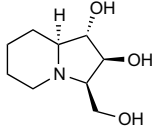
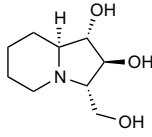
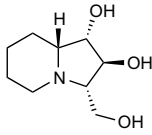
Compuesto	Estructura	Sacarasa	Lactasa	Trehalasa	Maltasa
<b>30b</b>		$62 \pm 3$	$293 \pm 19$	n.i.	n.i.
<b>30c</b>		$207 \pm 44$	n.i.	n.i.	n.i.
<b>30e</b>		$117 \pm 6$	n.i.	n.i.	n.i.
<b>31a</b>		$339 \pm 266$	n.i.	n.i.	n.i.
<b>31d</b>		$824 \pm 288$	n.i.	n.i.	n.i.
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		$4.01 \pm 0.48$	$0.75 \pm 0.07$	$2.44 \pm 0.41$	$27.50 \pm 3.55$

[a] Los experimentos se hicieron performed por triplicado para cada set de disacaridasas obtenido de una sola rata. Se usaron dos ratas diferentes ( $n = 2$ ). Las actividades se expresan como media en  $\mu M \pm$  error estándar de la (SEM); n.i. no inhibición,  $IC_{50} \geq 1$  mM. [b] Definición de actividad: 1 U corresponde a 1  $\mu mol$  de glucosa formada por hora a 37°C en tampón fosfato a pH 6.8.

### 3.2.4.2 Efecto sobre la hidrólisis de almidón

Se estudió también el efecto de estas indolizidinas y quinolizidinas sobre la actividad de endo y exoglucosidasas (tabla 3.2.4.2).

**Tabla 3.2.4.2.** IC<sub>50</sub> (μM), de las indolizidinas y quinolizidinas polihidroxiadas sintetizadas <sup>[66]</sup> frente a la enzima commercial amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*. e IC<sub>50</sub> (μM), de los productos sintetizados frente a la hidrólisis de almidón en la mucosa intestinal.

Compuesto	Estructura	Hidrólisis de Almidón <sup>[a]</sup>	Amiloglucosidasa <i>A. niger</i> <sup>[a]</sup>
<b>30a</b>		n.i.	366 ± 29
<b>30b</b>		237 ± 51	347 ± 145
<b>30d</b>		n.i.	26.9 ± 9
<b>Actividad (UI)<sup>[b]</sup></b>		20.8 ± 2.4	

[a] IC<sub>50</sub>: concentración de producto requerida para que se produzca una reducción del 50% en la glucosa liberada por hora en unidades mM. [b] Definición de actividad: 1 U corresponde a 1 μmol de glucosa liberada por hora a 37°C en tampón fosfato a pH 6.8.

#### Indolizidinas

Las indolizidinas no presentaron actividad frente a las α-amilasas (endoglucosidasas) estudiadas: α-amilasa de saliva humana y de páncreas bovino. Tampoco resultaron activos frente a estas enzimas, los compuestos de referencia (tabla 3.2.1.1). Sin embargo, si que presentaron efecto sobre la exoglucosidasa, amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*. El compuesto **30d** (IC<sub>50</sub> = 26.9 ± 9 μM) presentó actividad comparable a la de **LAB** y a la de **D-fagomina**. Los compuestos **30a** y **30b**, análogos 3-hidroximetilo

de (+)-lentiginosina (uno de los inhibidores de amiloglucosidasa de *A. Niger* más potentes y selectivos,  $k_i = 2 \mu\text{M}^{[112]}$ ), perdieron esta actividad. Esto indica que la introducción de un sustituyente hidroximetilo con configuración *R/S* en la posición C3 de la (+)-lentiginosina da lugar a una disminución de la actividad. Sin embargo este efecto se revierte parcialmente si esta sustitución (3*S*)-hidroximetilo se combina con la configuración epimérica en C8a (**30d**).

#### *Quinolizidinas*

No se observó efecto de las quinolizidinas sobre la actividad de estas enzimas.

### 3.2.5 Discusión

Una primera aproximación a los resultados muestra que los iminociclitoles estudiados en este apartado resultaron inhibidores selectivos de las disacaridasas sacarasa y maltasa, y de la digestión de almidón sobre la mucosa intestinal. Aunque los compuestos estudiados ganaron selectividad frente a estas enzimas, ninguno de ellos resultó ser más eficaz que **DAB** y **LAB**. **LAB**, el inhibidor más potente de  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz, resultó también el más eficaz frente a las enzimas sacarasa y maltasa, y frente a la hidrólisis de almidón, siendo sus valores de  $IC_{50}$  sobre estas enzimas dos órdenes de magnitud menores ( 0.3; 0.2 y 0.3  $\mu$ M y respectivamente) que los de su enantiómero natural **DAB** (tablas 3.2.1.1 y 3.2.1.2).

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas intestinales disminuyen la velocidad a la que se hidrolizan los carbohidratos enlenteciendo así el proceso digestivo, siendo estos efectos potencialmente beneficiosos para el tratamiento de pacientes con elevadas concentraciones de glucosa en sangre. Por ello se ha especulado sobre su efecto protector frente a complicaciones derivadas de la NIDDM, como problemas cardiovasculares ocasionadas por el mantenimiento del estado de hiperglicemia<sup>[113]</sup>.

Otros iminociclitoles naturales y sintéticos descritos como inhibidores potentes de las  $\alpha$ -D-glucosidasas digestivas, como la **DNJ** y su derivado *N*-sustituido, **Miglitol**, ejercen un efecto modulador de la glicemia postprandial. **Miglitol** difiere de **acarbose**, el primer fármaco inhibidor de  $\alpha$ -D-glucosidasas y  $\alpha$ -amilasas digestivas comercializado para el tratamiento de la NIDDM<sup>[99]</sup>, sustancialmente, por ser absorbido casi completamente en el intestino y presentar menos efectos gastrointestinales debidos a la llegada al intestino grueso de carbohidratos no digeridos (hinchazón, flatulecia), pero por contra, al ser absorbido prácticamente en su totalidad, podría presentar efectos sistémicos añadidos a los efectos sobre la mucosa intestinal<sup>[114]</sup>. Lo que pone de manifiesto la importancia de la selectividad en el diseño de nuevos iminociclitoles.

Estos efectos sugieren que los iminociclitoles inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas intestinales sintetizados en nuestro laboratorio podrían ejercer también un efecto *in vivo* sobre el tracto digestivo retrasando la absorción de glucosa en sangre y que podrían ser

adecuados para el tratamiento de pacientes con niveles elevados de glucosa en sangre, siendo su efecto beneficioso para tratar la hiperglicemia postprandial, previniendo muchas de las complicaciones derivadas de enfermedades como la NIDDM<sup>[99]</sup>.

Por estas razones se continuaron los estudios en esta línea de investigación, para determinar el efecto *in vivo* de **D-fagomina**, **DAB** y **LAB** sobre la glicemia postprandial, en rata. Estos resultados se describen y discuten en el siguiente apartado de este capítulo (apartado 3.3).

### 3.3 Evaluación de la actividad de los compuestos **D-fagomina**, **LAB** y **DAB**

La actividad inhibidora frente a  $\alpha$ -glucosidasas comerciales y disacaridasas intestinales, de la **D-fagomina**, el **DAB** y el **LAB**, planteó el estudio de estos productos como coadyuvantes en el tratamiento de diferentes trastornos relacionados con el metabolismo de carbohidratos, como la obesidad y la resistencia a la insulina.

En esta sección se demostrarán los efectos *in vitro* e *in vivo* de la **D-fagomina**, el **DAB** y el **LAB** sobre la digestión de sacarosa y almidón, y sus propiedades como agentes moduladores de la de la glicemia postprandrial después de su administración conjunta con sacarosa o almidón<sup>[59]</sup> sobre un modelo animal (ratas macho de la cepa Sprague-Dawley)(apartado 3.3.2).

Estos estudios se realizaron dentro de la empresa Bioglane S.L.N.E., un spin-off de tecnología del CSIC cuyo objetivo es la producción industrial y competitiva de iminoazúcares naturales como ingredientes nutricionales en los alimentos funcionales. Se trata de la primera empresa en ofrecer y promover este tipo de productos.

Parte de los experimentos requeridos en este estudio se realizaron en el grupo de Fisiología y Nutrición Experimental (FINEX) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona bajo la dirección de la Dra. Joana María Planas.

Además se investigó también el efecto de **D-fagomina** sobre la agregación y la adhesión bacteriana usando como modelo la mucosa intestinal de cerdo (*in vitro*)<sup>[59]</sup>. El estudio de agregación bacteriana fue realizado por el Dr. Carles Adelantado y la Dr. María Ángeles Calvo-Torras de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Barcelona.

Finalmente, se realizó un estudio preliminar dirigido a de determinar los efectos de este producto a largo plazo en una dieta combinada rica en grasa y sacarosa.

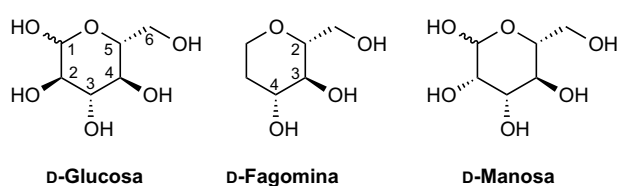
La metodología seguida para el desarrollo de estos experimentos se detalla en el apartado 5.4 del capítulo 5 (Sección experimental) de esta memoria de tesis.



### 3.3.1 Efecto de la D-fagomina

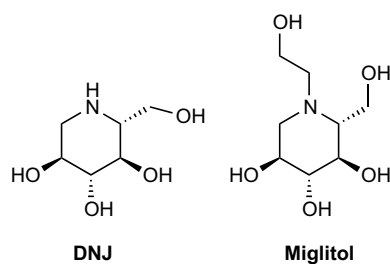
D-fagomina es un iminociclitol natural. Una de las fuentes vegetales de este compuesto son las semillas de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*). La harina del trigo sarraceno, el ingrediente principal para la elaboración de varios tipos de alimentos como los soba japoneses, la polenta italiana y las galletas de Bretaña. Esto pone de manifiesto la presencia de la D-fagomina en la dieta humana<sup>[60]</sup>.

Esta molécula presenta la configuración molecular en los carbonos C3 C4 y C5 de los monosacáridos D-glucosa y D-manosa (Figura 3.3.1.1)



**Figura 3.3.1.1** Estructuras de la D-glucosa, la D-fagomina y la D-manosa

La misma configuración en los carbonos C1, C2 y C3, la presentan el compuesto natural **DNJ**, muy abundante en las hojas de *Morus alba*<sup>[62]</sup> y su derivado N-sustituido, **Miglitol** (Figura 3.3.1.2).



**Figura 3.3.1.2.** Estructuras de la D-glucosa, la D-fagomina y la D-manosa

La diferencia principal entre estos compuestos y la **acarbose** reside en su estructura (Figura 3.3.1.1.1), que les confiere propiedades biológicas muy diferentes. La acarbose es un tetrasacárido no absorbible, no un iminociclitol, que además de  $\alpha$ -glucosidasas inhibe  $\alpha$ -amilasas. Los iminociclitoles son absorbidos en el intestino dependiendo de su

polaridad: en pequeño porcentaje, como es el caso de **D-fagomina** y **DNJ**; o en gran porcentaje, como es el caso del **Miglitol** <sup>[115]</sup>.

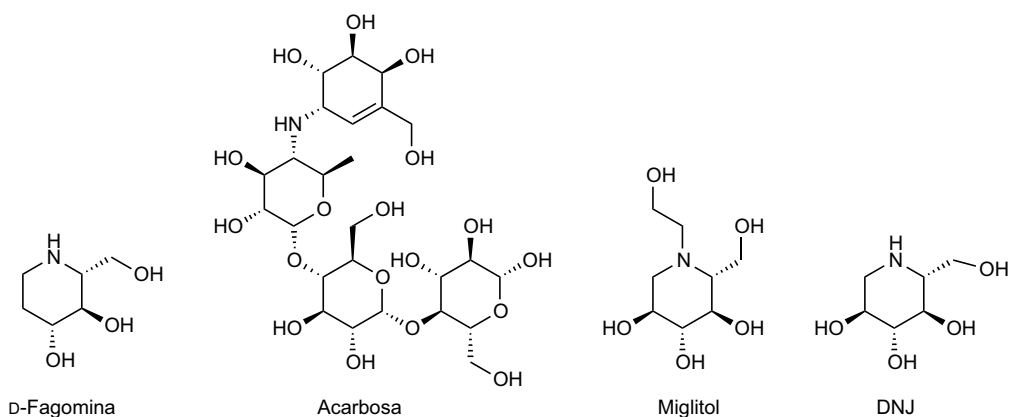
**D-fagomina** y **DNJ** son moléculas estables química y metabólicamente. Son inhibidores de disacaridasas intestinales (sacarasa y maltasa) y otras exo- y endoglicosidasas. Este efecto tiene el potencial de reducir y retrasar la respuesta hiperglicémica a la sacarosa y al almidón orales. Esta propiedad tiene relevancia desde el punto de vista nutricional ya que la hiperglicemia persistente debida al abuso de carbohidratos en la dieta puede dar lugar a resistencia a la insulina, glucosa basal aumentada, sobrepeso, aumento de la dislipemia e hipertensión, todos ellos relacionados con el síndrome metabólico. La resistencia a la insulina puede desembocar en NIDDM aumentando el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. La obesidad y la NIDDM están consideradas pandemias modernas, siendo la situación especialmente alarmante en niños y adolescentes.

Por otra parte, como los iminociclitoles son miméticos de azúcares, pueden inhibir la adhesión al epitelio mediada por proteínas de unión a carbohidratos en las bacterias. Esto es relevante porque la microbiota intestinal ejerce un papel importante en la regulación, balance y almacenaje energético en mamíferos.

Por estas razones en la búsqueda de nuevas herramientas nutricionales para reducir el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina y sobrepeso, la **D-fagomina**, al ser un inhibidor moderado de  $\alpha$ -glucosidasa, puede ser candidato a alimento o ingrediente funcional para ser introducido en la dieta como preventivo para el desarrollo de las alteraciones relacionadas con la obesidad, y la NIDDM. Con este fin, se ha realizado un estudio de la capacidad de este producto para modular la concentración de glucosa postprandial y la adhesión bacteriana al intestino.

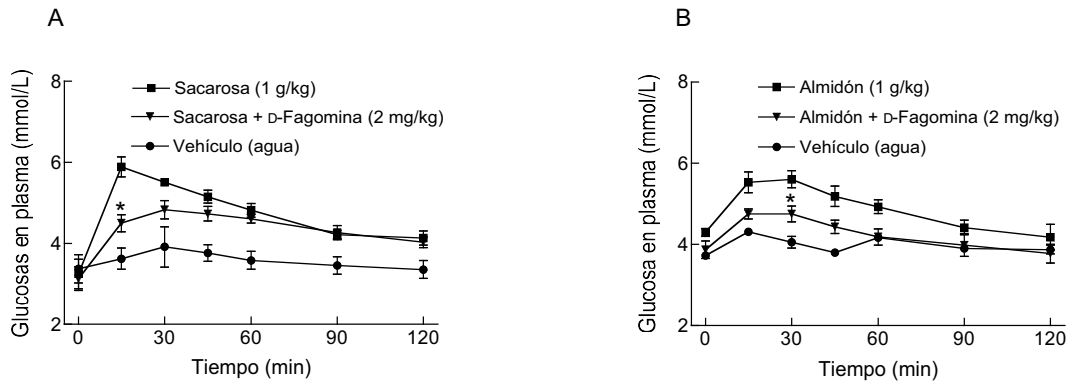
### 3.3.1.1 Efecto de *D*-fagomina sobre la glucemia postprandial

Se estudiaron los efectos *in vivo* de los compuestos **D-fagomina**, **acarbose**, **miglitol** y **DNJ**, (figura 3.3.1.1.1) activos frente a la  $\alpha$ -glucosidasa intestinal (sacarasa), sobre la glicemia postprandial. Para ello se realizaron diferentes pruebas de tolerancia oral a la sacarosa, al almidón y a la glucosa, en presencia de estos compuestos. La metodología experimental se detalla en el capítulo 5 (sección experimental, apartado 5.4)



**Figura 3.3.1.1.1** Estructura de los compuestos estudiados

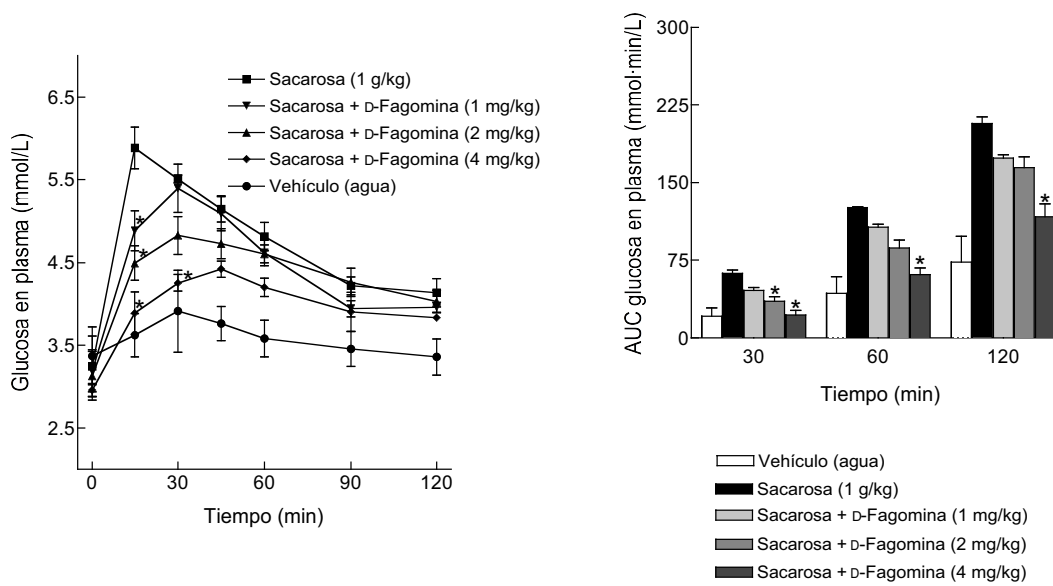
Estos experimentos mostraron que la **D-fagomina** disminuye la concentración de glucosa en sangre después de la ingesta de sacarosa o de almidón (figura 3.3.1.1.2) de una manera dosis dependiente (Figura 3.3.1.1.3) sin aumentar la secreción de insulina (figura 3.3.1.1.5).



**Figura 3.3.1.1.2** Efecto de la **D-fagomina** (2 mg/kg pes corporal) en la respuesta glicémica de ratas *Sprague-Dawley* después de la ingesta de (1 g/kg pes corporal) de: A sacarosa; B almidón. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

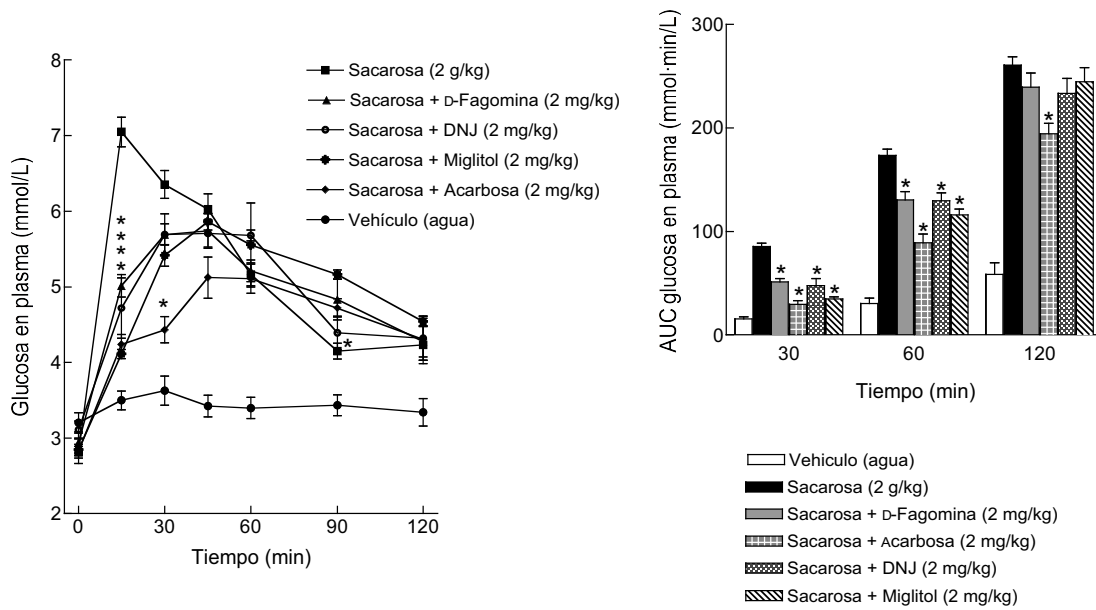
**D-Fagomina** disminuye la concentración de glucosa en sangre después de la ingesta de sacarosa en función de la dosis administrada (Figura 3.3.1.1.3). A dosis de 1-2 mg/kg de peso corporal la **D-fagomina** reduce el área bajo la curva (AUC, Area Under the Curve) un 20% y a la dosis de 4 mg/kg de peso corporal la AUC se reduce un 40%. No se observan diferencias significativas entre las dosis de 1-2 mg en las AUC. La concentración máxima de glucosa desciende de 5.8 mM (control) a 5.4 mM (dosis 1 mg/kg de peso corporal), 4.8 mM (dosis de 2 mg/kg de peso corporal) y 4.4 mM (dosis de 4 mg/kg de peso corporal).

**D-Fagomina** no sólo se produce una disminución de la concentración de glucosa en sangre sino también se produce un retraso en la aparición de este máximo. Los tiempos de máxima concentración (pico de glucosa,  $T_{max}$ ) se desplazan en función de la dosis, mientras que en el grupo control la  $T_{max}$  se produce a los 15 minutos, en el grupo que recibió la dosis más alta (4 mg/kg de peso corporal) la  $T_{max}$  se desplazó a los 45 minutos y a las dosis de 1 y 2 mg/kg de peso corporal este máximo aparece en ambos casos a los 15 minutos (Figura 3.3.1.1.3).



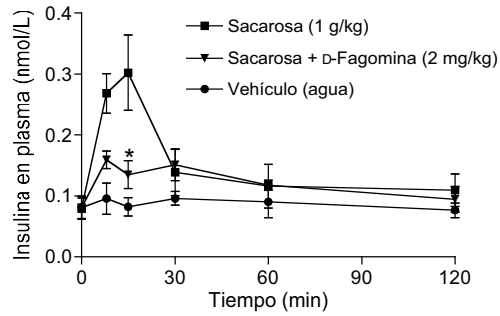
**Figura 3.3.1.1.3.** Efecto de diferentes dosis de **D-fagomina** (2 mg/kg peso corporal) de ratas Sprague-Dawley después de la ingesta (1 g/kg peso corporal) de sacarosa. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

A diferencia de lo observado en los experimentos *in vitro* sobre muestras de intestino, el efecto de **D-fagomina**, **acarbosea**, **miglitol** y **DNJ** *in vivo* sobre la glucemia postprandial en ratas sanas fue del mismo orden de magnitud, siendo la **acarbosea**, la más eficaz (Figura 3.3.1.1.4).



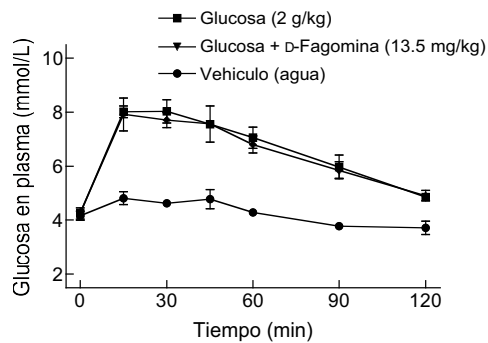
**Figura 3.3.1.1.4. Efecto de diferentes dosis de la D-fagomina, y los compuestos de referencia (2 mg/kg peso corporal) de ratas Sprague-Dawley después de la ingesta 2 g/kg pes corporal) de sacarosa. \*, significativamente diferente del control, P < 0.05**

La **D-fagomina** disminuye la concentración de glucosa en sangre después de la ingesta sin estimular la secreción de insulina (Figura 3.3.1.1.5). La concentración de insulina en sangre en el estado postprandial decrece en concordancia con el decrecimiento de la concentración de glucosa en sangre durante este estado, sugiriendo que esta molécula no estimula la secreción de esta hormona, y que la disminución de su concentración en sangre se debe a un efecto indirecto, consecuencia de la disminución de la concentración de glucosa en sangre



**Figura 3.3.1.1.5.** Efecto de la **D-fagomina** (2 mg/kg peso corporal) en la respuesta insulínica de ratas Sprague-Dawley después de la ingesta (1 g/kg peso corporal) de sacarosa. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

Para determinar si los efectos de la **D-fagomina** eran en parte debidos al bloqueo del transporte de glucosa en los enterocitos, se realizó otro estudio de tolerancia administrando glucosa en lugar de sacarosa, en este caso no se observó ningún efecto sobre la concentración de glucosa postprandial (Figura 3.3.1.1.6). Por tanto, parece que a las dosis administradas y en las condiciones estudiadas, la **D-fagomina** no afecta al transporte de glucosa a través del intestino.



**Figura 3.3.1.1.6.** Efecto de la **D-fagomina** (13.5 mg/kg peso corporal) sobre la glucemia postprandial en ratas Sprague-Dawley después de la ingesta (2 g/kg peso corporal) de glucosa. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

Para completar este trabajo, dentro de la empresa Bioglane S.L.N.E., se realizaron estudios para determinar la biodisponibilidad de este producto. Los resultados, que

son preliminares, parecen indican que, del mismo modo en que sucede para otros iminoazúcares, como la **DNJ**<sup>[33]</sup>, la **D-fagomina** es absorbida en el intestino en pequeño porcentaje y excretada rápidamente e intacta en orina.

Por otro lado, para determinar si existen en los efectos sobre la glicemia postprandrial entre **D-fagomina** obtenida de diferentes fuentes, se realizaron nuevas pruebas administrando las mismas dosis de **D-fagomina** sintética y **D-fagomina** extraída de trigo sarraceno, obteniéndose resultados idénticos en ambos casos.



### **3.3.1.2 Efecto de la D-fagomina sobre la actividad de las disacaridasas intestinales sobre dos tipos de muestras, homogeneizado de tejido y sacos evertidos, comparado con el de los productos Acarbosa, Miglitol y DNJ**

Los resultados obtenidos *in vivo* sobre la capacidad de modular la glicemia postprandial, en los que **D-fagomina** ejerció un efecto similar al de los compuestos **DNJ** y **miglitol**, no se correspondían con los obtenidos en estudios previos *in vitro*. En los que **D-fagomina** había sido descrita como inhibidor moderado de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*, mientras que **DNJ** era uno de los inhibidores más potentes. Para contrastar esta aparente contradicción, se empleó otro modelo experimental *in vitro* que se aproximase más a las condiciones *in vivo*: los segmentos intestinales evertidos. Este método no se usa normalmente debido a su complejidad experimental.

Con el fin de comparar el efecto de la **D-fagomina** sobre la actividad de la sacarasa intestinal *in vitro* con el de los productos comerciales **Acarbosa**, **Miglitol** y **DNJ**<sup>[59]</sup> (figura 3.3.1.1), se realizaron nuevos ensayos, determinándose los valores de IC<sub>50</sub> (tabla 3.3.1.2.1) para cada uno de estos productos sobre dos modelos experimentales de mucosa intestinal diferentes: homogeneizados de mucosa intestinal y sacos intestinales evertidos de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (procedimiento detallado en el apartado 5.4.). Los resultados de los dos ensayos *in vitro* fueron significativamente diferentes. Sólo **D-fagomina** dio resultados similares en ambos ensayos ( $P > 0.05$ ). Sobre el tejido homogeneizado de mucosa, **D-fagomina** resultó ser menos potente que el resto de compuestos con una diferencia de dos o tres órdenes de magnitud (tabla 3.3.1.2.1). Sin embargo, cuando se repitió el ensayo sobre segmentos intestinales evertidos las potencias de **D-fagomina** y **acarbosa** fueron similares y las diferencias en comparación con los otros compuestos fueron menores que en el ensayo sobre homogeneizados de tejido (tabla 3.3.1.2.1).

**D-Fagomina** fue menos eficaz reduciendo la actividad de las sacarasa intestinal que el resto de compuestos en ambos ensayos.

**Tabla 3.3.1.2.1.** Actividad *in vitro* de los diferentes compuestos frente a sacarasa intestinal.

Compuesto	Homogeneizado de tejido	Sacos evertidos
	IC <sub>50</sub> ± SEM (μmol/L)	IC <sub>50</sub> ± SEM (μmol/L)
<b>D-Fagomina</b>	42.0 ± 5.9	59.0 ± 8.1
<b>Acarbosa</b>	1.10 ± 0.13*	53.0 ± 8.9
<b>Miglitol</b>	0.150 ± 0.017*	5.20 ± 0.80*
<b>DNJ</b>	0.027 ± 0.003*	0.77 ± 0.10*

Valores de IC<sub>50</sub> de los diferentes compuestos. Los resultados se expresan en forma de promedio y valor de error estándar del promedio. Los valores de los promedios se compararon con el de **D-fagomina** en cada uno de los ensayos, las diferencias significativas se indican con \* (P < 0.001)

Estudios previos habían demostrado que no se observaban diferencias en la determinación de la actividad de las sacarasas entre los dos métodos. En nuestro trabajo, aunque **D-fagomina** presentó valores similares en ambos ensayos, el resto de compuestos presentaron diferencias de más de un orden de magnitud. En este caso la actividad de los inhibidores sobre los sacos intestinales fue menor que sobre el homogeneizado de mucosa.

### **3.3.1.2 Efecto de la D-fagomina sobre la agregación bacteriana y la adhesión al epitelio intestinal**

La **D-fagomina** ejerce un efecto aglutinante y antiadhesivo sobre bacterias fimbriadas (*E. coli*, *S. enterica serovar Tiphymurium*), sin afectar a la viabilidad celular y a otros tipos de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. A la dosis de 2000 mg/L, esta molécula permanece inactiva como antibiótico y a la concentración de 200-20 mg/L aglutina el 60-70% de *E.coli* y *S. entérica*. Además previene la adhesión de estas bacterias a la mucosa intestinal de cerdo a las dosis de 10-20 mg/L. A estas dosis no se observan efectos sobre la adhesión de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*<sup>[59]</sup>.

### 3.3.1.4 Efecto de la D-fagomina a largo plazo en una dieta combinada rica en grasas y carbohidratos

Una vez comprobado el efecto de la D-fagomina sobre la glicemia postprandial tras la administración de una sobrecarga de sacarosa y almidón, se realizó una prueba piloto para determinar también su efecto a largo plazo en ratas de la misma cepa, machos Sprague-Dawley (n=5), alimentados con una dieta rica en grasas y carbohidratos durante 5 semanas (tabla 3.3.1.4.1). Al inicio y al final del experimentos se determinaron los incrementos de peso corporal, los valores basales de glucosa, insulina y glucagón en sangre, y la presión sistólica y diastólica. También se conservaron muestras de heces para la caracterización de la microbiota intestinal de cada grupo.

**Tabla 3.3.1.4.1** Composición de las dietas experimentales

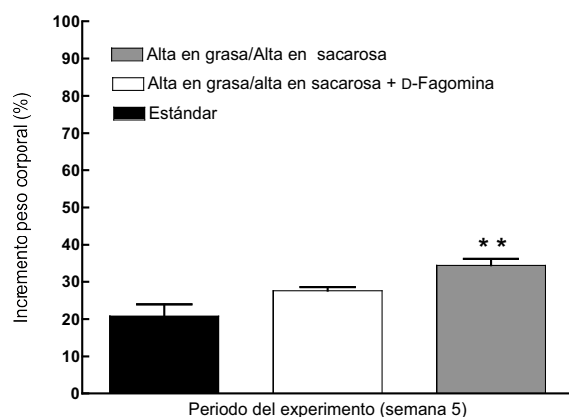
	Estándar	Alta en grasa/Alta en sacarosa	Alta en grasa/Alta en sacarosa con D-fagomina
<b>Ingredientes (g)</b>			
Polvo	1000.00 <sup>a</sup>	1000.00 <sup>b</sup>	1000.00 <sup>b</sup>
Antioxidante TBHQ	-	0.04	0.04
Gelatina porcina tipo A 240/260	25.00	25.00	25.00
Lecitina de soja	4.00	25.00	25.00
D-Fagomina	-	-	0.68
<b>Composición (g/Kg)</b>			
Proteínas	139.00	185.60	185.60
L-cistina	2.920	2.86	2.86
Carbohidratos disponibles	466.56	434.93	434.93
<i>Sacarosa</i>	<i>n.s.</i>	<i>323.68</i>	<i>323.68</i>
<i>Almidón de maíz</i>	<i>n.s.</i>	<i>54.13</i>	<i>54.13</i>
<i>Maltodextrina</i>	<i>n.s.</i>	<i>57.12</i>	<i>57.12</i>
Fibra cruda	214.81	47.60 <sup>c</sup>	47.60 <sup>c</sup>
Grasa de leche anhidra	-	199.92	199.92
Aceite de soja	38.88	19.04	19.04
Minerales	45.70	40.94	40.94
Vitaminas	11.80	18.09 <sup>d</sup>	18.09 <sup>d</sup>
Cenizas	45.70	-	-
Bitartrato de colina	1.00	2.86	2.86
<b>Macronutrientes</b>			
Proteínas (% en peso)	16.30	20.90	20.90

Carbohidratos (% en peso)	46.70	43.50	43.50
Grasa (% en peso)	4.30	24.30	24.30
Energía de las proteínas (%)	22.50	17.60	17.60
Energía de los carbohidratos (%)	64.30	36.50	36.50
Energía de las grasas (%)	13.30	45.90	45.90
Densidad energética total (Kcal/g) <sup>e</sup>	2.90	4.70	4.70

<sup>a</sup> Polvo estándar (Teklad Global 2014); <sup>b</sup> Polvo alta en grasa/alto en sacarosa (TD 08811)<sup>c</sup>; de celulosa<sup>d</sup>; de AIN-93-VX (94047)<sup>e</sup>; la densidad energética se estimó en base a los factores de Atwater factores, asignando 4 kcal/g a las proteínas, 9 kcal/g a las grasas, y 4 kcal/g a los carbohidratos disponibles; n.s. no especificado

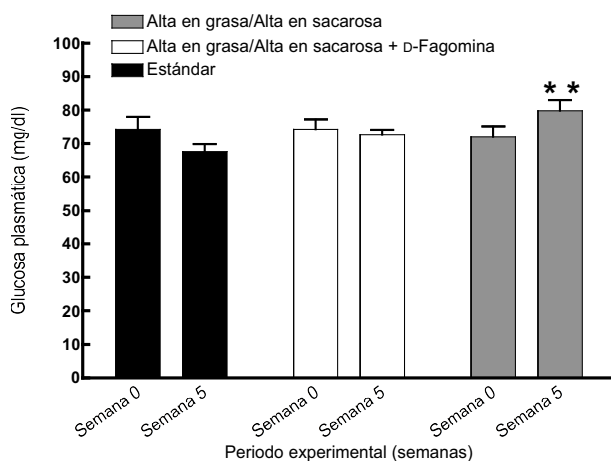
La cantidad de **D-fagomina** incorporada a la dieta fue el 0.2% respecto a la cantidad de sacarosa del alimento, de acuerdo con los resultados que obtuvimos en la determinación de su efecto postprandial (apartado 3.3.3.2)<sup>[33]</sup>.

Durante el estudio se monitorizaron la ingesta y el peso corporal. Las ratas que recibieron las dietas de alta densidad energética (dieta alta en grasa/alta en sacarosa y dieta alta en grasa/alta en sacarosa + **D-fagomina**) consumieron significativamente menos cantidad de alimento que el grupo control (dieta estándar) mientras que la energía consumida fue similar para todos los grupos (sin diferencias significativas,  $P > 0.05$ ). El incremento de peso fue significativamente diferente en el grupo que recibió la dieta de elevada densidad energética no suplementada ( $P < 0.01$ ). Los animales del grupo control incrementaron su peso un 20 %, los que recibieron la dieta alta en grasa y alta en sacarosa incrementaron su peso un 34 %, y los que recibieron la dieta alta en grasa y sacarosa suplementada con **D-fagomina** incrementaron su peso un 27% (figura 3.3.1.4.1). La suplementación con **D-fagomina** ejerció, por tanto, un efecto sobre el incremento de peso corporal de los animales que recibieron la dieta rica en grasa y sacarosa, aproximando sus valores a los valores del grupo que recibió la dieta estándar.



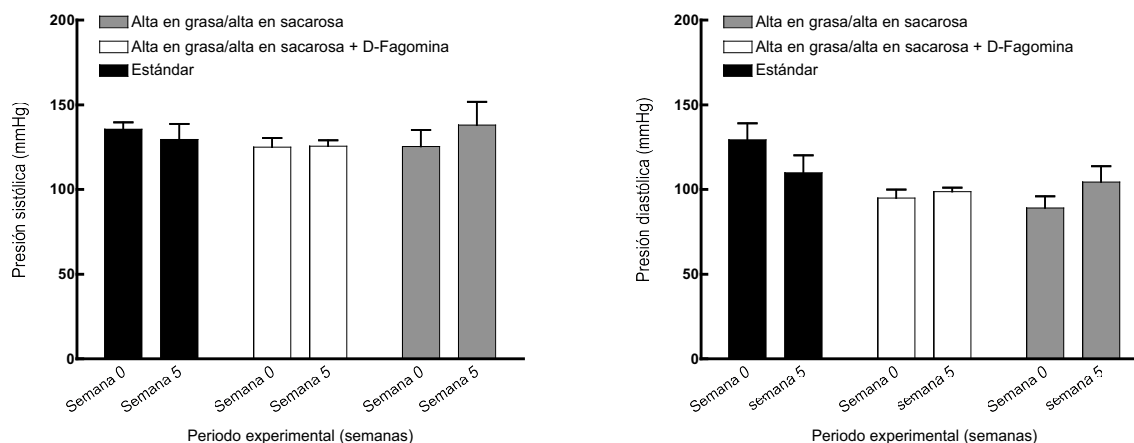
**Figura 3.3.1.4.1.** Efecto de la **D-fagomina** (2 mg/kg g de sacarosa de la dieta) en el incremento del peso corporal en ratas Sprague-Dawley después de 5 semanas (incrementos calculados respecto al peso corporal en el tiempo 0). \*\*, significativamente diferente del control,  $P < 0.01$

Tras el sacrificio de los animales se determinaron los pesos relativos de los hígados y de la grasa abdominal. Las ratas alimentadas con la dieta rica en grasa y sacarosa, suplementadas con **D-fagomina** presentaron hígados de menor tamaño y menor cantidad de grasa abdominal que las no suplementadas con este compuesto, pero superiores a las alimentadas con pienso estándar (no se muestran los datos)



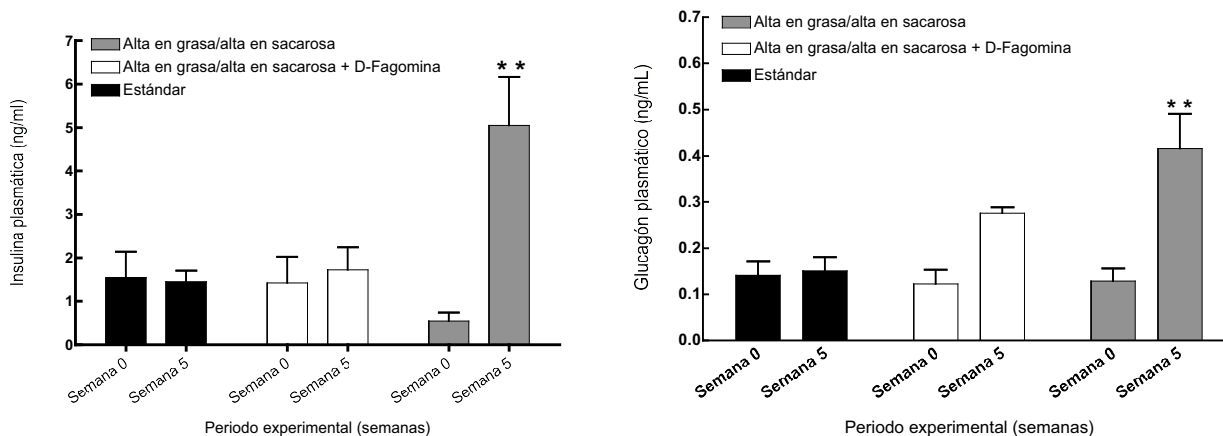
**Figura 3.3.1.4.4.** Efecto de la **D-fagomina** sobre concentración de glucosa plasmática basal en ratas Sprague-Dawley a las 5 semanas de alimentación con los diferentes tipos de dieta. \*\*, significativamente diferente del control,  $P < 0.01$

A las 5 semanas de tratamiento, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los valores de presión sistólica y diastólica entre los grupos (figura 3.3.1.4.3). Sin embargo los animales del grupo que recibió la dieta alta en grasa/alta en sacarosa presentan valores de presión sistólica y diastólica más bajos que el resto de grupos.



**Figura 3.3.1.4.3.** Efecto de la D-fagomina sobre la presión arterial (sistólica y diastólica) en ratas Sprague-Dawley a las 5 semanas de alimentación. Los valores de presión de los grupos que recibieron la dieta alta en grasa/alta en sacarosa no son significativamente diferentes del grupo control,  $P > 0.05$

Los valores de insulina y glucagón basales a las 5 semanas sitúan al grupo **D-fagomina** en una franja intermedia entre los valores del grupo estándar y del grupo alta en grasa y alta en sacarosa (Figura 3.3.1.4.4). A pesar de que no haya diferencias significativas entre los grupos, probablemente porque los errores de las medidas son grandes y el tamaño de muestra ( $n=5$ ) es reducido, sí que se observa una tendencia del grupo suplementado con **D-fagomina** a mantener sus parámetros en valores intermedios entre los otros dos grupos.



**Figura 3.3.1.4.4.** Efecto de la **D-fagomina** sobre concentración de insulina y glucagón plasmáticos basales en ratas Sprague-Dawley a las 5 semanas de alimentación. \*\*, significativamente diferente del control,  $P < 0.01$

### 3.3.2 Evaluación de la actividad de DAB y LAB sobre la digestión de sacarosa y almidón *in vitro* e *in vivo*

Como se describe en los apartados 3.1.1 y 3.2.1, los compuestos **DAB** y **LAB** ejercen un potente efecto inhibitor tanto de  $\alpha$ -glucosidasas comerciales como de enzimas de la mucosa intestinal encargadas de la digestión de carbohidratos (sacarasa, maltasa). Por esta razón se continuaron los estudios del efecto de estos productos sobre la digestión de carbohidratos y como moduladores de la glicemia postprandial. Los productos **DAB** y **LAB** disminuyen la actividad de las disacaridasas intestinales sacarasa y maltasa y la hidrólisis de almidón en muestras de mucosa intestinal de rata. Al comparar los valores de  $IC_{50}$  de estos productos con los de la **D-fagomina** (figura 3.3.1.1) observamos que el compuesto **DAB** presenta un valor de  $IC_{50}$  aproximadamente la mitad del de la **D-fagomina** (tabla 3.3.1) mientras que el del **LAB** es dos ordenes de magnitud menor.

**Tabla 3.3.2.1.** Actividad inhibitoria de **DAB** y **LAB** sobre la hidrólisis de sacarosa, maltosa y almidón en la mucosa intestinal

Compuesto	Sacarasa	Maltasa	Hidrólisis de almidón
<b>DAB</b>	22 ± 12	50 ± 36	15.4 ± 2.1
<b>LAB</b>	0.29 ± 0.02	0.2 ± 0.1	0.34 ± 0.03

Valores de IC<sub>50</sub> de los diferentes compuestos frente a sacarasa maltasa y digestión de almidón en la mucosa intestinal expresados en promedio y SEM en unidades μM.

Estos valores sugieren que estos compuestos podrían ejercer también efecto modulador de la glicemia postprandrial al administrarse conjuntamente con sacarosa o almidón. Po resta razón se continuaron los experimentos sobre modelos animales in vivo tal y como se procedió con el producto **D-fagomina**.

### **3.3.2.1 Efecto de los productos DAB y de LAB sobre la glicemia postprandial**

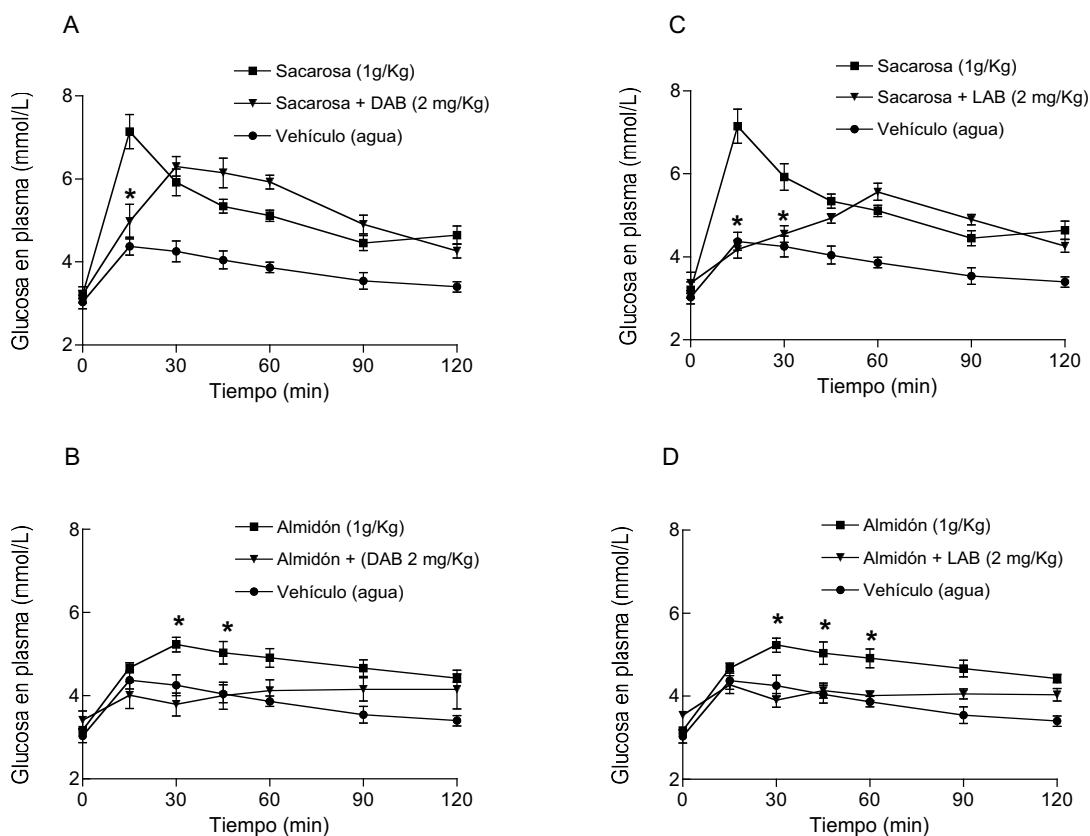
Se realizaron nuevos experimentos de tolerancia a la sacarosa y al almidón para determinar también los efectos de los compuestos **DAB** y **LAB** sobre la glicemia y las concentraciones de insulina en el estado postprandial en ratas de la cepa Sprague-Dawley. Se estudió también el efecto de diferentes dosis de estos compuestos. Y finalmente, mediante un test de tolerancia a la glucosa en presencia de estos compuestos se determinó su efecto sobre los transportadores de glucosa.

**DAB** y **LAB** ejercen un efecto reductor de la concentración de glucosa en sangre después de su administración conjunta tanto con sacaros como con almidón a la dosis de 2 mg/ kg de peso corporal (figura 3.3.2.1.1).

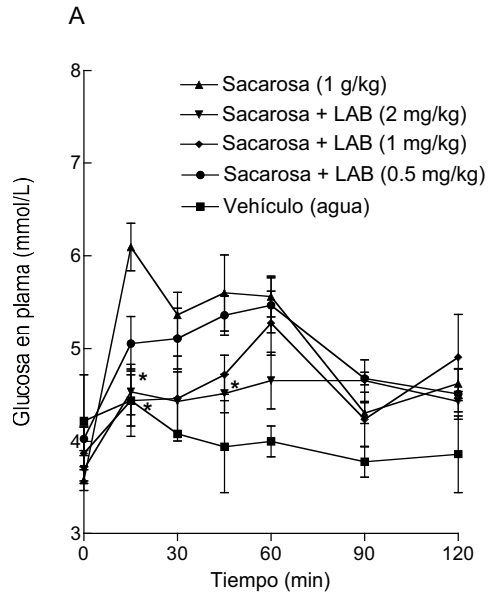
Ambos compuestos reducen y retrasan significativamente ( $P < 0.05$ ) el pico de glucosa postprandial: el compuesto **DAB** cuando se administra junto con sacarosa desplaza el



tmax de glucosa en sangre 15 minutos (figura 3.3.2.1.1 A) mientras que el compuesto **LAB** lo retrasa 45 minutos (figura 3.3.2.1.1 C).

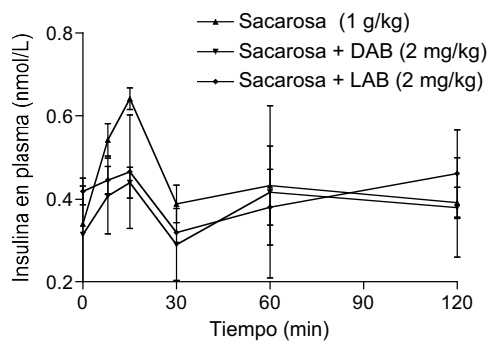


Este efecto sobre la concentración de glucosa postprandial es proporcional a la dosis de producto administrada. En el estudio se determinó la concentración de glucosa en sangre después de la administración de diferentes dosis del compuesto **LAB**, que había resultado ser el más potente (figura 3.3.2.1.2).



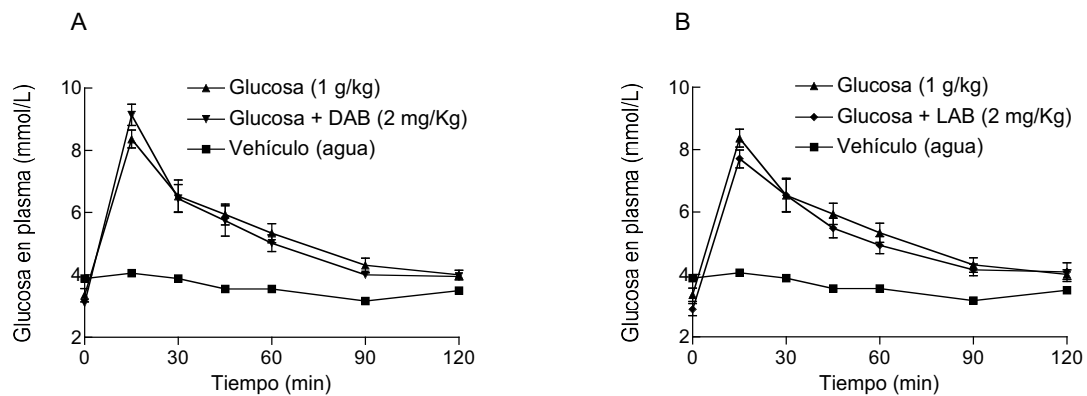
**Figura 3.3.2.1.2.** Efecto de diferentes dosis de LAB (2-1-0.5 mg/kg peso corporal) de ratas Sprague-Dawley después de la ingesta (1 g/kg peso corporal) de sacarosa. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

**DAB** y **LAB** reducen el pico de glucosa postprandial sin estimular la secreción de insulina postprandial (figura 3.3.2.1.3), de la misma manera que la **D-fagomina**. Esta reducción es un efecto indirecto y se debe a la disminución de la concentración de glucosa postprandial.



**Figura 3.3.2.1.3.** Efecto de los productos **DAB** y **LAB** (2 mg/kg peso corporal) en la respuesta insulínica de ratas Sprague-Dawley después de la ingesta (1 g/kg peso corporal) de sacarosa. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

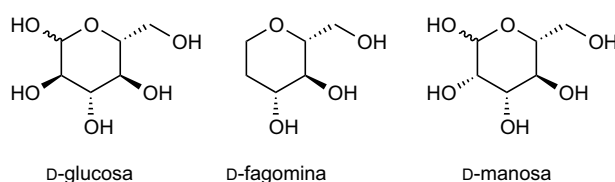
No se observaron diferencias significativas sobre las concentraciones en sangre de glucosa postprandial tras la administración de **DAB** y **LAB** en presencia de glucosa (figura 3.3.2.1.4), lo que indica que estos compuestos, administrados a estas dosis, no inhiben el transporte de glucosa en el intestino. Esto sugiere que su efecto modulador de la glicemia postprandial es debido principalmente a la inhibición de la sacarasa intestinal.



**Figura 3.3.2.1.4.** Efecto de los productos DAB y LAB (2 mg/kg peso corporal) sobre la glucemia postprandial en ratas Sprague-Dawley después de la ingesta (1 g/kg peso corporal) de glucosa. \*, significativamente diferente del control,  $P < 0.05$

### 3.3.3 Discusión

Los iminociclitolos naturales mimetizan las estructuras de los azúcares y pueden tener la capacidad de unirse a los mismos lugares que estas moléculas dentro de los sistemas biológicos. La **D-fagomina** en particular, presenta similitudes estructurales con las moléculas D-glucosa y D-manosa (figura 3.3.5.1).



**Figura 3.3.5.1.** Estructuras de la D-glucosa, la D-fagomina y la D-manosa

En este trabajo se probó la **D-fagomina** como modulador de la concentración de glucosa postprandial como un primer paso en la exploración de su posible aplicación como agente reductor del riesgo de desarrollar sobrepeso y resistencia a la insulina. Este compuesto había sido descrito anteriormente como inhibidor débil de  $\alpha$ -glucosidasa en ensayos *in vitro* sobre enzimas purificadas<sup>[54]</sup> y homogeneizados de tejidos<sup>[64]</sup>. Al estudiar su efecto sobre la sacarasa de la mucosa intestinal en homogeneizados de este tejido, se corroboró que reducía la hidrólisis de sacarosa en menor grado que la **acarbose**, el **miglitol** y la **DNJ** (tabla 3.3.1.1). Sorprendentemente *in vivo*, la **D-fagomina** presentó un efecto similar al del resto de compuestos. Al constatar estas diferencias, se realizaron nuevos estudios *in vitro* empleando otro modelo experimental más cercano a la situación *in vivo*: los sacos intestinales evertidos. Este método, más complejo experimentalmente, no se utiliza habitualmente ya que algunos autores han demostrado que los homogeneizados de mucosa intestinal y los sacos intestinales evertidos dan valores de actividad sacarasa similares<sup>[116]</sup>. Nuestro estudio demostró que mientras la **D-fagomina** continuaba siendo un inhibidor menos potente de los cuatro compuestos estudiados, las diferencias en los valores absolutos de inhibición de la enzima sacarasa intestinal por la **acarbose**, el **miglitol** y la **DNJ** entre comparando los dos ensayos experimentales fue de al menos dos órdenes de magnitud. Resultando estos menos potentes en el ensayo realizado sobre las muestras de intestino evertidas (tabla 3.3.1.1). Consecuentemente las potencias de D-

**fagomina** y **acarbosa** en este test no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) mientras que las de los compuestos **migliol** y **DNJ** resultaron ser 10 y 70 veces menores respectivamente y significativamente diferentes de los de **D-fagomina** ( $P < 0.001$ ).

Los resultados de los ensayos *in vitro* al compararse con los obtenidos *in vivo*, indican que los sacos intestinales evertidos son un modelo más próximo a las condiciones *in vivo*. Sin embargo es difícil extrapolar estos resultados a la modulación de la concentración de glucosa postprandial, puesto que en este caso la **D-fagomina**, que presenta un efecto reductor de la glicemia postprandial similar al del **migliol**. Una discriminación en base a las pruebas *in vitro* habría descartado la **D-fagomina** por ser menos activa.

La **D-fagomina** administrada oralmente no aumenta la concentración de insulina en sangre, al contrario, como disminuye los niveles de glucosa postprandial, también disminuye el pico de insulina durante este periodo (figura 3.3.1.2.2). Además no tiene efecto sobre la absorción de glucosa después de la administración conjunta con esta molécula (figura 3.3.1.2.5). Estas observaciones indican que la **D-fagomina** no estimula la liberación de insulina tras la ingesta ni afecta al transporte de glucosa a través del intestino delgado. Durante el periodo postprandial, parece que la **D-fagomina** actúa retrasando la liberación de glucosa desde los carbohidratos inhibiendo las glicosidasas de la mucosa intestinal.

Además, se estudiaron (*in vitro*) los efectos de la **D-fagomina** sobre la agregación de bacterias de la flora intestinal, viéndose que este compuesto aglutina selectivamente enterobacterias fimbriadas como *E. coli* y *S. enterica Typhimurium* que presentan este tipo de receptores inhibiendo así su adhesión a la mucosa intestinal, pero no afecta a otras especies probióticas como *Lactobacillus spp.* o *Bifidobacterium* que presentan otro tipo de adhesinas<sup>[117]</sup>. Esta actividad selectiva sugiere una nueva vía para modular la microbiota intestinal a través de la dieta ya que este compuesto promueve la adhesión de bacterias potencialmente beneficiosas y reduce la presencia de bacterias nocivas.

Por otro lado, los estudios preliminares a largo plazo, muestran que hay una reducción de la grasa visceral en animales que reciben una dieta rica en grasa y sacarosa suplementada con este compuesto. Lo mismo sucede con los valores de glucosa,

insulina y glucagón basales. A pesar de no existir diferencias significativas entre los grupos en todos los parámetros estudiados, en la mayoría se observa una tendencia del grupo suplementado con **D-fagomina** a mantener sus parámetros entre los de los grupos que recibieron la dieta rica en grasa y sacarosa y la dieta estándar, lo que sugiere un efecto beneficioso de este compuesto. Actualmente se está llevando a cabo un estudio para confirmar este efecto y determinar si es significativo.

En el marco de este proyecto de investigación, en nuestro grupo de investigación, *Ramos-Romero et al.* completaron este estudio, constatando que **D-fagomina** ejerce un efecto en la composición de la microbiota intestinal reduciendo la proporción de Enterobacterias (*E. coli*) asociadas por un lado al consumo de dietas altas en grasa y sacarosa; y por otro a la acumulación de grasa (artículo aceptado en la revista *obesity* y pendiente de publicación).

Los resultados obtenidos con **DAB** y **LAB** indican un efecto similar al de la **D-fagomina**. Ambos productos retrasan la aparición del pico de glucosa en el estado postprandial. En este caso si que existe una correlación entre las potencias de estos compuestos *in vitro* e *in vivo*. El compuesto **LAB** es el más potente *in vitro* sobre las enzimas  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz, sacarasa, maltasa y sobre la digestión de almidón. Y también es el más potente *in vivo* retrasando la  $T_{max}$  desde los 15 minutos hasta los 60 minutos.

De las investigaciones realizadas hasta el momento se deduce que son necesarios más estudios para confirmar los mecanismos de actuación de estos productos, pues los resultados *in vivo* obtenidos a partir de los test de tolerancia a la sacarosa no correlacionan bien con los obtenidos previamente en los ensayos de inhibición *in vitro*. Si bien los productos inhibidores de sacarosas intestinales ejercen efecto *in vivo* sobre la digestión de este mismo disacárido, la potencia con la que lo hacen no correlaciona en el caso de la **D-fagomina**, aunque si lo hace en el de **DAB** y **LAB**, siendo el segundo el más potente tanto en los estudios *in vitro* como en los estudios *in vivo*.

Aunque **DAB** resulte menos potente en la modulación de la glicemia postprandial, presenta un efecto añadido, del que su enantiómero carece. El compuesto **DAB**, es un potente de glicógeno fosforilasa <sup>[36f]</sup>. Se ha demostrado que **DAB** es el inhibidor más potente ( $IC_{50}$  1  $\mu$ M) tanto de la glicogenolisis basal como de la estimulada por glucagón

en hepatocitos primarios de rata<sup>[70]</sup>. En cambio su enantiómero **LAB** no ejerce efecto sobre esta enzima.

En la NIDDM, la producción de glucosa hepática se ve aumentada<sup>[118]</sup>. Una posible vía para reducir esta producción y bajar los niveles de glucosa en sangre en pacientes con esta enfermedad puede ser la inhibición de la enzima glicogeno fosforilasa hepática<sup>[119]</sup>. El compuesto **DAB**, inhibidor de un gran espectro de glicosidasas, es un potente de glicógeno fosforilasa<sup>[36f]</sup> mientras que **D-fagomina** es un inhibidor débil de esta enzima<sup>[120]</sup>. Se ha demostrado que **DAB** es el inhibidor más potente ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ) tanto de la glicogenolisis basal como de la estimulada por glucagón en hepatocitos primarios de rata<sup>[70]</sup>. En cambio su enantiómero **LAB** no ejerce efecto sobre esta enzima. Por esta razón se ha planteado un estudio para determinar el efecto de **DAB** y sus derivados, sintetizados en nuestro laboratorio<sup>[98]</sup> sobre la actividad de esta enzima. En este estudio se ha realizado en el Grupo de Enzimología Estructural del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona por la estudiante de doctorado Mireia Díaz, bajo la dirección del Dr. Joan Carles Ferrer, determinándose los efectos de los derivados de **DAB** sobre las enzimas sacarosa sintasa 4 (SuSy 4) de *Solanum tuberosum*, glucógeno sintasa de *E. Coli* y glucógeno fosforilasa.

### 3.4 Efecto de los productos inhibidores de $\alpha$ -L-rhamnosidasa sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis, esta enfermedad causa millones de muertes al año y es esencialmente grave en pacientes inmunodeprimidos. La aparición de resistencias a los fármacos de primera línea y la larga duración de los tratamientos han impulsado las investigaciones para el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos. Una de las dianas terapéuticas para la síntesis de nuevas moléculas es la síntesis de la pared celular de las micobacterias, se trata de una estructura compleja compuesta por polisacáridos y lípidos, esencial para el crecimiento y supervivencia de este microorganismo en el organismo huésped. En esta estructura, el polisacárido se une al peptidoglicano por un puente, se trata de un disacárido fosfodiéster que contiene un residuo L-rhamnosil. Este residuo no se encuentra en mamíferos. Un paso clave en la biosíntesis de la pared de micobacterium está mediado por una rhamnosiltransferasa, esta enzima tampoco se encuentra en humanos, y su inhibición constituye por tanto una posible alternativa para encontrar un tratamiento antituberculoso no tóxico<sup>[72]</sup>. Los iminociclitoles son inhibidores de enzimas relacionadas con el procesamiento de carbohidratos como glicosidasas y glicosiltransferasas, pero dentro de este campo los inhibidores de rhamnosidasas y rhamnosiltransferasas no está muy explorado. Lucas et al. sintetizaron y estudiaron una serie de iminociclitoles rhamnómiméticos inhibidores de la síntesis del linker que contiene el residuo L-rhamnosil en membranas aisladas de micobacterium<sup>[72]</sup>. Por otro lado, Shilvock et al. postularon que los rhamnómiméticos podían constituir agentes quimioterapéuticos para la inhibición de la síntesis del linker disacárido en *Mycobacterium tuberculosis* por dos vías: inhibiendo la síntesis de dTDP-rhamnosa desde dTDP-glucosa o inhibiendo la incorporación de L-rhamnosa a la pared celular micobacteriana. En sus experimentos con diferentes iminociclitoles observaron una correlación entre la inhibición de la naringinasa y la capacidad para inhibir la biosíntesis de dTDP-L-rhamnosa<sup>[77]</sup>.

En este trabajo se determinó el efecto inhibitorio, potente y específico, de algunos de los compuestos sintetizados frente a la enzima  $\alpha$ -rhamnosidasa (naringinasa) de *P. decumbens* (apartado 3.1.1). Estos experimentos sugieren que estos productos



podrían ser también inhibidores de la biosíntesis dTDP-rhamnosa, o la incorporación del residuo L-rhamnosil en la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, constituyendo nuevos potenciales agentes antituberculosos. Por esta razón se procedió al estudio de la capacidad de los derivados de iminociclitoles inhibidores de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa como agentes anti micobacterianos<sup>[19, 66]</sup>. Este estudio se realizó en colaboración con la Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE) del Institut Germans Trias i Pujol (IGTP).

Se estudiaron los compuestos que resultaron inhibidores de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (capítulo 3 apartado 3.1.4) del tipo indolizidinas y quinolizidina<sup>[66]</sup> y derivados de **LAB** conjugados con aminas aromáticas (capítulo 3 apartado 3.1.2)<sup>[19]</sup>.

Los ensayos de determinación del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* se realizaron siguiendo el método colorimétrico REMA (Resazurin Microtiter Assay)<sup>[121]</sup>, descrito detalladamente en el capítulo 5 (apartado 5.4). En este estudio se utilizó el producto estándar isoniazida (MIC: 0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) como control positivo de inhibición<sup>[121]</sup>.

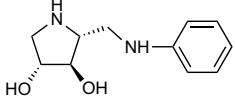
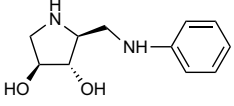
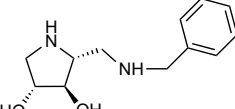
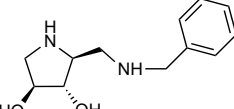
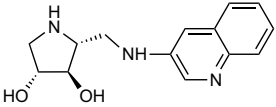
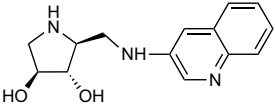
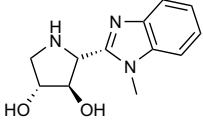
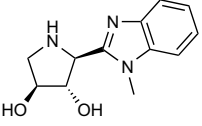
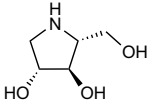
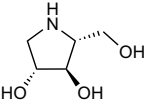
#### **3.4.1 Efecto de nuevos iminociclitoles del tipo indolizidinas y quinolizidinas**

Los derivados de indolizidinas y quinolizidinas que resultaron ser buenos inhibidores de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*<sup>[66]</sup> en los estudios *in vitro* (apartado 3.1.4) **30a**, **30d**, **31d**, y **31f**, no inhibieron el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* a las concentraciones estudiadas (3 mg/ml para las indolizidinas y 0.75 mg/ml para las quinolizidinas).

#### **3.4.2 Propiedades inhibitorias de derivados de DAB Y LAB conjugados con aminas aromáticas**

Los compuestos inhibidores  $\alpha$ -L-rhamnosidasa estudiados en este trabajo fueron probados en sistemas micobacterianos y se determinaron los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada uno de ellos (tabla 3.4.2). Las fotografías de las placas de cultivo empleadas para estas determinaciones forman parte del material adicional y pueden consultarse en el CD adjunto.

**Tabla 3.4.2.** Actividad de los iminociclitoles sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa de laboratorio *Pasteur* H37Rv)

Compuesto	estructura	MIC	Compuesto	estructura	MIC
<b>6a</b>		2.5	<b>7a</b>		2.5
<b>6b</b>		1.3	<b>7b</b>		0.31
<b>6c</b>		1.3	<b>7c</b>		2.5
<b>6d</b>		0.63	<b>7d</b>		0.63
<b>DAB</b>		2.5	<b>LAB</b>		2.5

Concentración Mínima Inhibitoria ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Todos los compuestos probados inhibieron el crecimiento de *M. Tuberculosis* a alta concentración.

Los compuestos **6d**, **7b** y **7d** presentan unas MIC ligeramente más bajas, siendo el efecto del resto de compuestos similar a los de **DAB** y **LAB**. Esto puede indicar que los productos no actúan sobre la diana esperada.

### 3.4.3 Discusión

La pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, contiene un disacárido que hace de puente de unión entre las regiones del polisacárido arabinogalactano y del péptidoglicano. Este disacárido contiene un grupo L-rhamnopiranosil<sup>[72, 122]</sup>. Este residuo, no se encuentra en mamíferos, por tanto, tanto los inhibidores de su biosíntesis (inhibidores de la biosíntesis de timidina difosfato-(dTDP)-rhamnosa desde dTDP-glucosa) como los inhibidores de la incorporación de L-rhamnosa a la pared celular micobacteriana podían tener potencial como nuevos agentes quimioterapéuticos no tóxicos para el tratamiento de las infecciones causadas por *mycobacterium*. Algunos autores demostraron que iminociclitoles rhamnómiméticos activos frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasas de *P. Decumbens* eran capaces de inhibir también la biosíntesis de dTDP-L-rhamnosa en membranas aisladas de *M. tuberculosis*<sup>[72, 77]</sup>.

En nuestro caso, los iminociclitoles que resultaron ser inhibidores potentes y selectivos de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. Decumbens* no ejercieron efecto sobre el crecimiento de *M. Tuberculosis*, o lo hicieron a alta concentración, siendo los valores de MIC tres órdenes de magnitud superiores los del antibiótico isoniazida (0.25  $\mu$ g/ml). Basándonos en las determinaciones realizadas no podemos dar una explicación de esta no correlación entre la inhibición de las enzimas rhamnosidasa y rhamnosiltransferasa, se necesitan otros estudios. Estas diferencias podrían deberse a que los iminociclitoles estudiados no alcanzan la diana esperada o actúan en otro centro activo de esta o de otras enzimas relacionadas con el crecimiento de *M. tuberculosis*. Además hay que tener en cuenta que existen grandes diferencias estructurales y en los mecanismos catalíticos de estas dos enzimas. Las estructuras que se forman en el estado de transición durante la catálisis de las glicosiltransferasas, no están tan bien definidas como en el caso de las glicosidasas, aunque parece que también poseen carácter de ión oxocarbonio<sup>[8]</sup> y que se pueden aplicar muchos de los principios explicados para los inhibidores de glicosidasas, sin embargo, son enzimas que catalizan reacciones bisustrato (dador y aceptor), y su mecanismo presenta ciertas diferencias con el de las glicosidasas: presentan especificidad de unión para el aceptor, pero también requieren especificidad de unión para el dador. La especificidad del dador proviene por tanto de la base y del grupo fosfato. Por esta razón muchos inhibidores de glicosidasas que

mimetizan únicamente a la región del sacárido no ejercen efecto de inhibición sobre las glicosiltransferasas<sup>[2]</sup>.



## 4. CONCLUSIONES

---



#### 4.1 Actividad frente a glicosidasas comerciales

4.1.1 Las propiedades inhibitorias de los nuevos derivados de **DAB** y **LAB** (**6a-m**, **7a-e**, **8a-f**, **9a-f**, **10**, **11** y **12**) frente a glicosidasas difieren notablemente de las de **DAB** y **LAB**.

Los derivados conjugados con aminas aromáticas (**7a-d**) resultaron activos frente a la enzima  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *Penicilium decumbens*, siendo el compuesto **7a** el más potente ( $k_i = 38 \pm 12$ ) con una eficacia *in vitro*, mayor que la de **LAB** ( $k_i = 98 \pm 5 \mu\text{M}$ ).

Los derivados conjugados con aminoalcoholes, aminoácidos y del tipo oxopiperazina resultaron inhibidores selectivos de  $\alpha$ -D-glucosidasas. Particularmente los compuestos **6j** y **12** fueron selectivos frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de *S. cerevisiae*, presentando unas constantes de inhibición de  $2 \pm 1$  y  $17 \pm 8$  respectivamente.

4.1.2 Los nuevos iminociclitoles del tipo pirrolizidina (**18-29**) fueron selectivos frente a  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz y  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*, aunque su potencia frente a estas enzimas fue menor que la de **LAB**. El compuesto **18** fue el más potente y selectivo frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens* ( $k_i = 21 \pm 1 \mu\text{M}$ ).

4.1.3 Las indolizidinas **30a-c** y **30e** y las quinolizidinas **31e** y **31f** fueron activas frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*, siendo **30a** la más potente ( $k_i = 3 \pm 1 \mu\text{M}$ ).

#### 4.2 Propiedades inhibitorias de los nuevos iminociclitoles frente a disacaridasas intestinales

4.2.1 Las propiedades de los derivados de **DAB** y **LAB** (**6a-m**, **7a-e**, **8a-f**, **9a-f**, **10**, **11** y **12**) difieren considerablemente de las de **DAB** y **LAB**. Los nuevos son derivados selectivos para las enzimas sacarasa y maltasa, particularmente el



compuesto **9c** ( $IC_{50\text{sacarasa}} = 19 \pm 11 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50\text{MALTASA}} = 56 \pm 2 \mu\text{M}$ ) presenta una potencia de inhibición frente a estas enzimas comparable a la de **DAB**.

4.2.2 Los derivados del tipo pirrolizidina fueron menos potentes que **DAB** y **LAB**, sin embargo resultaron selectivos frente las enzimas sacarasa y maltasa. En concreto el compuesto **25** con un valor de  $IC_{50}$  de  $108 \pm 55 \mu\text{M}$  frente a sacarasa y  $88 \pm 8 \mu\text{M}$  frente a maltasa.

4.2.3 De las propiedades inhibitorias de las indolizidinas y quinolizidinas frente a disacaridasas intestinales cabe destacar la potencia de la indolizidina **30b** frente a sacarasa ( $IC_{50} 62 \pm 3 \mu\text{M}$ ) y maltasa ( $IC_{50} 293 \pm 19 \mu\text{M}$ ) comparable a la de **LAB**.

### 4.3 Actividad *in vivo* de **D-fagomina**, **DAB** y **LAB**

4.3.1 Actividad de la **D-fagomina** a corto plazo a lo largo del tracto intestinal  
**D-Fagomina** causa una disminución de la concentración de glucosa en sangre postprandial de forma dependiente de la dosis sin estimular la liberación de insulina ni afectar a la absorción de glucosa en el intestino. La administración de **D-Fagomina**, retrasa la aparición de la concentración máxima de glucosa a los 30 minutos cuando es administrada a la dosis de 2 mg/ kg de peso corporal. **D-Fagomina** modula la concentración de glucosa después de la ingesta de sacarosa o almidón probablemente retardando la hidrólisis de sacarosa en el intestino delgado por disminución de la actividad de las glicosidasas de la mucosa intestinal.

Los resultados de actividad de la sacarasa intestinal *in vitro* dependen en gran medida del método experimental y no correlacionan con los resultados de inhibición de esta enzima *in vivo*.

**D-Fagomina** inhibe la adhesión de bacterias fimbriadas al intestino como *S. enterica* y *E. coli* sin afectar a cepas potencialmente beneficiosas como *L. acidophilus* y *Bifidobacterium sp.*

4.3.2 Actividad de la **D-fagomina** a largo plazo en una dieta combinada rica en grasa y carbohidratos

**D-fagomina** administrada en una dieta combinada rica en grasa y sacarosa disminuye los niveles basales de glucosa, insulina y glucagón en sangre. Reduce además el incremento de peso corporal y el % de grasa abdominal y hepática.

4.3.3 Actividad de **DAB** y **LAB** a corto plazo a lo largo del tracto intestinal

**DAB** y **LAB** presentan actividad inhibitoria de la digestión de sacarosa y almidón en el intestino cuando son administrados junto con estos carbohidratos a la dosis de 2 mg/kg. Este efecto da lugar a una disminución de la concentración de glucosa en sangre en el periodo postprandial. **DAB** retrasa la aparición del pico máximo de glucosa a los 30 minutos mientras que el compuesto **LAB** lo retrasa a los 60 minutos. Estos compuestos no estimulan la secreción de insulina ni afectan al transporte de glucosa en el intestino en las condiciones estudiadas.

4.4 Efecto de los productos inhibidores de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (naringinasa de *Penicillium decumbens*) sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis

4.4.1 Los derivados de **DAB** y **LAB** conjugados con aminas aromáticas (**6a-d** y **7a-d**) fueron inhibidores moderados de la cepa de laboratorio H37RV de *M. Tuberculosis*. Sin embargo el patrón de inhibición no correlaciona con el observado frente a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*. Las potencias (**7d**  $630 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) fueron tres órdenes de magnitud menores que las del antibiótico isoniazida (MIC  $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

4.4.2 Las indolizidinas **30a-c** y **30e** y las quinolizidinas **31e** y **31f**, inhibidoras de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens*, no resultaron activas frente a *M. tuberculosis*. de a  $\alpha$ -L-rhamnosidasa y la inhibición del crecimiento de *M.*

*tuberculosis*. No se observó, por tanto correlación entre la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *P. decumbens* y la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

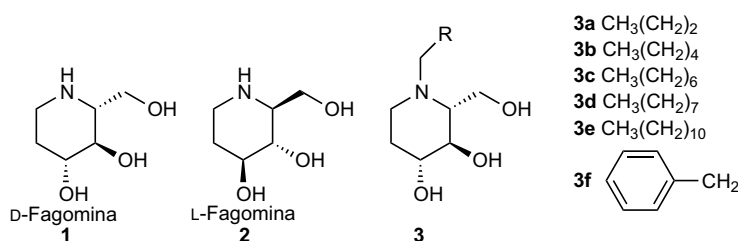
---



## 5.1 Productos estudiados

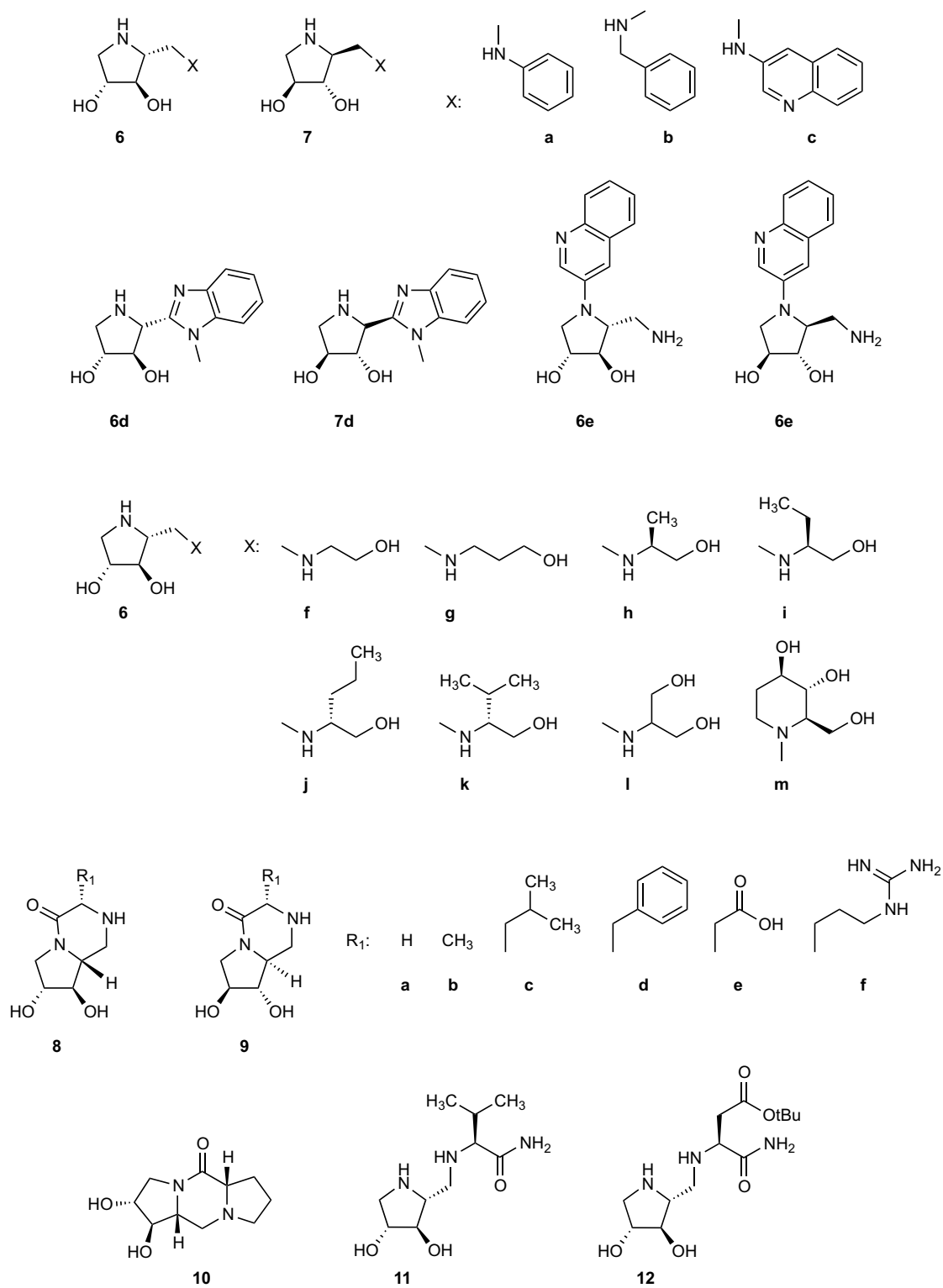
Los iminociclitolos estudiados fueron sintetizados en nuestro grupo de investigación en diferentes trabajos, en los cuales se describen las respectivas metodologías empleadas.

El compuesto D-fagomina (**1**), Bioglance (Barcelona, Spain) se sintetizó siguiendo la patente WO2008025826A1, y sus derivados N-alkilados (**3a-f**) se sintetizaron según la metodología descrita por Castillo *et al.*<sup>[54]</sup>. Su enantiómero sintético L-fagomina (**2**) fue sintetizado según la metodología descrita por Garrabou *et al.*<sup>[68]</sup> (figura 5.1.1).



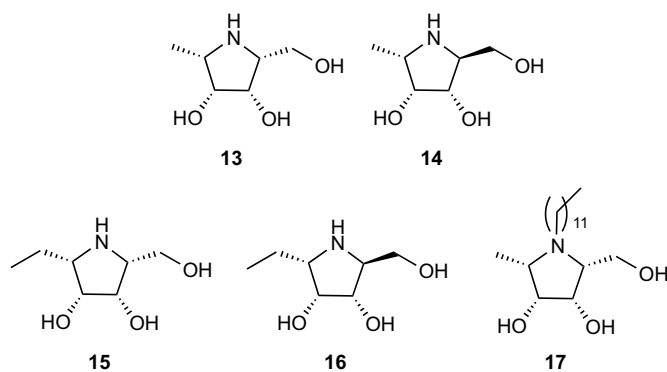
**Figura 5.1.1** Síntesis quimo enzimática de **D-fagomina** (**1**) y derivados N-alkilados (**3a-f**)<sup>[54]</sup>, se añade la estructura de su enantiómero sintético **L-fagomina** (**2**).

Los compuestos DAB (**4**) y LAB (**5**) y sus derivados<sup>[98]</sup>: conjugados aromáticos derivados de DAB (**6a-e**) y de LAB (**7a-e**); derivados de DAB conjugados con aminoalcoholes (**6f-m**); y conjugados con aminoácidos derivados de **DAB** (**8a-f**, **10**, **11** y **12**), y de **LAB** (**9a-f**) (Figura 5.1.2).



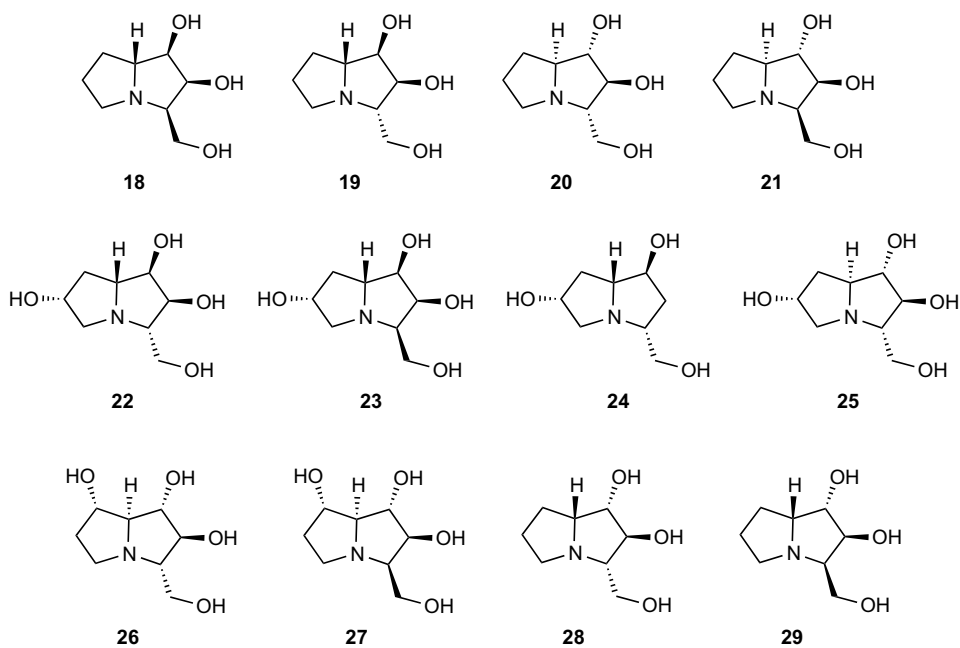
**Figura 5.1.2.** Derivados de DAB y de LAB conjugados con aminas aromáticas (**6a-e**; **7a-e**); derivados de DAB conjugados con aminoalcoholes (**6f-m**); y derivados de DAB y de LAB conjugados con aminoácidos (**8a-f**; **9a-f**; y **10**, **11** y **12**)

El resto de derivados de tipo pirrolidínico, los compuestos **13-17** fueron sintetizados en los trabajos de Espelt *et al.* <sup>[91]</sup> y Calveras *et al.* <sup>[92]</sup> (figura 5.1.3).



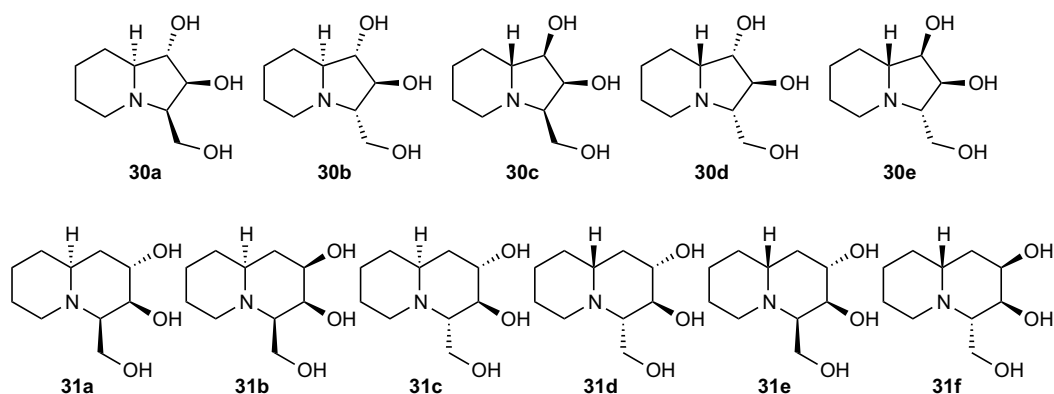
**Figura 5.1.3.** Otros derivados de pirrolidinas sintetizadas por Espelt *et al.* <sup>[91]</sup> y Calveras *et al.* <sup>[92]</sup> estudiados sobre  $\alpha$ -L-fucosidasa

Los compuestos derivados de pirrolizidinas **18-29** <sup>[68]</sup> (figura 5.1.4), indolizidinas **30a-e** <sup>[59]</sup> y quinolizidinas **31a-f** <sup>[59]</sup> (figura 5.1.5), se purificaron además, en este trabajo mediante columna de intercambio iónico.



**Figura 5.1.4.** Pirrolizidinas obtenidas (**18-27**) <sup>[66]</sup> y **28** y **29** <sup>[93b]</sup>





**Figura 5.1.5.** Indolizidinas (**30a-e**) y quinolizidinas (**31a-f**)<sup>[66]</sup>

*Purificación de los iminociclitolos mediante columna de intercambio iónico*

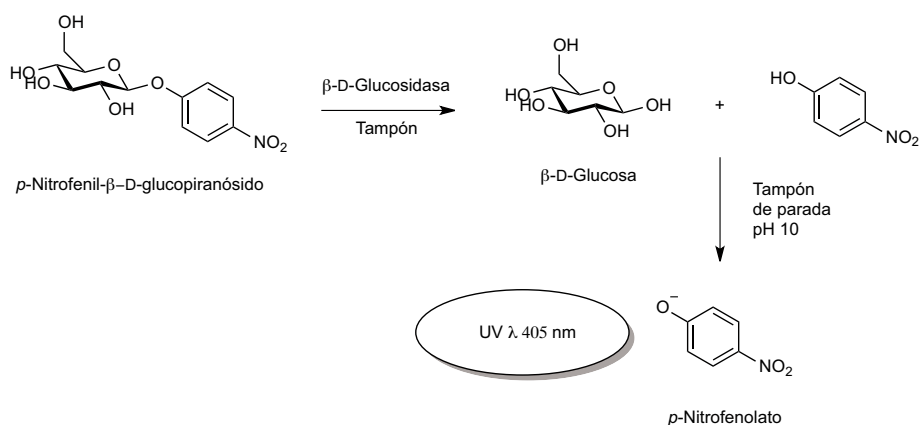
Los derivados de pirrolizidinas **18**, **19**, **20-27** y de indolizinas y quinolizidinas **30a**, **30b**, **30c-e**, y **31a-f** se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en un sistema de FPLC utilizando una fase estacionaria de CM-Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia) en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> empaquetada en una columna de vidrio (450-25 mm) con un volumen final de 220 mL. El flujo fue 4 mL min<sup>-1</sup>. La CM-Shepharose- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se lavó inicialmente con H<sub>2</sub>O. Se inyectó en la columna el material crudo en solución acuosa a pH 7. Las impurezas menores que presentaban coloración marrón se lavaron con H<sub>2</sub>O (150 mL, 3 volúmenes de columna). Los compuestos retenidos se eluyeron en una solución acuosa de NH<sub>4</sub>OH (0.01 M): los compuestos **18** y **19** (inyección de 150mg), **18**: volumen de elución, 584 mL (51 mg); **19**: volumen de elución, 992 mL, (15 mg); los compuestos **22-24**: **22**, volumen de elución 260 mL (17 mg), **23** volumen de elución 376 mL (3 mg), **24** volumen de elución 512 mL (4 mg); compuesto **20** (volumen de elución 376 mL, 49 mg); los compuestos **24** y **25**: **25** (volumen de elución 416 mL, 10 mg), **25** (volumen de elución 48 mL, 26 mg). **30a** y **30b** (inyección de 100 mg), **30a**: volumen de elución, 256 mL (17.0 mg), **30b**: volumen de elución, 309 mL (21.3 mg), compuestos **30c-e** (inyección 40 mg): **30e**: volumen de elución, 120 mL (4.4 mg); **30d**: volumen de elución 264 mL (14.0 mg), **30c**: volumen de elución 408 mL (12.6 mg); compuestos **31a-f** (inyección 242 mg), primera elución con NH<sub>4</sub>OH acuoso(0.005 M): **31d**: volumen de elución 448 mL (57.6 mg), **31d**: volumen de elución 840 mL (3.9 mg); siguientes

fracciones se juntaron, liofilizaron y reinyectaron (134.5 mg), se eluyeron con NH<sub>4</sub>OH acuoso(0.01 M): **31f**: volumen elución 560 mL (3.2 mg), **31b/31c/31f** mezcla: volumen de elución 608 mL (21.5 mg), **31b/c** mezcla: volumen de elución, 728 mL (14.1 mg), **31a**: volumen de elución, 1000 mL (23.1 mg). En cada caso, cuando fue necesario, se repitió la operación hasta consumir toda la muestra cruda. Las fracciones puras se juntaron y liofilizaron. Los datos físicos y los espectros de RMN se muestran en el anexo.

## 5.2 Ensayos de inhibición enzimática sobre glicosidasas comerciales

La actividad enzimática de las glicosidasas se determinó siguiendo el método colorimétrico reportado previamente en nuestro laboratorio<sup>[92, 96]</sup> basado en el uso de estas enzimas comerciales y sus sustratos sintéticos conjugados con *p*-nitrofenol.

Las soluciones de glicosidasas se prepararon en el tampón apropiado y se incubaron junto con los compuestos en estudio (inhibidores) a diferentes concentraciones en placas de 96 pocillos. Después de la adición de la correspondiente solución de sustrato, se continuaron estas incubaciones durante periodos de tiempo variables en función de la enzima en estudio. La reacción se detuvo por aumento del pH, mediante la adición de una solución de parada (pH=10). La reacción de hidrólisis libera el *p*-nitrofenol del sustrato, y el tratamiento básico lo transforma en el anión *p*-nitrofenolato, que presenta coloración amarilla y cuya absorbancia se determinó a 405 nm en un lector de placas UV/VIS (figura 5.1.6).



**Figura 5.1.6** Esquema del ensayo enzimático, ejemplo de la  $\beta$ -D-glucosidasa

### *Material*

Para los ensayos de inhibición se utilizaron las enzimas comerciales  $\alpha$ -D-Glucosidasa de baker's yeast;  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz;  $\beta$ -D-glucosidasa de sweet almonds;  $\beta$ -D-galactosidase de hígado bovino;  $\alpha$ -D-mannosidase de jack beans, *Genus Canavalia*;  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *Penicillium decumbens*,  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón bovino y sus sustratos sintéticos *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-mannopiranosido, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-rhamnopiranosido, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-fucopiranosido (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

El agua para la preparación de los tampones y otras soluciones fue obtenida usando un sistema de purificación Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

### *Determinación de actividad*

Las soluciones de glicosidasas comerciales en sus correspondientes tampones, se incubaron en placas de 96 pocillos (37°C) en ausencia de inhibidor (control) o a diferentes concentraciones de éste (1.0 mM - 2.0 nM). Las enzimas se pre incubaron con los inhibidores (5 min, 37°C).

La reacción enzimática empezó con la adición de los respectivos sustratos a las soluciones anteriores (*p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-glucopiranosido; *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-glucopiranosido; *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosido; *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-rhamnopiranosido; *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-mannopiranosido; *p*-nitrofenol- $\alpha$ -L-fucopiranosido). Las incubaciones se prolongaron durante diferentes periodos de tiempo en función del enzima en estudio:  $\alpha$ -D-glucosidasa de levadura (3 min),  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz (10 min),  $\beta$ -D-glucosidasa (5 min),  $\beta$ -D-galactosidasa (10 min),  $\alpha$ -D-manosidasa (10 min),  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (10 min),  $\alpha$ -L-fucosidasa (10 min) y La reacción se paró con la adición de una solución de Tris (50 mL, 1 M) o tampón glicina (180 mL, 100 mM, pH 10), dependiendo del ensayo. La cantidad de *p*-nitrofenol formado se determinó 405 nm con un espectrofotómetro UV/VIS Spectramax Plus (Molecular Devices Corporation). La actividad de  $\alpha$ -D-Glucosidasa de rice determinó con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (1 mM) en tampón acetato sódico (50 mM, pH 5.0). La actividad  $\beta$ -D-glucosidasa se determinó con *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (1

mm) en tampón acetato sódico (100 mM, pH 5.0). La actividad  $\beta$ -D-galactosidasa se determinó con *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (1 mM) en tampón fosfato (100 mM, 0.1 mM, pH 7.2). La actividad  $\alpha$ -D-manosidasa se determinó con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido (1 mM) en tampón acetato sódico (50 mM, pH 5.0). La actividad  $\alpha$ -L-rhamnosidasa se determinó con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-rhamnopiranosido (1 mM) en tampón acetato sódico (50 mM, pH 5.0). La actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa se determinó con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-fucopiranosido (0.15 mM) en tampón acetato sódico (50 mM, pH 5.0). Las soluciones de las diferentes glicosidasas comerciales se prepararon tal y como se describe a continuación:  $\alpha$ -D-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (0.15 mg mL<sup>-1</sup> de tampón);  $\alpha$ -D-glucosidasa de arroz en suspensión de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 mL) en tampón (5 ml);  $\beta$ -D-glucosidasa de almendra (0.1 mg mL<sup>-1</sup> tampón),  $\beta$ -D-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (0.5 mg mL<sup>-1</sup> tampón),  $\alpha$ -L-rhamnosidasa (naringinasa) de *Penicillium decumbens* (0.3 mg mL<sup>-1</sup> tampón);  $\alpha$ -D-mannosidasa de *Genus Canavalia* en suspensión (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 mL) en tampón (10 mL);  $\beta$ -D-galactosidasa de bovine liver (0.1 mg mL<sup>-1</sup> tampón), y  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón bovino en suspensión de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (33 mL) en tampón (10 mL).

#### *Determinación de IC<sub>50</sub>*

La determinación de los valores de IC<sub>50</sub> se realizó mediante un modelo de aproximación dosis-respuesta sigmoideo no lineal utilizando el programa Graph Pad Prism 4.

#### *Cinética de inhibición*

La naturaleza de la inhibición de la colección de productos frente a las diferentes glicosidasas y los valores de *K<sub>i</sub>* se determinaron a partir de los diagramas de Lineweaver-Burk.

### 5.3 Ensayos de inhibición enzimática sobre disacaridasas intestinales y otras enzimas que degradan almidón

#### *Material*

Las disacaridasas se obtuvieron de la mucosa intestinal de rata como se describe en el siguiente apartado.

Las enzimas  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino tipo I-A,  $\alpha$ -amilasa de saliva humana tipo XIII A y amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich).

Los disacáridos (sustratos) sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa, se obtuvieron a la máxima pureza disponible (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), y también el almidón (almidón de patata de Sigma-Aldrich).

Los anestésicos utilizados: ketamina clorhidrato (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain), xilacina (Rompun 2%, Química Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain).

Los reactivos para preparar la solución de determinación de glucosa: ácido 4-hidroxibenzoico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 4-aminoantipirina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Glucosa oxidasa Tipo II-S from *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Peroxidasa Tipo II de horseradish (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Roche Diagnostics, Meinheim, Germany).

El agua para la preparación de los tampones y otras soluciones fue obtenida usando un sistema de purificación Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

#### *Modelo Animal*

Se utilizaron ratas machos adultos de la cepa Sprague-Dawley de 200 g de peso (n=2/3) (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) mantenidos en jaulas (n=2/jaula) bajo condiciones controladas de temperatura  $22 \pm 3$  °C y humedad relativa 40-70%, y con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad. Las ratas se alimentaron con una dieta estándar (Panlab A04, Panlab, Barcelona, Spain) y agua *ad libitum*. El manejo y el sacrificio de los animales se hizo de acuerdo con la Guía de la Comunidad Europea para el cuidado y manipulación de animales de experimentación con el pertinente permiso del Subcomité de Bioética

del CSIC (permit number: CTQ2009-07359). Las ratas se sometieron a 12 horas de privación de alimento (la noche previa a la realización del experimento) y se anestesiaron con ketamina clorhidrato (0.1 % v/peso corporal, 90 mg/kg peso corporal) y xilacina (0.01 % v/peso corporal, 10 mg/kg peso corporal) por vía intramuscular.

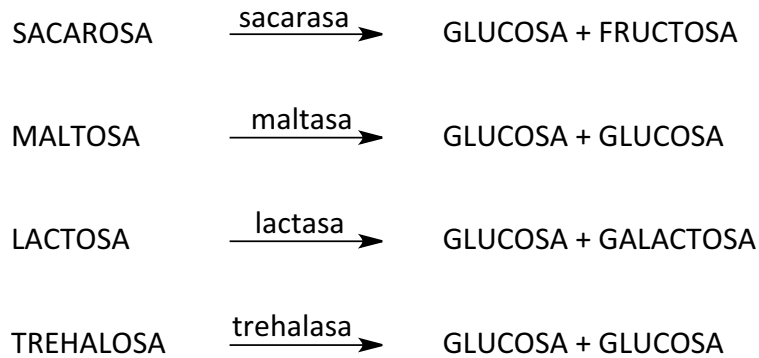
#### *Preparación de la suspensión de mucosa intestinal*

Se separó el intestino delgado y se dividió en duodeno, yeyuno e íleo. El yeyuno se lavó con una solución salina isotónica a 4°C, se abrió longitudinalmente y se raspó la mucosa con un portaobjetos y se congeló y conservó a -80°C hasta el momento de su procesado. Para la determinación de actividad de disacaridasas se diluyeron las muestras de mucosa (50 mg mucosa mL<sup>-1</sup> solución salina isotónica a 4°C) y se homogeneizaron con un homogeneizador de vidrio de 2 mL. La mucosa homogeneizada se diluyó cuatro veces para los ensayos de actividad de sacarasa y trahalasa, una vez para los de lactasa y 25 veces para los de maltasa y para la determinación de proteínas.

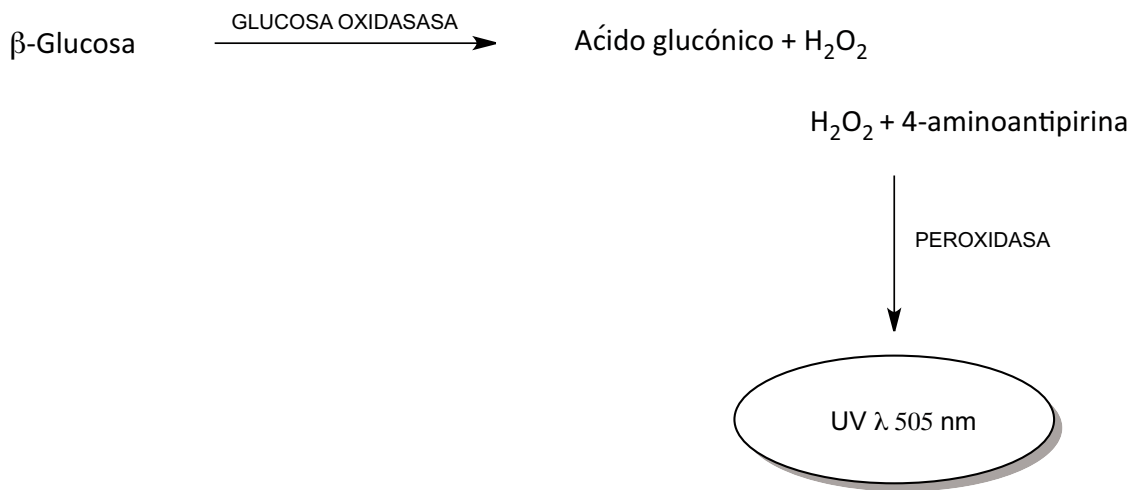
#### *Ensayo de determinación de la actividad de disacaridasas.*

La actividad de las disacaridasas: sacarasa, lactasa, maltasa y trehalasa, se determinó colorimétricamente midiendo la cantidad de glucosa liberada por la acción de estas enzimas sobre sus correspondientes sustratos: sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa de acuerdo al procedimiento descrito por Dahlqvist<sup>[109]</sup>. La glucosa se transforma en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por acción de la glucosa oxidasa. La peroxidasa cataliza la combinación de peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina generando un compuesto estable y coloreado detectable a 505 nm (Figura 5.2.1).

a:



b:



**Figura 5.2.1. a:** Primer paso del método de determinación de actividad de las disacaridasas. Las disacaridasas hidrolizan los disacáridos en sus correspondientes monómeros. **b:** La glucosa formada se determina por el método de Dahlqvist<sup>[109]</sup>.

Cada uno de los productos a estudiar se probó sobre la mucosa de dos ratas (como mínimo) a diferentes concentraciones (desde 0.2 nM hasta 1 mM) en presencia de los correspondientes sustratos (0.1 M). Primero se pre incubaron (30 min a 37°C y 250 r.p.m.) los inhibidores (5  $\mu$ l) y las soluciones de mucosa diluida (95  $\mu$ l). La reacción empezó con la adición del sustrato (0.1 ml), el sustrato, el inhibidor y el homogeneizado de mucosa se incubaron juntos (30 min a 37 ° C y 250 r.p.m.) en tampón fosfato (0.3 ml a pH 6.8). La reacción se terminó con la adición del reactivo Tris-glucosa oxidasa-peroxidasa (Tris 0.5 m; ácido 4-hidroxibenzoico 10 mm; 4-aminoantipirina 0.4 mM; glucosa oxidasa 1480 UI L<sup>-1</sup>, peroxidasa 250 UI L<sup>-1</sup>, pH 7.3).

Después de una segunda incubación con este reactivo (2.5 h a 37°C y 250 r.p.m.) se determinó la cantidad de glucosa liberada a 505 nm utilizando un lector de placas ELISA de 96 pocillos. La actividad enzimática ( $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado por hora) se normalizó al contenido de proteína evaluado por el método de Bradford<sup>[123]</sup>. Las determinaciones se realizaron por triplicado sobre la mucosa de dos o tres ratas (n=2 o n=3).

#### *Actividad $\alpha$ -Amilasa:*

La actividad se ensayó sobre  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino tipo I-A (A6255 Sigma-Aldrich) y  $\alpha$ -amilasa de saliva humana tipo XIII A (A1031 Sigma-Aldrich) usando el método descrito por Dahlqvist<sup>[109]</sup> tal y como se ha descrito para la determinación de actividad en los homogeneizados de mucosa intestinal y siguiendo el ensayo de Starch Azure. En el caso de Dahlqvist se usaron  $30 \text{ U mL}^{-1}$  de  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino ( $95 \mu\text{L}$ ) o  $2 \text{ U mL}^{-1}$  de  $\alpha$ -amilasa de saliva humana ( $95 \mu\text{L}$ ). Cada producto se probó a un rango de concentraciones desde  $0.2 \text{ nM}$  hasta  $1 \text{ mM}$  en presencia de  $4 \text{ g L}^{-1}$  de almidón. Para el ensayo d starch-azure la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 minutos en un volumen total de 5 mL. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato de sodio ( $18 \text{ mM Na}_3\text{PO}_4$   $45 \text{ mM NaCl}$  pH 7) starch azure ( $4.5 \text{ mL}$ ,  $1.8\% \text{ w/v}$ ),  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino ( $0.125 \text{ mg}$ ,  $0.5 \text{ mL}$ ) y el inhibidor ( $1 \text{ mM}$ ,  $50 \mu\text{L}$ ). Después de 15 minutos se filtró la suspensión a través de un filtro de celulosa Whatman 54 y se determinó la absorbancia del filtrado a 595 nm. Siendo la absorbancia proporcional a la actividad del enzima.

#### *Actividad amiloglucosidasa*

Para la determinación de la actividad amiloglucosidasa se utilizó el enzima amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* en un volumen total de  $100 \mu\text{L}$ , que contenía tampón acetato ( $10 \text{ mM}$ , pH 5) usando *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido ( $5 \text{ mM}$ ) como sustrato y amiloglucosidasa ( $28.8 \text{ U mL}^{-1}$ ). Cada inhibidor potencial se probó a un rango de concentraciones desde  $0.2 \text{ nM}$  hasta  $2 \text{ mM}$ . La enzima ( $20 \mu\text{L}$ ) se preincubó en presencia de cada producto ( $1 \mu\text{L}$ ) a 45°C durante 5 minutos. La reacción se inició después de la adición del sustrato ( $20 \mu\text{L}$ ) a 45°C. Después de 20 minutos se paró la reacción con la adición de Tris-HCl  $1 \text{ M}$  ( $200 \mu\text{L}$ ). La absorbancia a 405 nm del *p*-



nitrofenol liberado es proporcional a la actividad del enzima.

#### *Actividad digestión de almidón*

La capacidad de digestión de almidón se determinó de acuerdo al método de Dahlqvist<sup>[109]</sup> midiendo colorimétricamente la cantidad de glucosa liberada por las enzimas de la mucosa intestinal sobre el almidón. El homogeneizado de mucosa pertinentemente diluido (95  $\mu\text{L}$ ) se pre incubó en ausencia (control) o presencia de inhibidor (5  $\mu\text{L}$ , a un rango de concentraciones desde 0.2 nM hasta 1 mM) en tampón fosfato a pH 6.8 (300  $\mu\text{L}$ ) durante 30 minutos a 37°C. La reacción se empezó con la adición de almidón (100  $\mu\text{L}$ , 4 g  $\text{L}^{-1}$  sustrato). La mezcla se incubó a 37° C durante 30 min y agitación (250 rpm) en un volumen de 500 mL. Se paró la reacción añadiendo una solución de (2 mL, Tris 0.5 M; ácido 4-hidroxibenzoico 10  $\mu\text{M}$ ; 4-aminoantipirina 0.4 mM; glucosa oxidasa 1480 U  $\text{L}^{-1}$ , peroxidasa 250 U  $\text{L}^{-1}$ , pH 7.3). Se incubó nuevamente (2 h a 37°C) y se midió la cantidad de glucosa a 505 nm usando un lector ELISA y placas de 96 pocillos. La actividad ( $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado por hora) se normalizó al contenido de proteína evaluado por el método de Bradford<sup>[123]</sup>. La actividad en ausencia de inhibidor fue de  $20.79 \pm 2.39 \mu\text{mol glucosa L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Cada producto se midió por triplicado sobre la mucosa de 2 o 3 ratas.

#### *Determinación de IC50*

Los valores de  $\text{IC}_{50}$  se determinaron mediante un modelo de aproximación dosis-respuesta sigmoideo no lineal utilizando el programa Graph Pad Prism 4.

## 5.4 Estudio *in vivo* sobre el efecto de iminociclitoles

### 5.4.1 Estudio a corto plazo sobre la modulación de la glicemia postprandial

#### *Material*

D-Fagomina, Bioglane (Barcelona, Spain) se sintetizó siguiendo la patente WO2008025826A1. Se usó el preparado cristalizado puro (ensayo 98%) D-fagomina (Fagopure<sup>®</sup>) para evaluar la actividad D-fagomina a lo largo del tracto intestinal como modulador de la actividad de glucosidasas y la adhesión bacteriana.

Los productos DAB y LAB fueron sintetizados en nuestro grupo de investigación<sup>[98]</sup>.

Otros reactivos y productos químicos utilizados: 1-deoxinojirimicina (DNJ, Carbosynth Limited, Berkshire, UK), miglitol (Zhejiang Medicine Co. Ltd., Xinchang Pharma, Chengguan Town, P.R. China), acarbosa (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), sacarosa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), almidón (corn starch C-TEX 06201, Cargill-Cerestar, Martorell, Spain), floridizina dihidrato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), ketamina clorhidrato (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain), xilacina (Rompun 2%, Química Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain), ácido 4-hidroxibenzoico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 4-aminoantipirina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Glucosa oxidasa Tipe II-S from *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Peroxidasa Tipe II from horseradish (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Roche Diagnostics, Meinhem, Germany). El agua para la preparación de los tampónes y otras soluciones fue obtenida usando un sistema de purificación Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

#### *Ratas y dietas*

Se utilizaron un total de 77 ratas machos adultos de la cepa Sprague-Dawley de 175-250 g de peso corporal (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) mantenidos en jaulas (n=3-4/jaula) bajo condiciones controladas de humedad (40-77%), y temperatura (23°C) con un ciclo de luz-oscuridad de 12-hour. Se alimentaron con una dieta estándar (PanLAB A04, Panlab, Barcelona, Spain) y agua *ad libitum*. Para minimizar los efectos del ritmo

circadiano, las manipulaciones de las ratas se realizaron durante la mañana. La manipulación y el sacrificio de los animales se hicieron de acuerdo con la guía europea para el cuidado y el manejo de animales de laboratorio y con el permiso del Subcomité de Bioética del CSIC. Se minimizó el número de animales y su sufrimiento.

*Efecto de los iminoclitoles sobre la concentración de glucosa postprandial. Sucrose/starch-loading test. Determinación de glucosa e insulina plasmáticas*

El test de sucrose/starch-loading se llevó a cabo después de 12 horas de ayuno. Se administró a las ratas una solución de sacarosa o almidón (1 o 2 g/kg peso corporal) junto con la cantidad apropiada del compuesto a estudiar. Los controles negativo y positivo se realizaron administrando solo agua (vehículo) o solución de carbohidrato. Las dosis apropiadas de D-fagomina (1, 2, 4 mg/kg peso corporal), DNJ, miglitol (N-hidroxi-etil-DNJ), acarbosa (2 mg/kg peso corporal) y los controles se administraron en disolución acuosa utilizando una sonda intragástrica. Se usaron cuatro o cinco animales para cada condición experimental. Las muestras de sangre se tomaron de la vena safena<sup>[124]</sup> a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min de la administración. La concentración de glucosa en sangre se midió por el método del electrodo enzimático usando un medidor de glucosa Ascensia ELITE XL (Bayer Consumer Care AG, Basel, Switzerland). La concentración de insulina en plasma se determinó con un kit ELISA específico para rata y ratón (rat/mouse insulin ELISA kit, Millipore Corporation), en plasma obtenido a partir de muestras de sangre (0.1 ml) recogidas en tubos con EDTA a los 0, 8, 15, 30, 60 y 120 min de la administración. El plasma se mantuvo a -80°C hasta su análisis

Se realizaron nuevos experimentos siguiendo la misma metodología para determinar el efecto de los compuestos **DAB** y **LAB** sobre la glicemia postprandial en el mismo modelo animal.

*Actividad sacarasa intestinal en homogeneizado de tejido y sacos evertidos*

La actividad de la sacarasa de la mucosa intestinal (glucosidasa EC 3.2.1.48) se determinó sobre homogeneizados de mucosa del yeyuno y sacos intestinales evertidos de la misma región intestinal siguiendo los métodos de Dahlqvist<sup>[109]</sup> y Lee et al.<sup>[125]</sup>. Para la preparación de los homogeneizados de mucosa intestinal, las ratas se

dejaron en ayunas la noche previa, luego se anestesiaron con ketamina clorhidrato (90 mg/kg peso corporal ip) y xilacina (10 mg/kg peso corporal ip). Se procedió a la laparatomía, se localizó el intestino delgado y se dividió en tres partes correspondientes a duodeno, yeyuno e íleo. El yeyuno se lavó con suero salino isotónico frío (5 ml), se abrió longitudinalmente y se raspó la mucosa con ayuda de un portaobjetos. Se diluyeron las muestras en solución salina isotónica fría (50 mg mucosa por ml) y se homogeneizaron utilizando un T10 basic Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Germany). La actividad sacarasa se determinó colorimétricamente midiendo la cantidad de glucosa liberada por la acción de la sacarasa sobre la sacarosa de acuerdo al procedimiento de Dahlqvist<sup>[109]</sup>. Cada uno de los productos (D-fagomina, DNJ, miglitol, acarbosa) se probó sobre la mucosa de cinco ratas a diferentes concentraciones desde 0.2 nM hasta 1 mM en presencia de 0.1 M sacarosa (sustrato). Los inhibidores (5 ml) y la mucosa diluida (95 ml) se pre incubaron (30 min a 37°C), la reacción se llevó a cabo en tampón fosfato a pH 6.8 (300 ml) mediante la adición del sustrato (0.1 ml). El sustrato, el inhibidor y el homogeneizado de mucosa se incubaron juntos (30 min at 37°C and 250 rpm) en tubos de 5 ml por triplicado. La reacción se paró con la adición de la solución de Glucostato (2 ml) (Tris 0.5 M; ácido 4-hidroxibenzoico 10 mM; 4-aminoantipirina 0.4 mM; glucosa oxidasa 1480 IU/l, peroxidasa 250 IU/l, pH 7.3). Después de una segunda incubación (2.5 h at 37°C) se determinó la cantidad de glucosa liberada a 505 nm utilizando un lector de placas ELISA de 96 pocillos. La actividad enzimática ( $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado por hora) se normalizó al contenido de proteína evaluado por el método de Bradford<sup>[123]</sup>.

Para preparar los sacos intestinales evertidos, se procedió a la obtención del yeyuno tal y como se describe anteriormente, se lavó con una solución salina isotónica (5 ml) and y se corto en segmentos de 3 cm. Cada segmento se pesó, se evertió y sus extremos se sellaron utilizando hilo de cirugía, de manera que el epitelio que en el intestino estaba encarado al lumen quedase expuesto al exterior. Se evitó la absorción de glucosa liberada por acción de la sacarasa inhibiendo el transportador de glucosa (30 min at 37°C and 250 rpm) con una solución de Ringer que contenía flordizina (0.5 mM)<sup>[125]</sup>. Los sacos evertidos se incubaron (16 min at 37°C, pH 7.3 and 250 rpm) en solución de Ringer (5 ml) en presencia de sacarosa (50 mM) y flordizina (0.5 mM) y diferentes concentraciones (0.2 nM to 1 mM) de cada uno de los inhibidores en

estudio. Después de la incubación se sacaron los sacos y alícuotas (500  $\mu$ l) de la solución de incubación se añadieron a tubos que contenían solución de Glucostato (2 ml) por triplicado. Estos se incubaron (2 h at 37°C and 250 rpm) y finalmente se procedió a la determinación de la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro SpectraMax M5. La actividad sacarasa ( $\mu$ mol de sustrato hidrolizado por hora) se normalizó a los mg de peso húmedo de cada saco.

#### *Estadística*

Los resultados de los estudios de inhibición de la actividad sacarasa de los dos ensayos se expresan como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Las medias se compararon utilizando un test de t de Student para determinar diferencias entre los dos ensayos. Se aplicó un modelo de aproximación dosis-respuesta sigmoideo no lineal para determinar los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición enzimática utilizando el programa Graph Pad Prism 4. Las áreas bajo la curva de los test de sacarosa y almidón (AUC) se calcularon siguiendo la regla de los trapezoides. Las diferencias significativas se evaluaron siguiendo un test ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni's. Los resultados con P < 0.05 se tomaron como significativamente diferentes. Los análisis de datos y la estadística se realizaron con la ayuda del programa Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

#### **5.4.2 Intervención nutricional. Estudio del efecto de D-fagomina sobre una dieta combinada rica en sacarosa y grasas (high fat-high sucrose)**

##### *Animales y dietas*

15 machos adultos (28 semanas) de la cepa de ratas Sprague-Dawley (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 22 $\pm$ 2°C y luz (ciclos de 12 horas de 0630-1830). El cuidado, manejo, manipulación y sacrificio se hicieron de acuerdo con la guía de la Unión Europea para el cuidado y manipulación de animales de laboratorio (European Union guidelines for the care and management of laboratory animals) y con el pertinente permiso obtenido del subcomité de bioética del CSIC (ref. AGL2009-12 374-C03-03). Los animales se

alimentaron con pienso estándar durante 5 semanas antes de ser divididas en 3 grupos en función de la dieta a seguir: grupo control (C,  $n=5$ ) la ratas recibieron la dieta estándar Teklad Global 2014 (Harlan laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA); grupo dieta alta en grasa y sacarosa (HFHS,  $n=5$ ), las ratas de este grupo recibieron la dieta high-fat high-sucrose TD. 08811 (Harlan laboratories Inc.); y el grupo dieta alta en grasa y sacarosa suplementada con D-fagomina (HFHS + FG,  $n=5$ ), estas ratas recibieron la dieta high-fat high-sucrose TD. 08811 (Harlan laboratories Inc.) suplementada con D-fagomina (Bioglance, Barcelona, Spain; 0.65g/kg alimento, 0.2% respecto a la sacarosa). La composición de las dietas se resume en la siguiente tabla (tabla 5.4.2):

**Tabla 5.4.2** Composición de la dieta

	Estándar	Alta en grasa y sacarosa	Alta en grasa y sacarosa con D-fagomina
<b>Ingredientes (g)</b>			
Polvo	1000.00 <sup>a</sup>	1000.00 <sup>b</sup>	1000.00 <sup>b</sup>
Antioxidante TBHQ	-	0.04	0.04
Gelatina porcina tipo A 240/260	25.00	25.00	25.00
Lecitina de soja	4.00	25.00	25.00
D-Fagomina	-	-	0.68
<b>Composición (g/Kg)</b>			
Proteínas	139.00	185.60	185.60
L-cistina	2.920	2.86	2.86
Carbohidratos disponibles	466.56	434.93	434.93
<i>Sacarosa</i>	<i>n.s.</i>	<i>323.68</i>	<i>323.68</i>
<i>Almidón de maíz</i>	<i>n.s.</i>	<i>54.13</i>	<i>54.13</i>
<i>Maltodextrina</i>	<i>n.s.</i>	<i>57.12</i>	<i>57.12</i>
Fibra cruda	214.81	47.60 <sup>c</sup>	47.60 <sup>c</sup>
Grasa de la leche (anhidra)	-	199.92	199.92
Aceite de soja	38.88	19.04	19.04
Minerales	45.70	40.94	40.94
Vitaminas	11.80	18.09 <sup>d</sup>	18.09 <sup>d</sup>
Ceniza	45.70	-	-
Bitartato de colina	1.00	2.86	2.86

### Macronutrientes

Proteínas (% por peso)	16.30	20.90	20.90
Carbohidratos (% por peso)	46.70	43.50	43.50
Lípidos (% por peso)	4.30	24.30	24.30
Energía de proteínas (%)	22.50	17.60	17.60
Energía de carbohidratos (%)	64.30	36.50	36.50
Energía de lípidos (%)	13.30	45.90	45.90
Densidad energética total (Kcal/g) <sup>e</sup>	2.90	4.70	4.70

---

<sup>a</sup> Polvo estándar (Teklad Global 2014),

<sup>b</sup> Polvo alto en grasa y sacarosa (TD 08811)

<sup>c</sup> De celulosa

<sup>d</sup> De AIN-93-VX (94047)

<sup>e</sup> Densidad energética estimada según los factores de Atwater, asignando 4 kcal/g a las proteínas, 9 kcal/g a los lípidos, and 4 kcal/g a los carbohidratos disponibles.

n.e. no especificado

La cantidad de **D-fagomina** en el alimento fue equivalente al 0.2% respecto de la de sacarosa, de acuerdo con nuestros resultados sobre su efecto postprandial<sup>[66]</sup>

El experimento consistió en administrar durante 5 semanas un tipo de dieta distinta a cada grupo de ratas y en observar las diferencias entre los valores de diferentes parámetros antes y después de la intervención nutricional:

#### *Peso y presión arterial*

El peso de los animales se determinó con una balanza Electronic Animal Balance LIBROR EB 2800M de Shimadzu (Kyoto, Japón)

La presión arterial se midió en la cola de los animales utilizando un método no invasivo con un tensiómetro LE5001 acoplado a un transductor de pulso para rata, modelo LE516OR con número de serie 0736209 de Panlab (Cornellà, Barcelona, España)

### *Obtención de muestras*

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas durante 18 h para la obtención de orina y heces. Posteriormente, en ayunas, se procedió a la extracción de sangre. Las muestras de orina y de sangre se recogieron antes de la intervención nutricional para determinar los valores basales y se guardaron a -80°C hasta su análisis. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena safena<sup>[124]</sup> se separó el plasma por centrifugación y se guardó a -80°C hasta su análisis.

### *Determinación de glucosa*

La concentración de glucosa en sangre se determinó por el método del electrodo enzimático usando un medidor de glucosa Ascensia ELITE XL (Bayer Consumer Care AG, Basel, Switzerland).

### *Determinación de hormonas metabólicas en suero, plasma o muestras de tejido*

#### *Determinación de hormonas*

La insulina plasmática se determinó con un kit comercial para rata y ratón, Rat/Mouse Insulin ELISA kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Técnica explicada en el apartado 5.4

El resto de hormonas se determinaron mediante un MILLIPLEX MAP basado en la tecnología Luminex® xMAP®. La tecnología Luminex® utiliza microesferas con dos colorantes fluorescentes para generar un código de color. Esta técnica permite generar 100 marcas de color diferentes. Cada una de ellas recubierta con un anticuerpo específico. Esta técnica permite determinar muchos analitos de una sola vez, optimizándose así el volumen de muestra.

- Cuando uno de estos anticuerpos reconoce un analito de la muestra se introduce un anticuerpo de detección biotinilado
- La reacción se incuba con Streptavidina-PE, la molécula reportera, para que se produzca la reacción en cada microesfera.
- Las microesferas pasan rápidamente a través de un laser que excita los colorantes internos. Un segundo laser excita el PE, el colorante fluorescente de la molécula reportera.



- Finalmente las microesferas se identifican individualmente y el resultado del bioensayo se cuantifica en base a las señales de fluorescencia, mediante procesadores de alta velocidad.

#### *Obtención de tejidos y órganos*

Al finalizar el tiempo del experimento, a la semana 22 se procedió al sacrificio de los animales (42 semanas) y obtención de muestras de sangre, tejido adiposo, músculo y órganos (hígado, intestino, aorta, cerebro, corazón y riñón). Previo ayuno de 12 horas, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal (ketamina 80 mg/kg de peso corporal; xilacina 10 mg/kg de peso corporal). Una vez anestesiadas se procedió a la extracción del máximo volumen de sangre, extraída de la aorta. Finalmente se procedió a la disección y conservación de los órganos.

#### *Estadística*

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el paquete estadístico SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Para determinar las diferencias entre grupos se hizo un test ANOVA de una vía seguido del *post hoc* test de Turkey. Los datos se presentan como medias con sus errores estándar (s.e.m.), con un nivel de significación de 0.05.

## 5.5 Efecto de los iminociclitoles sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*

### 5.5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método REMA

Para la determinación del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizó el método colorimétrico REMA (Resazurin Microtiter Assay)<sup>[121]</sup>.

#### *Material*

Los cultivos se realizaron en medio Middlebrook 7H9 Broth suplementado con 0.2% de glicerol, 0.5% albumina-dextrosa catalasa (Becton Dickinson) y 0.05% Tween 80 (7H9-S).

La resazurina, en forma de polvo de sal sódica (Sigma-Aldrich 199303-1G) se preparó (0.01% w/v) en agua destilada y se esterilizó por filtración a través de una membrana 0.2  $\mu\text{m}$ .

#### *Preparación del inóculo*

Se hizo un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur en medio Middlebrook Broth 7H9-S (frascos de PYREX de 250 mL, a 37°C y agitación de 120 rpm), y se dejó crecer hasta fase mid-log. En ese punto se paró el crecimiento por congelación en nitrógeno líquido y se guardaron alícuotas (3 ml cada una) a -70°C. El día del experimento se diluyó una alícuota (3 mL) de la solución previa hasta  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> en 7H9-S.

#### *Procedimiento REMA*

Se prepararon directamente en las placas de 96 pocillos diluciones seriadas a la mitad de cada inhibidor en medio 7H9-S (100  $\mu\text{L}$ ) desde 3 mg mL<sup>-1</sup> hasta 0.094 mg mL<sup>-1</sup> para 30a, 30b, 30c, y 30e inhibitors and from 0.75 mg mL<sup>-1</sup> to 0.012 mg mL<sup>-1</sup> for 31e, 31f y derivados de DAB, LAB y DAB y LAB. 2.5 mg mL<sup>-1</sup> hasta 0.078 mg mL<sup>-1</sup>. Se incluyeron controles de crecimiento sin antibiótico, controles estériles sin inoculación y controles de inhibición con isoniazida (1  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup>). El inóculo (100  $\mu\text{L}$ ) se añadió a los pocillos que contenían inhibidor y a los pocillos correspondientes al control. Las placas se taparon,

sellaron e incubaron a 37°C bajo una atmósfera estándar. Después de seis días de incubación, se añadió a cada pocillo la solución de resazurina (100 µL), y la placa se incubó dos días más a 37°C hasta ver un cambio de color. El cambio de color del cultivo, de azul a rosa, indica la reducción de la resazurina y por lo tanto, que hay crecimiento bacteriano. La MIC se define como la mínima concentración de fármaco que evita el cambio de color, es decir la mínima concentración a la cual no hay crecimiento bacteriano. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.





## 6. BIBLIOGRAFIA

---



- [1] R. Sasisekharan, J. Myette, *American Scientist* **2003**, *91*, 432-441.
- [2] T. M. Gloster, *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 913-928.
- [3] T. M. Gloster, D. J. Vocadlo, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 683-694.
- [4] D. J. Vocadlo, G. J. Davies, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 539-555.
- [5] G. J. Davies, T. M. Gloster, B. Henrissat, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 637-645.
- [6] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D233-238.
- [7] T. M. Gloster, G. J. Davies, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305-320.
- [8] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521-555.
- [9] T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 750-770.
- [10] D. E. Koshland, *Biological Reviews* **1953**, *28*, 416-436.
- [11] A. Vasella, G. J. Davies, M. Bohm, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 619-629.
- [12] B. P. Rempel, S. G. Withers, *Glycobiology* **2008**, *18*, 570-586.
- [13] S. S. Lee, S. Y. Hong, J. C. Errey, A. Izumi, G. J. Davies, B. G. Davis, *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 631-638.
- [14] L. Pauling, *Chemical & Engineering News Archive* **1946**, *24*, 1375-1377.
- [15] P. Ermert, A. Vasella, M. Weber, K. Rupitz, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1993**, *250*, 113-128.
- [16] V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-554.
- [17] M. von Itzstein, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 967-974.
- [18] C.-W. Ho, S. D. Popat, T.-W. Liu, K.-C. Tsai, M.-J. Ho, W.-H. Chen, A.-S. Yang, C.-H. Lin, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 489-497.
- [19] A. L. Concia, L. Gomez, J. Bujons, T. Parella, C. Vilaplana, P. J. Cardona, J. Joglar, P. Clapes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**.
- [20] J. C. Errey, S. S. Lee, R. P. Gibson, C. Martinez Fleites, C. S. Barry, P. M. J. Jung, A. C. O'Sullivan, B. G. Davis, G. J. Davies, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1234-1237.
- [21] A. A. Watson, G. W. J. Fleet, N. Asano, R. J. Molyneux, R. J. Nash, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265-295.



- [22] G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 107-118.
- [23] N. Asano, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66*, 1479-1492.
- [24] S. Inouye, T. Tsuruoka, T. Nida, *The Journal of antibiotics* **1966**, *19*, 288-292.
- [25] aR. J. Marles, N. R. Farnsworth, *Phytomedicine* **1995**, *2*, 137-189; bK. Nakagawa, K. Ogawa, O. Higuchi, T. Kimura, T. Miyazawa, M. Hori, *Anal. Biochem.* **2010**, *404*, 217-222.
- [26] N. Asano, K. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 243-255.
- [27] M. Kimura, F.-j. Chen, N. Nakashima, I. Kimura, N. Asano, S. Koya, *J. Tradit. Med.* **1995**, *12*, 214-219.
- [28] N. Asano, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 471-484.
- [29] aL. J. Scott, C. M. Spencer, *Drugs* **2000**, *59*, 521-549; bH. Paulsen, K. Todt, in *Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. Volume 23* (Eds.: L. W. Melville, R. S. Tipson), Academic Press, **1968**, pp. 115-232.
- [30] A. Mitrakou, N. Tountas, A. E. Raptis, R. J. Bauer, H. Schulz, S. A. Raptis, *Diabet Med* **1998**, *15*, 657-660.
- [31] B. G. Winchester, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 645-651.
- [32] G. Horne, F. X. Wilson, in *Prog. Med. Chem., Vol. Volume 50* (Eds.: G. Lawton, D. R. Witty), Elsevier, **2011**, pp. 135-176.
- [33] E. D. Faber, R. Oosting, J. J. Neefjes, H. L. Ploegh, D. K. F. Meijer, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1442-1450.
- [34] V. T. Samuel, G. I. Shulman, *Cell* **2012**, *148*, 852-871.
- [35] al. Hillebrand, *Diabet Med* **1987**, *4*, 147-150; bH. E. Lebovitz, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **1997**, *26*, 539-551; cH. E. Lebovitz, *Medical Clinics of North America* **2004**, *88*, 847-863; dA. J. Krentz, C. J. Bailey, *Drugs* **2005**, *65*, 385-411.
- [36] aT. Latsis, B. Andersen, L. Agius, *The Biochemical journal* **2002**, *368*, 309-316; bC. Kuriyama, O. Kamiyama, K. Ikeda, F. Sanae, A. Kato, I. Adachi, T. Imahori, H. Takahata, T. Okamoto, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7330-7336; cY. Minami, C. Kuriyama, K. Ikeda, A. Kato, K. Takebayashi, I. Adachi, G. W. J. Fleet, A. Kettawan, T. Okamoto, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2734-2740;

- dN. G. Oikonomakos, C. Tiraidis, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, M. Kristiansen, C. U. Jessen, L. Norskov-Lauritsen, L. Agius, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5687-5701;
- eL. Somsak, K. Czifrak, M. Toth, E. Bokor, E. D. Chrysina, K. M. Alexacou, J. M. Hayes, C. Tiraidis, E. Lazoura, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos, *Current Medicinal Chemistry* **2008**, *15*, 2933-2983; fK. Fosgerau, N. Westergaard, B. Quistorff, N. Grunnet, M. Kristiansen, K. Lundgren, *Archiv. Biochem. Biophys.* **2000**, *380*, 274-284.
- [37] D. M. Arble, D. A. Sandoval, *Frontiers in Neuroscience* **2013**, *7*.
- [38] aN. Asano, T. Yamauchi, K. Kagamifuchi, N. Shimizu, S. Takahashi, H. Takatsuka, K. Ikeda, H. Kizu, W. Chuakul, A. Kettawan, T. Okamoto, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1238-1242; bE. Standl, O. Schnell, *Diab Vasc Dis Res* **2012**, *9*, 163-169.
- [39] D. D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, L. M<sup>√</sup>oller, W. Wingender, E. Truscheit, D. Sch<sup>√</sup> § fer, *Die Naturwissenschaften* **1977**, *64*, 535-536.
- [40] Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, M. Takeuchi, T. Yamaguchi, K. Matsui, S. Horii, H. Fukase, *J Antibiot (Tokyo)* **1984**, *37*, 1301-1307.
- [41] S. Horii, H. Fukase, T. Matsuo, Y. Kameda, N. Asano, K. Matsui, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046.
- [42] H. Nojima, I. Kimura, F.-j. Chen, Y. Sugihara, M. Haruno, A. Kato, N. Asano, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 397-400.
- [43] W.-H. Kong, S.-H. Oh, Y.-R. Ahn, K.-W. Kim, J.-H. Kim, S.-W. Seo, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2613-2619.
- [44] H. Bischoff, *Eur J Clin Invest* **1994**, *24 Suppl 3*, 3-10.
- [45] B. Göke, H. Fuder, G. Wieckhorst, U. Theiss, E. Stridde, T. Littke, P. Kleist, R. Arnold, P. W. Lücker, *Digestion* **1995**, *56*, 493-501.
- [46] E. Standl, G. Schernthaner, J. Rybka, M. Hanefeld, S. A. Raptis, L. Naditch, *Diabetes Research and Clinical Practice* **2001**, *51*, 205-213.
- [47] G. Derosa, P. Maffioli, *Arch Med Sci* **2012**, *8*, 899-906.
- [48] L. V. Hooper, T. Midtvedt, J. I. Gordon, *Annual Review of Nutrition* **2002**, *22*, 283-307.
- [49] R. E. Ley, F. B<sup>√</sup> § ckhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, J. I. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11070-11075.

- [50] C. B. de La Serre, C. L. Ellis, J. Lee, A. L. Hartman, J. C. Rutledge, H. E. Raybould, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **2010**, *299*, G440-G448.
- [51] C. L. J. Karlsson, G. r. Molin, F. F $\sqrt{\cdot}$ k, M.-L. Johansson Hagsl $\sqrt{\text{§}}$ tt, M. Jakešević, Ö. H $\sqrt{\cdot}$ kansson, B. Jeppsson, B. r. Westr $\sqrt{\partial}$ m, S. Ahrn $\sqrt{\text{©}}$ , *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 887-895.
- [52] M. Koyama, S. Sakamura, *Agr. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1111-1112.
- [53] A. Kato, N. Asano, H. Kizu, K. Matsui, A. A. Watson, R. J. Nash, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 312-314.
- [54] J. A. Castillo, J. Calveras, J. Casas, M. Mitjans, M. P. Vinardell, T. Parella, T. Inoue, G. A. Sprenger, J. Joglar, P. Clapés, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6067-6070.
- [55] S. Amézqueta, E. Galan, E. Fuguet, M. Carrascal, J. Abian, J. L. Torres, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, *402*, 1953-1960.
- [56] J. M. Kawa, C. G. Taylor, R. Przybylski, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7287-7291.
- [57] J. Tiralongo, A. P. Moran, *Microbial Glycobiology* **2009**, 551-565.
- [58] V. M. Lakhtin, M. V. Lakhtin, V. V. Pospelova, B. A. Shenderov, *Microbial Ecology in Health and Disease* **2006**, *18*, 55-60.
- [59] L. Gomez, E. Molinar-Toribio, M. A. Calvo-Torras, C. Adelantado, M. E. Juan, J. M. Planas, X. Canas, C. Lozano, S. Pumarola, P. Clapes, J. L. Torres, *The British journal of nutrition* **2012**, *107*, 1739-1746.
- [60] S. Amézqueta, E. Gal $\sqrt{\text{°}}$ n, I. Vila, S. Pumarola, M. Carrascal, J. Abian, L. Ribas-Barba, L. s. Serra-Majem, J. L. s. Torres, *Food Chem.*
- [61] aJ. R. Nash, E. A. Bell, J. M. Williams, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1620-1622; bD. W. C. Jones, R. J. Nash, E. A. Bell, J. M. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3125-3126.
- [62] aN. Asano, K. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 243-255; bN. Asano, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 235-245.
- [63] J. P. Saludes, S. C. Lievens, T. F. Molinski, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 436-438.
- [64] A. M. Scofield, L. E. Fellows, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *Life Sci.* **1986**, *39*, 645-650.
- [65] T. Oku, M. Yamada, M. Nakamura, N. Sadamori, S. Nakamura, *The British journal of nutrition* **2006**, *95*, 933-938.

- [66] L. Gomez, X. Garrabou, J. Joglar, J. Bujons, T. Parella, C. Vilaplana, P. J. Cardona, P. Clapes, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6309-6321.
- [67] I. Pastuszak, R. J. Molyneux, L. F. James, A. D. Elbein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1886-1891.
- [68] X. Garrabou, L. Gomez, J. Joglar, S. Gil, T. Parella, J. Bujons, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10691-10706.
- [69] A. B. Walls, H. M. Sickmann, A. Brown, S. D. Bouman, B. Ransom, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen, *J. Neurochem.* **2008**, *10*, 1-9.
- [70] B. Andersen, A. Rassov, N. Westergaard, K. Lundgren, *Biochem. J.* **1999**, *342*, 545-550.
- [71] T. M. Wrodnigg, F. K. Sprenger, *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 437-459.
- [72] R. Lucas, P. Balbuena, J. C. Errey, M. A. Squire, S. S. Gurcha, M. McNeil, G. S. Besra, B. G. Davis, *Chembiochem* **2008**, *9*, 2197-2199.
- [73] D. E. Minnikin, *Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and role The biology of the mycobacteria*, **1982**.
- [74] P. J. Brennan, *Tuberculosis* **2003**, *83*, 91-97.
- [75] F. E. Umesiri, A. K. Sanki, J. Boucau, D. R. Ronning, S. J. Sucheck, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 290-326.
- [76] *Tuberculosis* **2008**, *88*, 112-116.
- [77] J. P. Shilvock, J. R. Wheatley, R. J. Nash, A. A. Watson, R. C. Griffiths, T. D. Butters, M. Muller, D. J. Watkin, D. A. Winkler, G. W. J. Fleet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2735-2745.
- [78] H. J. Jeong, Y. B. Ryu, S. J. Park, J. H. Kim, H. J. Kwon, K. H. Park, M. C. Rho, W. S. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6816-6823.
- [79] M. M. Fuster, J. D. Esko, *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 526-542.
- [80] T. M. Wrodnigg, A. J. Steiner, B. J. Ueberbacher, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 77-85.
- [81] aP. E. Goss, M. A. Baker, J. P. Carver, J. W. Dennis, *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 935-944; bM. J. Humphries, K. Matsumoto, S. L. White, K. Olden, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 5215-5222.
- [82] D. J. Becker, J. B. Lowe, *Glycobiology* **2003**, *13*, 41R-53R.

- [83] L. Qiao, B. W. Murray, M. Shimazaki, J. Schultz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7653-7662.
- [84] C.-H. Wong, D. P. Dumas, Y. Ichikawa, K. Koseki, S. J. Danishefsky, B. W. Weston, J. B. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7321-7322.
- [85] G. Sulzenbacher, C. Bignon, T. Nishimura, C. A. Tarling, S. G. Withers, B. Henrissat, Y. Bourne, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13119-13128.
- [86] M. Padró, J. Castillo, L. Gómez, J. Joglar, P. Clapés, C. de Bolós, *Glycoconjugate J.* **2010**, *27*, 277-285.
- [87] P. Clapés, X. Garrabou, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2263-2283.
- [88] M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11055-11061.
- [89] aM. Gutierrez, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapés, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5762-5764; bX. Garrabou, J. Calveras, J. Joglar, T. Parella, J. Bujons, P. Clapes, *Org. Biomol. Chem.* **2011**.
- [90] A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3808-3816.
- [91] L. Espelt, J. Bujons, T. Parella, J. Calveras, J. Joglar, A. Delgado, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1392-1401.
- [92] J. Calveras, M. Egido-Gabás, L. Gómez, J. Casas, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7310-7328.
- [93] aL. Espelt, T. Parella, J. Bujons, C. Solans, J. Joglar, A. Delgado, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4887-4899; bJ. Calveras, J. Casas, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1661-1666.
- [94] aS. Howard, C. Braun, J. McCarter, K. W. Moremen, Y. F. Liao, S. G. Withers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *238*, 896-898; bA. E. Stutz, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [95] P. Compain, O. R. Martin, Editors, *From Synthesis Iminosugars to Therapeutic Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Sussex, England, **2007**.
- [96] R. A. Copeland, Editor, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists*, **2005**.
- [97] N. Asano, K. Ikeda, L. Yu, A. Kato, K. Takebayashi, I. Adachi, I. Kato, H. Ouchi, H. Takahata, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 223-229.

- [98] A. L. Concia, L. Gomez, J. Bujons, T. Parella, C. Vilaplana, P. J. Cardona, J. Joglar, P. Clapes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2005-2021.
- [99] N. Asano, in *Iminosugars*, John Wiley & Sons, Ltd, **2008**, pp. 7-24.
- [100] C. Y. Yu, N. Asano, K. Ikeda, M. X. Wang, T. D. Butters, M. R. Wormald, R. A. Dwek, A. L. Winters, R. J. Nash, G. W. Fleet, *Chem. Commun.* **2004**, 1936-1937.
- [101] T. M. Chapman, S. Courtney, P. Hay, B. G. Davis, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3397-3414.
- [102] J. H. Kim, M. J. Curtis-Long, W. D. Seo, J. H. Lee, B. W. Lee, Y. J. Yoon, K. Y. Kang, K. H. Park, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4282-4285.
- [103] Z. Cui, Y. Maruyama, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata, *J. Mol. Biol.* **2007**, *374*, 384-398.
- [104] aH. Fiaux, F. Popowycz, S. Favre, C. Schutz, P. Vogel, S. Gerber-Lemaire, L. Juillerat-Jeanneret, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4237-4246; bS. P. Kawatkar, D. A. Kuntz, R. J. Woods, D. R. Rose, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8310-8319.
- [105] E. Moreno-Clavijo, A. T. Carmona, Y. Vera-Ayoso, A. J. Moreno-Vargas, C. Bello, P. Vogel, I. Robina, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1192-1202.
- [106] N. Asano, K. Yasuda, H. Kizu, A. Kato, J.-Q. Fan, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, R. J. Molyneux, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 35-41.
- [107] E. J. Hembre, W. H. Pearson, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11021-11032.
- [108] P. S. Liu, R. S. Rogers, M. S. Kang, P. S. Sunkara, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5853-5856.
- [109] A. Dahlqvist, *Anal. Biochem.* **1964**, *7*, 18-25.
- [110] M. Cho, J. H. Han, S. You, *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44*, 1164-1171.
- [111] aT. Yamashita, K. Yasuda, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, N. Asano, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1875-1881; bN. Asano, H. Kuroi, K. Ikeda, H. Kizu, Y. Kameda, A. Kato, I. Adachi, A. A. Watson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1-8; cR. J. Nash, L. E. Fellows, J. V. Dring, G. W. J. Fleet, A. Girdhar, N. G. Ramsden, J. M. Peach, M. P. Hegarty, A. M. Scofield, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 111-114; dA. Kato, I. Adachi, M. Miyauchi, K. Ikeda, T. Komae, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash, M. R. Wormald,

- Carbohydr. Res.* **1999**, *316*, 95-103; eR. J. Nash, L. E. Fellows, J. V. Dring, G. W. J. Fleet, A. E. Derome, T. A. Hamor, A. M. Scofield, D. J. Watkin, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2487-2490.
- [112] A. Brandi, S. Cicchi, F. M. Cordero, R. Frignoli, A. Goti, S. Picasso, P. Vogel, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6806-6812.
- [113] S. Frantz, L. Calvillo, J. Tillmanns, I. Elbing, C. Dienesch, H. Bischoff, G. Ertl, J. Bauersachs, *The FASEB Journal* **2005**, *19*, 591-593.
- [114] M. Joubert, A. Defoin, C. Tarnus, J. Streith, *Synlett* **2000**, 1366-1368.
- [115] N. Asano, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2009**, *66*, 1479-1492.
- [116] E. A. Lee, S. L. Weiss, M. Lam, R. Torres, J. Diamond, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 2111-2116.
- [117] L. Gómez, E. Molinar-Toribio, M. Á. Calvo-Torras, C. Adelantado, M. E. Juan, J. M. Planas, X. Cañas, C. Lozano, S. Pumarola, P. Clapés, J. L. Torres, *Br. J. Nutr., FirstView*, 1-8.
- [118] R. A. DeFronzo, R. C. Bonadonna, E. Ferrannini, *Diabetes Care* **1992**, *15*, 318-368.
- [119] J. L. Martin, K. Veluraja, K. Ross, L. N. Johnson, G. W. J. Fleet, N. G. Ramsden, I. Bruce, M. G. Orchard, N. G. Oikonomakos, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10101-10116.
- [120] P. Jakobsen, J. M. Lundbeck, M. Kristiansen, J. Breinholt, H. Demuth, J. Pawlas, M. P. T. Candela, B. Andersen, N. Westergaard, K. Lundgren, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 733-744.
- [121] J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720-2722.
- [122] J. P. Shilvock, J. R. Wheatley, B. Davis, R. J. Nash, R. C. Griffiths, M. G. Jones, M. Muller, S. Crook, D. J. Watkin, C. Smith, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8569-8572.
- [123] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [124] A. Hem, A. J. Smith, P. Solberg, *Laboratory animals* **1998**, *32*, 364-368.
- [125] N. Asano, A. Kato, M. Miyauchi, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 625-628.

## 7. PUBLICACIONES

---





## Chemo-enzymatic synthesis and glycosidase inhibitory properties of DAB and LAB derivatives†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 2005Alda Lisa Concia,<sup>a</sup> Livia Gómez,<sup>a</sup> Jordi Bujons,<sup>a</sup> Teodor Parella,<sup>b</sup> Cristina Vilaplana,<sup>c</sup> Pere Joan Cardona,<sup>c</sup> Jesús Joglar<sup>a</sup> and Pere Clapés\*<sup>a</sup>

A chemo-enzymatic strategy for the preparation of 2-aminomethyl derivatives of (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (also called 1,4-dideoxy-1,4-imino-*D*-arabinitol, DAB) and its enantiomer LAB is presented. The synthesis is based on the enzymatic preparation of DAB and LAB followed by the chemical modification of their hydroxymethyl functionality to afford diverse 2-aminomethyl derivatives. This strategy leads to novel aromatic, aminoalcohol and 2-oxopiperazine DAB and LAB derivatives. The compounds were preliminarily explored as inhibitors of a panel of commercial glycosidases, rat intestinal disaccharidases and against *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis. It was found that the inhibitory profile of the new products differed considerably from the parent DAB and LAB. Furthermore, some of them were active inhibiting the growth of *M. tuberculosis*.

Received 3rd December 2012,  
Accepted 24th January 2013

DOI: 10.1039/c3ob27343a

www.rsc.org/obc

## 1. Introduction

Polyhydroxylated pyrrolizidine 2-aminomethyl derivatives of (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (also called 1,4-dideoxy-1,4-imino-*D*-arabinitol, DAB) (**1**),<sup>1</sup> isolated from *Arachniodes standishii* and *Angylocaelyx boutiqueanus*,<sup>2</sup> as well as from marine sponges,<sup>3</sup> and its corresponding enantiomer LAB (**2**), are interesting iminocyclitols for their structural simplicity and exceptional biological activity.<sup>4</sup> They show a strong inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidases from different sources<sup>5–7</sup> as well as on mice and rat intestinal glycosidases.<sup>7,8</sup> DAB is also a potent inhibitor of glycogen phosphorylase<sup>9</sup> and mulberry leaf extracts containing DAB have also been shown to possess an antihyperglycemic effect on streptozocin (STZ)-induced diabetic mice.<sup>10</sup> The activity regulation of glycogen-degrading enzymes in addition to the reduction of the postprandial glycaemia in blood makes DAB and LAB promising therapeutic agents for the prevention and treatment of type-II diabetes,<sup>11,12</sup> and the metabolic syndrome associated to hypercaloric diets.<sup>12–14</sup>

Structural modification of DAB and LAB has led to novel derivatives with unprecedented activities and selectivities. For instance, preliminary experiments suggest that 1,4-dideoxy-2-hydroxymethyl-1,4-imino-*L*-threitol (**3**, Fig. 1) may have a role in the mechanism of chaperoning the folding of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).<sup>15</sup> 2-Acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-*L*-arabinitol (**4**) and its *N*-benzyl derivative (**5**) were found to be potent non-competitive inhibitors of *D*-hexosaminidase, that may lead to new strategies for the treatment of diseases such as cancer, arteriosclerosis and some lysosomal storage diseases, such as Tay-Sachs or Sandhoff diseases.<sup>16</sup> Moreover, it has been reported that modification of the hydroxymethyl moiety to generate 3,4-dihydroxypyrrrolidin-2-yl (**6**) derivatives with different stereochemistries at positions 2, 3 and 4 has been performed, furnishing potent inhibitors of  $\alpha$ -mannosidases.<sup>17–19</sup>

It was found that (2*R*,3*R*,4*S*)- and (2*S*,3*R*,4*S*)-2-aminomethylpyrrolidine-3,4-diol derivatives (**7**, **8**, Fig. 1) with aromatic

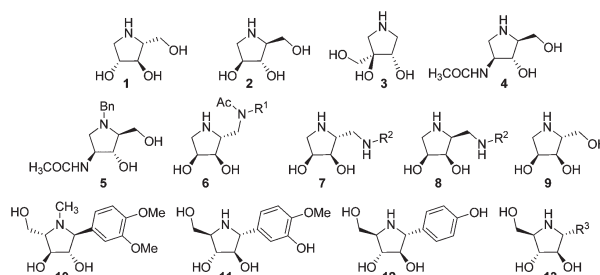


Fig. 1 Structures of biologically active pyrrolidine derivatives.

<sup>a</sup>Dept Química Biológica y Modelización Molecular, Instituto de Química Avanzada de Cataluña, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

E-mail: pere.clapes@iqac.csic.es

<sup>b</sup>Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain<sup>c</sup>Unitat de Tuberculosi Experimental, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERES, Edifici Laboratori de Recerca, Crtra. de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, 08916, Badalona, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ob27343a

moieties lead to potent and selective competitive inhibitors of  $\alpha$ -D-mannosidase from jack beans and from almonds.<sup>18</sup> The parent iminocyclitol, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol (**9**), with the two vicinal *cis*-oriented hydroxyl groups mandatory for effective inhibition, already possessed inhibitory activity against mannosidase.<sup>20</sup> Furthermore, a class of polyhydroxylated pyrrolidine derivatives were uncovered, namely codonopsinol<sup>21</sup> (**10**) and radicamines A (**11**) and B (**12**) isolated from *Codonopsis clematidea* and *Lobelia chinensis* Lour, respectively,<sup>22</sup> in which an aryl moiety is directly attached to the C-2 position of the pyrrolidine ring (**13**) (Fig. 1). These compounds were found to be inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase at the micromolar range.<sup>23</sup>

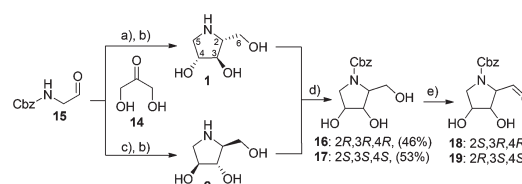
Inspired by these results we envisaged that modifications of DAB and LAB iminocyclitols may improve their inhibitory profiles in terms of potency and/or selectivity. Following our ongoing research program to develop new chemo-enzymatic methods for the synthesis of iminocyclitols as potential inhibitors of digestive glycosidases that decrease the post-prandial glycaemia,<sup>7,14,24</sup> we explored new derivatives with potential application in this field. Hence, it was regarded as interesting and significant to investigate on the synthesis and preliminary inhibitory properties of new 2-aminomethyl derivatives of DAB and LAB. Towards this end, a chemo-enzymatic strategy was envisaged to modify the hydroxymethyl functionality on DAB and LAB iminocyclitols with different aminomethyl moieties from aromatic amines, aminoalcohols or amino acid derivatives. Moreover, piperazines and their keto analogues, such as 2-oxopiperazines, have been recognized amongst the most important scaffolds in medicinal chemistry and drug discovery industries.<sup>25–27</sup> This prompted us to study the conjugation of these two moieties to obtain iminocyclitol fused 2-oxopiperazine derivatives, namely hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one derivatives.

Preliminary exploration of the inhibitory properties of these compounds was directed towards commercial glycosidases and rat intestinal glycosidases. Moreover, the iminocyclitol derivatives active against  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens* were assayed as inhibitors of the growth of the H37Rv Pasteur *Mycobacterium tuberculosis* strain, the causative agent of tuberculosis.<sup>28</sup>

## 2. Results and discussion

### 2.1 Synthesis

We envisaged that aldehydes **18** and **19** could be the most straightforward key intermediates to generate a collection of (2*R*,3*R*,4*R*)- and (2*S*,3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxypyrrrolidin-2-yl derivatives (Scheme 1). We have recently developed a straightforward chemo-enzymatic asymmetric stereodivergent methodology for the expedient synthesis of **1** and **2** starting from simple and achiral materials such as dihydroxyacetone (**14**) and *N*-Cbz-glycinal (**15**) (Scheme 1).<sup>29,30</sup> In this work, we optimized the conditions to obtain, after the imino protection with the Cbz, the highly valuable **16** and **17** intermediates in 46% and 53%



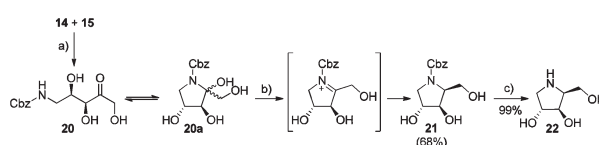
**Scheme 1** Chemo-enzymatic synthesis of DAB (**1**) and LAB (**2**) derivatives. (a) D-Fructose-6-phosphate aldolase (FSA) mutant A129S/A165G, (b) H<sub>2</sub> (50 psi) Pd/C, (c) L-rhamnulose-1-phosphate aldolase from *E. coli* (RhuA), 200 mM aqueous borate buffer, (d) Cbz-OSu, 1 : 1 dioxane–water, (e) iodoxybenzoic acid (IBX), AcOEt reflux. Isolated yields in parentheses. Compounds **18** and **19** were not isolated.

isolated yields, respectively, which compare favorably with other reported procedures (e.g., between 18–30% for the underivatized DAB and LAB).<sup>5,31</sup>

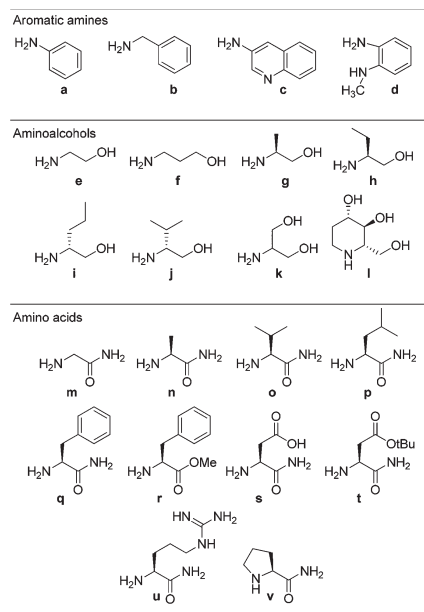
At this point we pursued a more efficient route that avoids removing and reintroducing the Cbz group. Therefore, we sought a potential new method to convert directly the aldol adduct into *N*-Cbz-protected DAB or LAB derivatives. In previous works we have observed that the products formed from the aldol addition of DHAP, DHA or glycolaldehyde to *N*-Cbz-aminoaldehydes consist of a mixture of acyclic and cyclic hemiaminal compounds in equilibrium (Scheme 2, **20–20a**).<sup>32,33</sup> The percentage of the hemiaminal was particularly significant for the five membered ring, owing to the minimal transition state strain energy for its formation as compared with other ring sizes.<sup>34</sup> Thus, we intended to perform a reductive dehydroxylation of the cyclic hemiaminal using the silane procedure in the presence of BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (Scheme 2).<sup>35</sup> The aldol adduct from the FSA catalyst was taken as an example. Interestingly, the reaction proceeded in 68% isolated yield; however, as ascertained by high field NMR data of the resulting iminocyclitol, the major configuration at C2 was opposite to that obtained with Pd/C with a 4 : 1 2*S* : 2*R* diastereomeric ratio. Hence, (2*S*,3*R*,4*R*)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (**22**) was obtained instead of **1**.

Remarkably, this result encompasses more general applicability in the chemo-enzymatic strategy for the synthesis of iminocyclitols, providing a useful potential stereocomplementary method for the reductive amination.

Following the synthetic plan, the hydroxymethyl group of **16** and **17** was selectively oxidized with iodoxybenzoic acid (IBX) to furnish aldehydes **18** and **19**, respectively (Scheme 1). With the aim to develop a straightforward methodology, these



**Scheme 2** Chemo-enzymatic synthesis of (2*S*,3*R*,4*R*)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol: (a) D-fructose-6-phosphate aldolase from *E. coli* mutant A129S/A165G, (b) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, and Et<sub>3</sub>SiH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> –78 °C to 0 °C, (c) H<sub>2</sub> (50 psi) Pd/C. Isolated yield in parentheses.



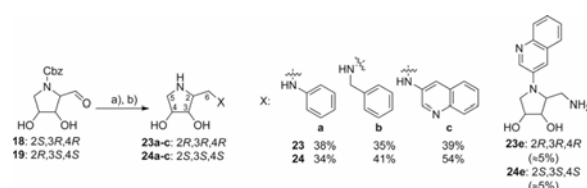
**Fig. 2** Amines used for the preparation of the 2-aminomethyl derivatives of compounds **1** and **2**.

aldehydes were readily used after evaporation of the solvent without the need for isolation and purification. Indeed, the aldehydes reacted with primary amines ( $R-NH_2$ , Fig. 2) in anhydrous methanol at 20 °C under acidic conditions (acetic acid, pH = 5.0), furnishing the corresponding imines that were reduced *in situ* with  $NaBH_3CN$ . Deprotection of the Cbz group by hydrogenolysis in the presence of Pd/C gave the corresponding 2-aminomethyl derivatives of compounds **1** and **2** (see the next sections).

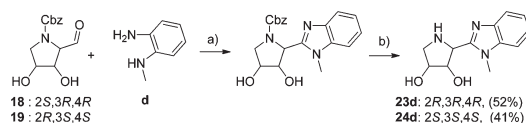
**DAB and LAB derivatives with aromatic amines.** The strategy depicted above worked for the selected aromatic amines **a**, **b** and **c**, which furnished derivatives **23a–c** and **24a–c** (Scheme 3) in 38–44% and 34–54% isolated yields, respectively.

Furthermore, unexpectedly (*2R,3R,4R*)- and (*2S,3S,4S*)-2-(aminomethyl)-1-(quinolin-3-yl)pyrrolidine-3,4-diol (**23e** and **24e**, respectively) were isolated (5%) after treatment of *N*-Cbz derivatives of **23c** and **24c** with  $H_2$  in the presence of Pd/C. These products were characterized and are described in the Experimental section and ESI.†

Expectedly, the reaction of the aldehydes **18** and **19** with *N*-methyl-1,2-phenylenediamine (**d**), in the presence of acetic



**Scheme 3** Synthesis and isolated yields of 2-aminomethyl aromatic derivatives **23** and **24**: (a) amines **a–c**,  $NaBH_3CN$ , AcOH, (b)  $H_2$  (22 psi) Pd/C. Structures of compounds **23e** and **24e**.



**Scheme 4** Synthesis of benzimidazole derivatives **23d** and **24d**: (a) AcOH at 25 °C, spontaneous oxidation; (b)  $H_2$  (22 psi), Pd/C. Isolated yields in parentheses.

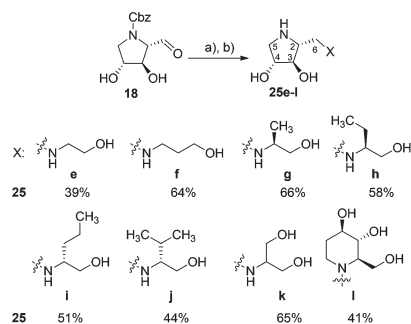
acid and  $O_2$ , gave the corresponding benzimidazole derivatives **23d** and **24d** in 52% and 41% isolated yields, respectively (Scheme 4).<sup>36</sup>

**DAB aminoalcohol conjugates.** In a similar line of thinking, DAB aminoalcohol conjugates were also considered. They can be regarded as analogues of 1,4-dideoxy-1,4-iminoalditols in which the corresponding polyhydroxyl chain is substituted by an aminoalcohol through a C–N bond.<sup>37</sup> Moreover, the introduction of different functionalities might increase the recognition sites of the molecule, improving its activity and selectivity.

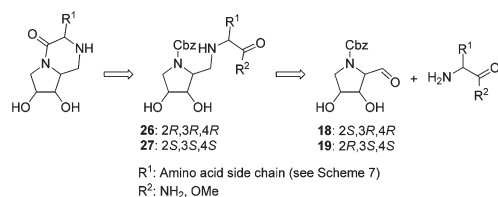
Following the devised strategy, aminoalcohols **e–k** provided the corresponding DAB conjugates (**25e–k**, Scheme 5) in 39–66% isolated yields. Secondary alcohols, *e.g.* *D*-fagomine (**l**), also reacted with the aldehyde affording the corresponding iminocyclitol conjugate (**25l**) in 41% isolated yield. It can be anticipated that an identical methodology can be followed to obtain the corresponding LAB conjugates.

The NMR analysis showed that for some conjugates a secondary product corresponding to the (*2S,3R,4R*)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol 2-aminoalcohol derivative (see ESI†) was identified. This resulted from epimer formation at C2 that probably occurred during imine generation. The amount varied depending on the aminoalcohol employed, *e.g.* 25 : 75 *2S* : *2R* **25e**, 1 : 9 *2S* : *2R* **25f**, 17 : 83 *2S* : *2R* **25g** and **25h**, though it was not observed for conjugates **25i–l**. Separation of epimer pairs was accomplished by cation exchange chromatography under conditions established in previous work (as an example see NMR spectra of purified compound **25g** in ESI†).<sup>24</sup>

**Amino acid conjugates: preparation of iminocyclitol fused 2-oxopiperazine derivatives.** By analogy to the general methodology described above, we envisaged that the aldehydes



**Scheme 5** Synthesis and isolated yields of DAB aminoalcohol conjugates. (a) Aminoalcohol **e–l**,  $NaBH_3CN$ , AcOH; (b)  $H_2$  (22 psi), Pd/C.

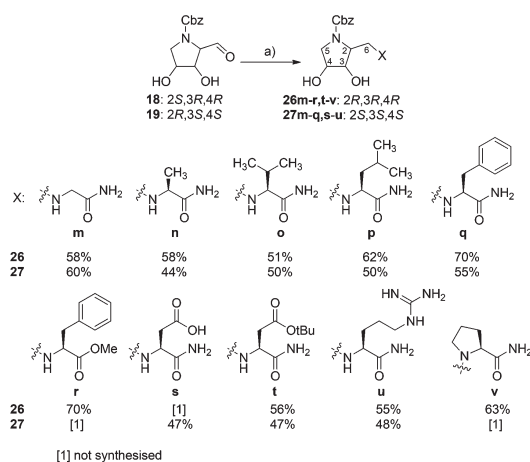


**Scheme 6** Synthetic strategy towards iminocyclitol fused 2-oxopiperazine derivatives.

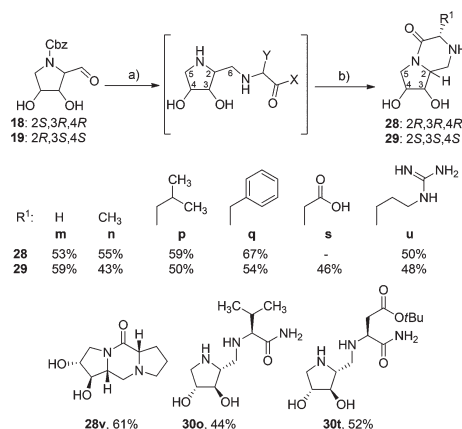
**18** and **19** can react with 1 equiv. of an amino acid to furnish the 2-aminomethyl DAB or LAB derivatives **26** and **27**, respectively. Then, using ideas stemming from peptide chemistry, intramolecular lactamization can be forced, after Cbz removal from **26** and **27**, by analogy with the undesired diketopiperazine formation that occurs during solid phase peptide synthesis (Scheme 6).<sup>26,38</sup>

Given the approach adumbrated above, the reaction between aldehydes **18** or **19** and 1 equiv. of the selected amino acid derivatives (Scheme 7) furnished the corresponding DAB (**26m-r**, **t-v**) or LAB (**27m-q**, **s-u**) conjugates. Amino acid amides (*i.e.*, amide derivatives from amino acids) gave good isolated yields (51–70%) and were the derivatives of choice. Amino acid esters (*i.e.*, ester derivatives from amino acids) were the most obvious selection but it was discouraging to find out that only phenylalanine methyl ester (**r**) was readily able to form the corresponding **26r** derivative. Furthermore, the  $\beta$ -carboxylate of the aspartic acid amide (**s**) must be protected (**t**) to make the reaction proceed towards the product **26t** (or **27t**).

The next step entailed the deprotection of the Cbz group and the lactamization (*i.e.* intramolecular aminolysis) to furnish the corresponding iminocyclitol fused 2-oxopiperazine moiety (Scheme 8). Thus, the glycineamide conjugate **26m** gave complete lactamization readily after the removal of the Cbz group at room temperature. The alaninamide and prolinamide



**Scheme 7** Synthesis and isolated yields of *N*-Cbz-DAB and -LAB amino acid amide and ester conjugates: (a) amino acids **m-v**,  $NaBH_3CN$ .



**Scheme 8** Synthesis and isolated yields of iminocyclitol fused 2-oxopiperazine **28** and **29** and amino acid conjugate derivatives **30o**, **t**. (a)  $H_2$  (22 psi), Pd/C; (b) cyclization at rt, 40 °C or 100 °C (see text).

conjugates **26n** and **26v**, respectively, needed 40 °C overnight to afford the complete reaction, whereas the rest required overnight heating at 100 °C. Attempted lactamization of the valinamide derivative **26o** failed under various reaction conditions, probably due to steric effects of the isopropyl group. The conjugate **26t** did not form the cyclic species under mild conditions, while a number of unidentified by-products appeared when it was heated at 100 °C. Removal of the  $\beta$ (*O*<sup>t</sup>Bu) group (**26s**) did not help the lactamization reaction, decomposing under the reflux conditions in water. The phenylalanine amide derivative **26q** furnished only 50% of the bicyclic product, whereas quantitative yields were obtained from the corresponding methyl ester derivative **26r**.

For the LAB derivatives, the cyclization was faster and Gly-NH<sub>2</sub> (**m**), Ala-NH<sub>2</sub> (**n**) and Leu-NH<sub>2</sub> (**p**) reacted at room temperature, readily after the removal of the Cbz protecting group. Derivatives from Phe-NH<sub>2</sub> (**q**), Asp-NH<sub>2</sub> (**s**) and Arg-NH<sub>2</sub> (**u**) partially cyclize at room temperature and the reaction was completed at 40 °C. The aspartic acid derivative, **27s**, gave the corresponding intramolecular product in quantitative yields whereas the corresponding *O*<sup>t</sup>Bu protected analogue (**27t**) did not react. Moreover, the Phe-NH<sub>2</sub> conjugate **27q** gave the corresponding 2-oxopiperazine-iminocyclitol derivative at 40 °C. Val (**o**) was the only derivative that did not perform the lactamization reaction.

These resulted in a new class of hexahydropyrrolo[1,2-*a*]-pyrazin-4(1*H*)-one derivatives (*i.e.* 2-oxopiperazine derivatives) that might be considered indolizidine analogues (Scheme 8).

## 2.2 Inhibitory activity

**Commercial glycosidases.** The DAB and LAB derivatives **23a-d**, **24a-d**, **25e-l**, **28**, **29** and **30** were screened as inhibitors against a panel of commercial glycosidases (Table 1) and rat intestinal disaccharidases, *i.e.* sucrase, lactase, threase and maltase (Table 2). The inhibitory activity was compared with that of the parent compounds **1** and **2**, measured in our laboratory in previous work.<sup>7</sup> The inhibitory profiles of the new

**Table 1** Activities, IC<sub>50</sub> (μM) and K<sub>i</sub> (μM) (in parentheses), of the compounds synthesized against commercial glycosidases<sup>a</sup>

Product	α-D-Glucosidase baker's yeast	α-D-Glucosidase rice	β-D-Glucosidase sweet almonds	β-D-Galactosidase bovine liver	α-L-Rhamnosidase <i>P. decumbens</i>	α-D-Mannosidase jack beans	α-L-Fucosidase bovine kidney
23a	n.i.	n.i.	370 ± 11 (215 ± 18) C	155 ± 19 (406 ± 128) NC, α = 1	n.i.	n.i.	n.i.
24a	40 ± 6 (44 ± 13) NC, α = 1	620 ± 29 (236 ± 61) C	n.i.	n.i.	15.6 ± 0.5 (38 ± 12) NC, α = 1	n.i.	n.i.
23b	n.i.	n.i.	832 ± 105 (338 ± 116) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
24b	136 ± 13 (208 ± 102) NC, α = 1	n.i.	38 ± 4 (41 ± 13) C	n.i.	274 ± 35 (699 ± 112) NC, α > 1	n.i.	n.i.
23c	165 ± 44 (170 ± 95) C	n.i.	n.i.	263 ± 50 (308 ± 55) NC, αα = 1	n.i.	n.i.	n.i.
24c	247 ± 26 (100 ± 66) NC, α = 1	n.i.	n.i.	n.i.	132 ± 31 (132 ± 27) C	n.i.	n.i.
24d	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	320 ± 130 (331 ± 19) NC, α = 1	n.i.	n.i.
25e	273 ± 31 (358 ± 52) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25f	158 ± 25 (153 ± 8) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25h	n.i.	n.i.	260 ± 100 (734 ± 19) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25i	4.6 ± 1.6 (2.1 ± 0.8) C	342 ± 90 (144 ± 90) C	150 ± 71 (223 ± 9) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25j	110 ± 13 (96 ± 10) NC α > 1	n.i.	460 ± 353 (561 ± 30) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25l	n.i.	466 ± 64 (186 ± 21) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
28n	n.i.	76 ± 19 (39 ± 2) NC α = 1	n.i.	1116 ± 28	n.i.	n.i.	n.i.
28p	9.2 ± 1.5 (7.1 ± 1.5) C	208 ± 23 (261 ± 29) C	285 ± 15 (394 ± 19) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
28u	n.i.	60 ± 19 (21 ± 7) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
29m	401 ± 35 (323 ± 65) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
29n	239 ± 9 (323 ± 64) NC α > 1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
29p	340 ± 25 (337 ± 84) NC α > 1	14 ± 2 (13 ± 2) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
29q	50 ± 14 (76 ± 8) UC	148 ± 50 (87 ± 25) C	n.i.	691 ± 86	174 ± 12 (103 ± 27) NC α = 1	n.i.	n.i.
29s	41 ± 8 (181 ± 24) UC	382 ± 41 (176 ± 4) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
29u	140 ± 44 (124 ± 13) NC α = 1	n.i.	n.i.	n.i.	709 ± 56	n.i.	n.i.

Table 1 (Contd.)

Product	$\alpha$ -D-Glucosidase baker's yeast	$\alpha$ -D-Glucosidase rice	$\beta$ -D-Glucosidase sweet almonds	$\beta$ -D-Galactosidase bovine liver	$\alpha$ -L-Rhamnosidase <i>P. decumbens</i>	$\alpha$ -D-Mannosidase jack beans	$\alpha$ -L-Fucosidase bovine kidney
<b>30o</b>	1.1 $\pm$ 0.1 (54 $\pm$ 20) NC $\alpha$ > 1	448 $\pm$ 214 (190 $\pm$ 33) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>30t</b>	3.9 $\pm$ 3.1 (16.7 $\pm$ 7.8) C	685 $\pm$ 110 (451 $\pm$ 170) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>1</b>	0.33 $\pm$ 0.02 (0.17 $\pm$ 0.01) C	218 $\pm$ 3 (104 $\pm$ 75) C	276 $\pm$ 25 (100 $\pm$ 64) C	n.i.	n.i.	286 $\pm$ 27 (111 $\pm$ 60) NC, $\alpha$ > 1	20 $\pm$ 1 (5 $\pm$ 1) C
<b>2</b>	1.8 $\pm$ 0.1 (0.8 $\pm$ 0.1) NC, $\alpha$ = 1	0.05 $\pm$ 0.01 (0.040 $\pm$ 0.003) NC, $\alpha$ > 1	685 $\pm$ 112 (1014 $\pm$ 81) NC, $\alpha$ > 1	n.i.	56 $\pm$ 5 (98 $\pm$ 5) NC, $\alpha$ = 1	n.i.	n.i.

<sup>a</sup> Data are means of triplicate experiments  $\pm$  standard error of the mean (SE). C: competitive inhibition. NC: noncompetitive inhibition. UC: uncompetitive inhibition.<sup>46</sup> n.i.: no inhibition, *i.e.* IC<sub>50</sub>  $\geq$  1 mM.

Table 2 Activities, IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M), of the compounds synthesized against rat intestinal saccharidases<sup>a</sup>

Product	Sucrase (3.91 $\pm$ 0.05 UI) <sup>b</sup> ( <i>n</i> = 2)	Lactase (0.85 $\pm$ 0.07 UI) <sup>b</sup> ( <i>n</i> = 2)	Maltase (26.89 $\pm$ 1.50 UI) <sup>b</sup> ( <i>n</i> = 2)
<b>23a</b>	318 $\pm$ 101	n.i.	n.i.
<b>24a</b>	538 $\pm$ 356	n.i.	n.i.
<b>23c</b>	739 $\pm$ 392	n.i.	n.i.
<b>24c</b>	321 $\pm$ 59	n.i.	n.i.
<b>24d</b>	173 $\pm$ 72	n.i.	n.i.
<b>25i</b>	99 $\pm$ 52	n.i.	77 $\pm$ 34
<b>28n</b>	57 $\pm$ 29	n.i.	119 $\pm$ 11
<b>28p</b>	320 $\pm$ 57	n.i.	304 $\pm$ 23
<b>28u</b>	77 $\pm$ 17	n.i.	151 $\pm$ 2
<b>29p</b>	19 $\pm$ 11	n.i.	56 $\pm$ 2
<b>29q</b>	174 $\pm$ 84	n.i.	263 $\pm$ 99
<b>29s</b>	342 $\pm$ 123	n.i.	n.i.
<b>1</b>	22 $\pm$ 12	140 $\pm$ 84	50 $\pm$ 36
<b>2</b>	0.29 $\pm$ 0.02	50 $\pm$ 36	0.2 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> The experiments were performed in triplicate for each set of saccharidases. Two sets of saccharidases from two different rats (*n* = 2) were used. IC<sub>50</sub>s are expressed as  $\mu$ M  $\pm$  standard error of the mean (SE).  
<sup>b</sup> 1 UI corresponds to 1  $\mu$ mol of glucose formation per hour at 37 °C in phosphate buffer, pH 6.8. UI ( $\mu$ mol substrate h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein); n.i. no inhibition, IC<sub>50</sub>  $\geq$  1 mM.

derivatives differ considerably from those of **1** and **2** (Table 1). Compounds **23d**, **25g**, **25k**, **28m**, **28q** and **28v** (not included in Table 1) were not inhibitors (*i.e.* IC<sub>50</sub>  $\geq$  1 mM) of any assayed glycosidase.

$\alpha$ -D-Glucosidase from baker's yeast and rice: The aromatic conjugates **23a-c** and **24a-d** have much lower inhibitory properties against  $\alpha$ -D-glucosidase from baker's yeast than the parent compounds DAB and LAB (Table 1). Only compound **24a** showed moderate non-competitive inhibition against this glucosidase. Among the rest of the derivatives, compounds **25i**, **28p**, and **30t** were the best competitive inhibitors of  $\alpha$ -D-glucosidase from baker's yeast with comparable activities. Compound **30o** was the best non-competitive inhibitor of this glucosidase. Although the structure of the substituent differs

considerably, all of them have a DAB configuration (see Schemes 6 and 8). The aromatic derivatives and aminoalcohol conjugates were mostly inactive against  $\alpha$ -D-glucosidase from rice. Among the fused 2-oxopiperazine iminocyclitol derivatives, compound **29p** was the best inhibitor, while **28n** and **28u** showed inhibitory properties comparable to the parent compound DAB.

$\beta$ -D-Glucosidase from sweet almonds: Compound **24b** was a moderate inhibitor of  $\beta$ -D-glucosidase from sweet almonds while the parent compound LAB and its enantiomer DAB were weak inhibitors of this glycosidase. The rest of the evaluated compounds had either weak activities or were completely inactive against this glycosidase.

$\beta$ -D-Galactosidase from bovine liver: Aromatic derivatives **23a**, **23c** and **24c** were weak inhibitors while the parent DAB and LAB were inactive towards this glycosidase. It appears that the presence of an aromatic moiety is necessary for the inhibitory activity.<sup>39,40</sup> Indeed, among the 2-oxopiperazine iminocyclitol fused derivatives only **29q**, derived from phenylalanine, showed some activity. The rest of the derivatives were not inhibitors of this glucosidase.

$\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Penicillium decumbens*: Among the aromatic substitutions only those with LAB configuration, **24a-d**, were moderately to weakly active against  $\alpha$ -L-rhamnosidase; consequently, the orientation of the hydroxyl groups and the amine moiety is a strong factor that determines the right interaction with the glycosidase. It has been suggested that the  $\alpha$ -L-rhamnosidase inhibition shown by some pyrrolidines can be rationalized in terms of stereochemical similarities with  $\alpha$ -L-rhamnose.<sup>40,41</sup> Thus, it is apparent that the stereochemistry of **24a-d** (2*S*,3*S*,4*S*) matches that of the rhamnose moiety at C-3, C-4 and C-5. This would place the 2-aryl containing substituent at the same location as the 5-methyl group of rhamnose. The best inhibitor was compound **24a** whose structure is similar to those reported by Chapman *et al.* (*e.g.* (2*S*,3*S*,4*S*)-2-benzylpyrrolidine-3,4-diol).<sup>40</sup> Moreover, Kim *et al.* also proposed a role as aglycone for hydrophobic substituents at the C-2 position of pyrrolidines.<sup>41</sup> This is consistent

with the absence of inhibitory properties of the aminoalcohol and 2-oxopiperazine derivatives, where basically non-aromatic moieties are present.

$\alpha$ -D-Mannosidase from jack beans and  $\alpha$ -L-fucosidase from bovine kidney: It appears that a *cis* arrangement of the hydroxyl groups at C-3 and C-4, which parallels that of the hydroxyl groups at C-2 and C-3 of  $\alpha$ -D-mannose and other known pyrrolidine inhibitors like mannostatin A, is a strong structural requirement for the inhibition of  $\alpha$ -D-mannosidase by pyrrolidine iminocyclitols.<sup>19,42,43</sup> The fact that the compounds synthesized do not match this C-3 and C-4 configuration is probably the reason for their inability to inhibit this glycosidase.

Similarly to  $\alpha$ -D-mannosidase,  $\alpha$ -L-fucosidase has also a strong stereochemical demanding active site.<sup>43</sup> Pyrrolidine derivatives with stereoconfiguration (3*S*,4*R*,5*S*) were reported as strong inhibitors of  $\alpha$ -L-fucosidase,<sup>43,44</sup> whereas diastereomeric analogues were usually moderate to weak inhibitors.<sup>45</sup> The derivatives obtained in the present work have (3*R*,4*R*) or (3*S*,4*S*) configuration, therefore they showed no inhibition activities.

**Intestinal disaccharide glycosidases.** Concerning their inhibitory properties against intestinal disaccharide glycosidases, **23a**, **23c**, **24a**, **24c** and **24d** were weak inhibitors of sucrase while the parent compounds DAB and LAB were moderate to strong inhibitors of this glycosidase (Table 2). Moreover, the LAB derivatives **24a–d** lost the strong inhibitory activity against maltase. Among the aminoalcohol derivatives only compound **25i** showed inhibitory activity against sucrase and maltase. Concerning the iminocyclitol fused 2-oxopiperazine derivatives, it is remarkable the activity of **29p** against sucrase and maltase, which is comparable to the DAB compound, but with no inhibitory activity against lactase. This compound was also the best against  $\alpha$ -D-glucosidase from rice. The rest of the compounds showed moderate to weak activity on both sucrase and maltase. Interestingly, no inhibitory activity was observed against lactase for the compounds under study.

**Inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv laboratory strain.** It has been suggested that the iminocyclitol derivatives which are inhibitors of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *P. decumbens* could have the ability to inhibit dTDP-L-rhamnose biosynthesis on *M. tuberculosis*, and therefore constitute potential chemotherapeutic agents for tuberculosis.<sup>28</sup> The inhibitors of  $\alpha$ -L-rhamnosidase found in this work were assayed in mycobacterial systems and the Minimum Inhibitory Concentration values (MIC; *i.e.* the lowest drug concentration that prevented the development of colour akin to the bacteria growth) were determined (Table 3). The lowest MIC values were obtained for compounds **23d**, **24b** and **24d**, whereas no significant differences relative to **1** and **2** were observed for the other compounds. This might indicate that the products are not acting on the target rhamnosidase processing enzymes of the cell wall. The standard compound isoniazid (MIC: 0.25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was evaluated as a positive control in this assay and it was consistent with the reported values for this product.<sup>47</sup>

**Table 3** Minimum inhibitory concentrations (mg mL<sup>-1</sup>) against the H37Rv Pasteur *M. tuberculosis* strain

Product	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )	Product	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )
<b>23a</b>	2.5	<b>24a</b>	2.5
<b>23b</b>	1.3	<b>24b</b>	0.31
<b>23c</b>	1.3	<b>24c</b>	2.5
<b>23d</b>	0.63	<b>24d</b>	0.63
<b>1</b>	2.5	<b>2</b>	2.5

### 3. Conclusions

An efficient chemo-enzymatic strategy for the synthesis of 2-aminomethyl derivatives of DAB (**1**) and LAB (**2**) was developed. The straightforward chemo-enzymatic access to iminocyclitols **1** and **2**, the use of mild and selective oxidation conditions with IBX, followed by a reductive amination step, provides easy access to a number of new derivatives with aromatic amines, aminoalcohols or amino acids, the latter leading to the formation of piperazine-iminocyclitol fused compounds. An alternative method to generate the Cbz-imino-sugar derivatives was tested that led to (2*S*,3*R*,4*R*)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol. This may open new possibilities for obtaining novel stereocomplementary derivative epimers at C-2 to those from **1** and **2**.

The inhibitory properties of the new **1** and **2** derivatives against the panel of commercial glycosidases and rat intestinal disaccharidases differed considerably from those of the parent compounds DAB and LAB. The aromatic aminomethyl derivatives **23** and **24** are moderate to good inhibitors of  $\alpha$ -L-rhamnosidase. Particularly **24a** has better inhibitory properties than its parent LAB. Aromatic derivatives **23a–d** and **24a–d** were found to be moderate inhibitors of the growth of *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain, the causative agent of tuberculosis. However, the inhibitory pattern could not be correlated with the activity observed against  $\alpha$ -L-rhamnosidase. The aminoalcohol, amino acid and oxopiperazine derivatives are selective inhibitors of  $\alpha$ -D-glucosidases, particularly **25i** and **30t** were selective towards  $\alpha$ -D-glucosidase from baker's yeast. Concerning the intestinal disaccharide glycosidases it is remarkable that the derivatives are selective for sucrase and maltase and completely devoid of activity against rat intestinal lactase. Particularly **29p** has inhibitory activity against sucrase and maltase comparable to DAB, but it does not inhibit lactase.

### Experimental

(2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-Benzyloxycarbonyl-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (**16**). FSA A165G (150 U, 150 mg, 1.06 U mg<sup>-1</sup>) and dihydroxyacetone DHA (1.3 g, 14.5 mmol) were dissolved in 0.1 M triethanolamine buffer, pH 7.0 (135 mL). This solution was added to *N*-Cbz-glycinal (2.25 g, 11.6 mmol) dissolved in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 15 mL) and the mixture was shaken at 25 °C. After 24 h (99% conversion) the crude was



diluted with H<sub>2</sub>O up to a volume of 150 mL and loaded onto a glass column (5 cm diameter × 20 cm length, volume 400 mL) packed with the Amberlite™ XAD™ 16 (Rohm and Haas) stationary phase, which was previously equilibrated with H<sub>2</sub>O. After loading, the column was washed with H<sub>2</sub>O (800 mL, 2 column volumes). This step removed efficiently the enzyme, the excess of DHA and the salts. The aldol adduct was then eluted with 2 : 3 H<sub>2</sub>O–EtOH (800 mL, 2 column volumes). The fractions containing the product were pooled and the solvent reduced to about 300 mL in vacuum. The aqueous residue was diluted with EtOH (200 mL). The solution was divided into two batches (250 mL) and each one was treated overnight with H<sub>2</sub> (50 psi) in the presence of Pd/C (0.4 g, 10% Pd). The catalyst was removed by filtration and EtOH–water was evaporated in vacuum. NMR data and physical properties matched those already published using the same methodology.<sup>29,33</sup> The aqueous solution (200 mL) was diluted with 1,4-dioxane (200 mL) and solid NaHCO<sub>3</sub> (1.9 g, 23.2 mmol) was added under stirring. After cooling to 0 °C, benzyl chloroformate (1.8 mL, 12.7 mmol) was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and it was stirred overnight. Dioxane was removed under vacuum, the aqueous residue was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (100 mL) and the product extracted with ethyl acetate (4 × 150 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuum. The crude material was purified by flash column chromatography on silica (from 100 : 0 to 9 : 1 EtOAc–MeOH) to yield the title compound (1.4 g, 46% yield). HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 40 min; *t*<sub>R</sub> = 14.5 min, 98% purity by HPLC.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -28.0$  (*c* 1.0 in MeOH) (lit.,<sup>48</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -28.9$  (*c* 1.9 in MeOH); lit.,<sup>5</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -29.7$  (*c* 0.3 in MeOH)). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.32 (m, 5H, arom), 5.13 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.17 (s, 1H, H-3), 4.12 (s, 1H H-3-rotamer), 4.04 (br s, 1H, H-4), 3.82 (m, 4H, H-2-H-5-H-6-H-6'), 3.38 (m, 1H, H-5') (complex spectrum due to the existence of rotamers as described also by Fleet and Smith<sup>5</sup>). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  157.3 (C=O), 157.1 (C=O rotamer), 138.0 (C-Ar), 137.9 (C-Ar rotamer), 129.5 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 79.4 (C-3), 78.7 (C-3 rotamer), 76.2 (C-4), 75.6 (C-4 rotamer), 68.6 (C-2), 68.3 (C-2 rotamer), 68.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 68.0 (CH<sub>2</sub>Ph rotamer), 61.8 (C-6), 61.6 (C-6 rotamer), 54.8 (C-5), 54.4 (C-5 rotamer).

(2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-Benzyloxycarbonyl-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (17). RhuA (400 U, 32 mL of NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> suspension, 0.35 mg protein mL<sup>-1</sup>, 12.5 U mL<sup>-1</sup>) and dihydroxyacetone (DHA) (1.35 g, 15 mmol) were dissolved in sodium borate (0.25 M, pH 7.0 (160 mL)). This solution was added to *N*-Cbz-glycinal (2.33 g, 12 mmol) dissolved in DMF (40 mL) and the mixture was shaken at 25 °C. After 24 h (90% conversion) the crude was diluted with H<sub>2</sub>O up to a volume of 200 mL and loaded onto a glass column packed with Amberlite™ XAD™ 16 (Rohm and Haas) following an identical procedure to the one described above with minor modifications. The aldol adduct was then eluted with 2 : 3 H<sub>2</sub>O–EtOH (1000 mL, 2.5 column volumes). The fractions containing the product were pooled and the solvent reduced to about 400 mL in vacuum.

The aqueous residue was diluted with EtOH (400 mL). The solution was divided into two batches (400 mL) and each one was treated overnight with H<sub>2</sub> (50 psi) in the presence of Pd/C (0.6 g, 10% Pd). The catalyst was removed by filtration and EtOH–water was evaporated in vacuum. NMR data and physical properties matched those already published using the same methodology.<sup>30</sup> The aqueous solution (*ca.* 150 mL) was diluted with 1,4-dioxane (150 mL) and solid NaHCO<sub>3</sub> (1.8 g, 21.6 mmol) was added under stirring. After cooling to 0 °C, benzyl chloroformate (1.7 mL, 11.8 mmol) was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and it was stirred overnight. Dioxane was removed under vacuum, the aqueous residue was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (100 mL) and the product extracted with ethyl acetate (4 × 150 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuum. The crude material was purified by flash column chromatography on silica (from 100 : 0 to 9 : 1 EtOAc–MeOH) to yield the title compound (1.73 g, 53% yield, 98% purity by HPLC).  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +25.0$  (*c* 1.2 in MeOH). HPLC retention time and NMR data were identical to those of DAB.

(2*S*,3*R*,4*R*)-2-(Hydroxymethyl)pyrrolidine-3,4-diol (also called 1,4-dideoxy-1,4-imino-*L*-xylitol) (22). The aldol adduct (500 mg, 1.77 mmol) obtained from the aldol addition of DHA to *N*-Cbz-glycinal catalysed by *D*-fructose-6-phosphate aldolase mutant A165G (see above) was dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL) and cooled down to 0 °C. A solution of BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (0.22 mL, 1.77 mmol, 1 equiv.) and subsequently Et<sub>3</sub>SiH (0.57 mL, 3.54 mmol, 2 equiv.) were added under N<sub>2</sub> and the reaction mixture was left to reach room temperature under stirring. After 2 h the reaction was quenched to pH = 7 with saturated NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). The aqueous layer was diluted with brine (5 mL), and the mixture extracted with EtOAc, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (30 : 1 EtOAc–CH<sub>3</sub>OH) to give the corresponding Cbz protected derivative 21 as an oil (320 mg, 68% yield).  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +20.0$  (*c* 1.0 in MeOH). Purity 98% by HPLC. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 7.33 (m, 5H, arom), 5.14 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.14 (m, 2H, H-3-H-4), 3.89 (m, 3H, H-2-H-6-H-6'), 3.65 (m, 1H, H-5), 3.40 (m, 1H, H-5'). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 157.76 (C=O), 157.35 (C=O rotamer), 138.04 (C-Ar), 137.94 (C-Ar rotamer), 129.51 (C-Ar), 129.06 (2C-Ar), 128.86 (2C-Ar), 77.96 (C-3), 77.53 (C-3 rotamer), 75.21 (C-4), 74.86 (C-4 rotamer), 68.28 (CH<sub>2</sub>Ph), 68.15 (CH<sub>2</sub>Ph rotamer), 62.81 (C-2), 61.66 (C-2 rotamer), 60.85 (C-6), 60.27 (C-6 rotamer), 53.26 (C-5), 53.10 (C-5 rotamer). The presence of rotamers makes it difficult to obtain the relative stereochemistry. Moreover, some important signals were overlapped making it difficult to analyse the nOe experiments. Therefore it was decided to remove the Cbz group by treatment of a sample of the *N*-Cbz-1,4-dideoxy-1,4-imino-*L*-xylitol (40 mg, 0.14 mmol) with H<sub>2</sub> (22 psi) in the presence of Pd/C (20 mg). After removal of the Pd/C by filtration and lyophilisation, the title compound 22 (20 mg, 0.14 mmol) was obtained in quantitative yield. NMR and physical data matched those reported using other procedures.<sup>49,50</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -3.0$  (*c* 1.0 in H<sub>2</sub>O)

(lit.,<sup>49</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -4.0$  (*c* 0.10 in H<sub>2</sub>O); lit.,<sup>50</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -4.4$  (*c* 0.04 in CH<sub>3</sub>OH)). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 4.25$  (dt, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 1H, H-4), 4.20 (dd, *J* = 4.0, 1.7 Hz, 1H, H-3), 3.88 (dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 1H, H-6), 3.76 (dd, *J* = 11.5, 7.3 Hz, 1H, H-6'), 3.51 (ddd, *J* = 7.2, 6.1, 4.1 Hz, 1H, H-2), 3.41 (dd, *J* = 12.7, 5.0 Hz, 1H, H-5), 2.93 (dd, *J* = 12.8, 2.0 Hz, 1H, H-5'). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 76.14$  (C-4), 75.87 (C-3), 61.46 (C-2), 59.05 (C-6), 50.59 (C-5). HRMS (ESI-TOF): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> for C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> calculated 134.0817; observed 134.0819.

**Oxidation reaction.** Typical example: Compound **16** (0.22 g, 0.82 mmol) was dissolved in AcOEt (50 mL) at 40 °C. To this solution, 2-iodoxybenzoic acid (IBX) (0.92 g, 3.3 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under reflux. After 3.5 h the reaction mixture was cooled down to room temperature, the solid removed by filtration and the solvent evaporated under reduced pressure. This product was used in the next step without further purification and it was not characterized. **Reductive amination reactions.** Typical example: The crude from the oxidation reaction was dissolved in dry MeOH (50 mL) to have an aldehyde concentration of 0.016 M (0.8 mmol). To this solution, benzylamine (0.45 mL, 4.1 mmol) in glacial acetic acid (0.23 mL, 4.1 mmol) was added and stirred for 2 h at room temperature. Then, NaBH<sub>3</sub>CN (0.08 g, 1.23 mmol) was added and the reaction mixture was stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude product was purified either by flash chromatography on silica or preparative HPLC. Purification by HPLC was performed as follows (general procedure). The crude was dissolved in MeOH and loaded onto a semi-preparative X-Terra Prep MS C-18, 10  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  250 mm column. The solvent system used was: solvent (A): aqueous trifluoroacetic acid (TFA) (0.1% (v/v)) and solvent (B): TFA (0.095% (v/v)) in 4 : 1 ACN–H<sub>2</sub>O or plain MeOH. Salts and solvents were washed out with 100% A during 10 min. The product was eluted with a gradient of B (see below in each case). The flow rate was 10 mL min<sup>-1</sup> and the products were detected at 215 nm. The fractions were analysed by HPLC. Fractions containing the product were pooled and lyophilized.

The Cbz-protected derivative (165 mg, 0.46 mmol) was dissolved in ethanol (100 mL) and treated with H<sub>2</sub> (22 psi) in the presence of Pd/C (10% Pd, 80 mg) for 24 h at room temperature. The catalyst was removed by filtration and the solvent evaporated under vacuum.

**Purification.** For amines, the crude was purified by preparative HPLC, see conditions in each case. For aminoalcohols, when necessary, the product was further purified by cation exchange chromatography on the CM-Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia) stationary phase in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> form. The stationary phase was packed into a glass column (450–25 mm) to provide a final bed volume of 220 mL. The flow rate was 4 mL min<sup>-1</sup>. The CM-Sepharose-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was washed initially with H<sub>2</sub>O. An aqueous solution of the crude material at pH 5 was then loaded onto the column. Minor coloured impurities were washed away with H<sub>2</sub>O (440 mL, 2 bed volumes). Products were eluted with aqueous NH<sub>4</sub>OH (0.01 M) (400 mL). Pure fractions were pooled and lyophilized.

### Formation of iminocyclitol fused 2-oxopiperazine derivatives

After the Cbz-group removal the product was left at room temperature without solvent or dissolved in water and heated at 40 or 100 °C depending on the derivative until the intramolecular aminolysis was completed (see text). Then the product was assayed without any further purification.

**DAB and LAB aromatic 2-aminomethyl derivatives **23** (physical properties and characterization of compounds **24** can be found in ESI<sup>†</sup>).** (2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxy-2-((phenylamino)methyl)pyrrolidine (**23a**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-((phenylamino)methyl)pyrrolidine (170 mg, 58% yield) was purified by flash chromatography on silica (3 : 2 AcOEt–hexane). HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min; *t*<sub>R</sub> = 25.0 min. The title compound (100 mg, 66% yield) was prepared according to the general procedure described above. HPLC purification: gradient elution from 0 to 60% B in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 40 min; *t*<sub>R</sub> = 13.3 min.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +46.4$  (*c* 1.4 in MeOH). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 7.15$  (dd, *J* = 8.5, 7.4 Hz, 2H), 6.92–6.52 (m, 3H), 4.27–4.18 (m, 1H), 4.11 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 3.72 (ddd, *J* = 9.4, 5.4, 1.5 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 14.0, 5.5 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 14.0, 9.6 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 12.0, 3.7 Hz, 1H), 3.34 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 148.8$ , 130.2, 119.0, 114.1, 78.5, 76.2, 67.2, 52.2, 45.0. HRMS (ESI-TOF): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> calculated 209.1285; observed 209.1276.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-((Benzylamino)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**23b**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-((benzylamino)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (165 mg, 56% yield) was purified by flash chromatography on silica (9 : 1 AcOEt–MeOH). HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 40 min; *t*<sub>R</sub> = 10.6 min. The title compound (81 mg, 78% yield) was prepared according to the general procedure described above. HPLC purification: gradient elution from 0 to 60% B in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min; *t*<sub>R</sub> = 25.0 min.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +14.3$  (*c* 1.0 in MeOH). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 7.55$ –7.44 (m, 5H), 4.28 (s, 2H), 4.26–4.23 (m, 1H), 4.21 (s, 1H), 3.82 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 12.2, 5.0 Hz, 3H), 3.41 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 132.8$ , 131.0, 130.6, 130.2, 79.3, 75.9, 64.9, 53.1, 53.1, 48.5. HRMS (ESI-TOF): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> calculated 223.1441; observed 223.1431.

(2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxy-2-((quinolin-3-ylamino)methyl)pyrrolidine (**23c**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-((quinolin-3-ylamino)methyl)pyrrolidine (167 mg, 55% yield) was purified by flash chromatography on silica (19 : 1 AcOEt–MeOH). HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min; *t*<sub>R</sub> = 22.6 min. The title compound (110 mg, 70% yield) was prepared according to the general procedure described above. HPLC purification: gradient elution from 0 to 50% B in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 40 min; *t*<sub>R</sub> = 11.2 min.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +22.6$  (*c* 0.5 in MeOH). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 8.70$  (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.98 (ddd, *J* = 5.4, 4.9, 2.8 Hz, 3H), 7.74–7.68 (m, 2H), 4.31–4.27 (m, 1H), 4.20 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H),

3.81 (dd,  $J = 13.4, 3.4$  Hz, 3H), 3.56 (dd,  $J = 12.0, 3.6$  Hz, 1H), 3.41 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 143.77, 138.36, 135.37, 131.65, 130.61, 130.10, 128.14, 122.92, 119.63, 78.62, 76.30, 66.67, 52.78, 44.54$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2^+$  calculated 260.1393; observed 260.1381.

(2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxy-2-(1-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)pyrrolidine (23*d*). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(1-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-pyrrolidine (184 mg, 67% yield) was prepared as follows. The aldehyde 7 dissolved in MeOH (see above in the general procedure) was treated with the amine (5 equiv.  $\text{mol}^{-1}$  aldehyde) in glacial acetic acid (5 equiv.  $\text{mol}^{-1}$  aldehyde) and stirred for 5 h at room temperature. The precursor was purified by flash chromatography on silica (7 : 3 AcOEt–hexane). HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 22.2$  min. The title compound (136 mg, 78% yield) was prepared by removing the Cbz group by catalytic hydrogenation according to the general procedure described above. HPLC purification: gradient elution from 0 to 60% B in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 40 min;  $t_{\text{R}} = 12.0$  min.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -2.4$  ( $c$  1 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 7.70$  (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.42–7.36 (m, 1H), 7.36–7.30 (m, 1H), 5.03 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 4.53 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 4.37 (dt,  $J = 4.7, 2.4$  Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.75 (dd,  $J = 12.0, 4.6$  Hz, 1H), 3.59 (dd,  $J = 11.9, 2.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 149.2, 137.2, 125.2, 124.6, 119.4, 111.6, 80.8, 76.6, 62.3, 52.8, 30.9$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  for  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2^+$  calculated 234.1237; observed 234.1235.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(Aminomethyl)-1-(quinolin-3-yl)pyrrolidine-3,4-diol (23*e*). The title compound (7 mg, 5% yield) was obtained after treatment of the precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-((quinolin-3-ylamino)methyl)pyrrolidine with  $\text{H}_2$  in the presence of Pd/C. HPLC purification: gradient elution from 0 to 60% B in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 40 min;  $t_{\text{R}} = 10.9$  min.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -28.0$  ( $c$  0.5 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 8.84$  (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 8.13 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 8.08–8.02 (m, 2H), 7.80–7.70 (m, 2H), 4.37 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 4.35 (s, 1H), 4.15 (dd,  $J = 7.1, 1.8$  Hz, 1H), 3.88–3.74 (m, 2H), 3.67 (dd,  $J = 13.8, 7.2$  Hz, 1H), 3.37 (dd,  $J = 13.9, 2.0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 143.5, 135.6, 134.95, 131.5, 130.7, 130.7, 128.4, 122.7, 122.4, 80.7, 75.3, 66.6, 57.8, 39.5$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  for  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2^+$  calculated 260.1399; observed 260.1389.

**DAB 2-aminomethyl alcohol derivatives** 25. (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((2-hydroxyethyl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (25*e*). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((2-hydroxyethyl)amino)methyl)pyrrolidine (95 mg, 40% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% MeOH for 5 min, then from 0% to 70% MeOH in 35 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 16.7$  min. The title compound (64 mg, 98% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +4.7$  ( $c$  1.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.21$  (m, 1H), 3.97 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 3.5$  Hz, 1H), 3.76 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 5.3$  Hz, 2H), 3.45 (m,

1H), 3.37 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.3, 5.2$  Hz, 1H), 3.24 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 4.9$  Hz, 1H), 3.15 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.2, 9.1$  Hz, 1H), 3.06 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 78.9, 75.6, 62.1, 57.7, 50.7, 49.8, 48.9$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3^+$  177.1239  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found 177.1226.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((3-Hydroxypropyl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (25*f*). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((3-hydroxypropyl)amino)methyl)pyrrolidine (172 mg, 70% yield) was purified by HPLC: gradient elution from 0% to 60% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 17.0$  min. The title compound (103 mg, 91% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +6.7$  ( $c$  0.9 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.21$  (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 5.5, 3.4$  Hz, 1H), 3.96 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 3.8$  Hz, 1H), 3.68 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 6.1$  Hz, 2H), 3.42 (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 8.9, 4.2$  Hz, 1H), 3.38–3.30 (m, 2H), 3.22 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.1, 8.7$  Hz, 1H), 3.14 (m, 2H), 3.02 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.3, 3.3$  Hz, 1H), 1.89 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 78.78, 75.31, 61.03, 58.85, 50.64, 48.68, 46.05, 27.92$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$  191.1395  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found 191.1375.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((*S*)-1-Hydroxypropan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (25*g*). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((*S*)-1-hydroxypropan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine (175 mg, 72% yield) was purified by HPLC: gradient elution from 0% to 60% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 18.0$  min. The title compound (100 mg, 92% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +14.0$  ( $c$  1.5 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.39$  (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 4.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.30 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 2.4$  Hz, 1H), 3.94 (td,  $^3J(\text{H,H}) = 6.4, 2.9$  Hz, 1H), 3.87 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.7, 3.6$  Hz, 1H), 3.66 (m, 4H), 3.53 (ddd,  $^3J(\text{H,H}) = 10.2, 6.6, 3.4$  Hz, 1H), 3.48 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 12.7$  Hz, 1H), 1.33 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 6.8$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 77.55, 73.70, 62.03, 60.93, 56.70, 51.24, 44.53, 12.63$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$  191.1395  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found 191.1375.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((*S*)-1-Hydroxybutan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (25*h*). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((*S*)-1-hydroxybutan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine (122 mg, 64% yield) was purified by HPLC: gradient elution from 10% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 19.9$  min. The title compound (64 mg, 91% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +16.1$  ( $c$  1.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.23$  (m, 1H), 3.98 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 3.5$  Hz, 1H), 3.79 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.5, 3.7$  Hz, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.44 (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 8.9, 4.6$  Hz, 1H), 3.38 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.3, 5.3$  Hz, 1H), 3.26 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.2, 5.0$  Hz, 1H), 3.17 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.2, 8.4$  Hz, 1H), 3.02 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 0.93 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 7.5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 78.8, 75.5, 61.8, 60.6, 59.2, 50.4, 46.0, 21.0, 9.1$ . HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$  205.1552  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found 205.1547.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((*R*)-1-Hydroxypentan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (25*i*). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-

benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((*R*)-1-hydroxypentan-2-yl)-amino)methyl)pyrrolidine (112 mg, 57 yield) was purified by HPLC: gradient elution from 10% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_R = 22.0$  min. The title compound (59 mg, 89% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = +1.05$  ( $c$  0.9 in MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.31$  (m, 1H), 4.16 (s, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.5$ , 8.3 Hz, 1H), 3.29 (m, 2H), 1.62 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 15.2$ , 7.5 Hz, 2H), 1.37 (m, 2H), 0.90 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 7.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 78.0$ , 74.4, 62.0, 59.9, 58.6, 50.9, 45.1, 29.2, 18.1, 12.9. HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+ 219.1709$  [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found 219.1691.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((*R*)-1-Hydroxy-3-methylbutan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (**25j**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((*R*)-1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl)-amino)methyl)pyrrolidine (94 mg, 47% yield) was purified by HPLC: gradient elution from 10% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_R = 21.6$  min. The title compound (50 mg, 94% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = +18.3$  ( $c$  0.9 in MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.27$  (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 5.1$ , 2.7 Hz, 1H), 4.08 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 2.8$  Hz, 1H), 3.83 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.5$ , 3.9 Hz, 1H), 3.69 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.5$ , 6.8 Hz, 1H), 3.62 (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 8.2$ , 4.2 Hz, 1H), 3.48 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.5$ , 5.0 Hz, 1H), 3.40 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.5$ , 4.8 Hz, 1H), 3.31 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.5$ , 8.5 Hz, 1H), 3.20 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.5$ , 2.4 Hz, 1H), 2.95 (m, 1H), 2.00 (dq,  $^3J(\text{H,H}) = 13.4$ , 6.8 Hz, 1H), 0.96 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 25.3$ , 6.9 Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 78.2$ , 74.8, 64.8, 62.4, 58.1, 50.6, 46.2, 27.1, 18.1, 17.0. HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+ 219.1709$  [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found 219.1691.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((1,3-Dihydroxypropan-2-yl)amino)methyl)pyrrolidine-3,4-diol (**25k**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((1,3-dihydroxypropan-2-yl)amino)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (126 mg, 66 yield) was purified by HPLC: gradient elution from 10% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_R = 17.1$  min. The title compound (78 mg, 99% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = +15.2$  ( $c$  1.2 in MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.29$  (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 5.0$ , 2.6 Hz, 1H), 4.08 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 2.7$  Hz, 1H), 3.70 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 11.8$ , 4.4 Hz, 2H), 3.59 (m, 3H), 3.52 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6$ , 4.8 Hz, 1H), 3.30 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 2.4$  Hz, 1H), 3.25 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.4$ , 5.0 Hz, 1H), 3.12 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.4$ , 8.9 Hz, 1H), 2.93 (m, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 77.5$ , 74.5, 64.3, 59.9, 59.8, 50.2, 45.9. HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4^+ 207.1316$  [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found 207.1333.

(2*R*,3*R*,4*R*)-1-(((2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxypyrrolidin-2-yl)methyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4-diol (**25l**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (102 mg, 52% yield) was purified by HPLC: gradient elution from 0% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_R = 17.3$  min. The title compound (60 mg, 79% yield) was prepared according to the

general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = +35.4$  ( $c$  0.9 in MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.30$  (s, 1H), 4.09 (s, 1H), 3.94 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.3$ , 3.5 Hz, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 3.32 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 12.9$  Hz, 1H), 3.20 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 9.4$  Hz, 1H), 3.11 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 14.7$ , 5.4 Hz, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 1.85 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.2$ , 4.6 Hz, 1H), 1.62 (ddd,  $^3J(\text{H,H}) = 25.0$ , 12.7, 4.0 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 77.0$ , 74.8, 73.0, 71.4, 65.2, 64.2, 58.3, 50.3, 48.9, 48.2, 29.1. HRMS (ESI-TOF):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5^+ 263.1607$  [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found 263.1592.

**DAB and LAB fused 2-oxopiperazine derivatives and amino acid conjugates 28, 29, and 30.** (7*R*,8*R*,8*aR*)-7,8-Dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**28m**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-((glycineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**26m**) (140 mg, 58% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% MeOH for 5 min, then from 0% to 70% MeOH in 35 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_R = 16.9$  min.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 7.47$  (m, 5H, arom), 5.22 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.26 (broad s, 1H, H-4), 4.13 (m, 2H, H-2-3), 3.88 (m, 3H, H-5-7-7'), 3.48 (m, 3H H-5'-6'-6').  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 168.2$  ( $\text{CONH}_2$ ), 157.9 ( $\text{COBn}$ ), 156.7 ( $\text{COBn-rotamer}$ ), 135.8 (C-Ar), 135.4 (C-Ar-rotamer), 128.8 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 78.3 (C-3 rotamer), 77.6 (C-3), 73.6 (C-4), 73.1 (C-4 rotamer), 68.4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 68.0 ( $\text{CH}_2\text{Ph rotamer}$ ), 62.1 (C-2), 61.9 (C-2 rotamer), 53.0 (C-5 rotamer), 52.4 (C-5), 49.6 (C-6), 48.7 (C-6 rotamer), 48.0 (C-7). The title compound (78 mg, 92% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = +2.3$  ( $c$  1.4 in MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.33$  (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.8$ , 7.0 Hz, 1H), 3.96 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 6.7$  Hz, 1H), 3.83 (m, 5H), 3.49 (m, 1H), 3.15 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 11.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 164.3$ , 77.6, 72.7, 57.9, 48.8, 44.4, 43.5. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3 173.0926$  [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found: 173.0923.

(3*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-7,8-Dihydroxy-3-methylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**28n**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-alanineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**26n**) (110 mg, 58% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_R = 13.5$  min.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 7.47$  (m, 5H, Ar), 5.21 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.25 (br s, 1H, H-4), 4.18 (s, 1H, H-3 rotamer), 4.12 (br s, 2H, H-3-H-2), 4.05 (m, 2H, H-2-rotamer-H-7), 3.91 (m, 1H, H-7-rotamer), 3.84 (td,  $J = 12.2$ , 5.0 Hz, 2H, H-5;H-5-rotamer), 3.52 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H, H-5'), 3.48 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H, H-5' rotamer), 3.44 (br s, 2H, H-6-H-6 rotamer), 3.36 (br s, 2H, H-6'-H-6' rotamer), 1.53 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-8), 1.43 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-8-rotamer).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 172.2$  ( $\text{CONH}_2$ ), 157.8 ( $\text{COBn}$ ), 156.6 ( $\text{COBn-rotamer}$ ), 135.9 (C-Ar), 135.5 (C-Ar-rotamer), 128.9 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 78.1 (C-3-rotamer), 77.4 (C-3), 73.6 (C-4), 73.1 (C-4-rotamer), 68.3 ( $\text{CH}_2\text{Ph-rotamer}$ ), 68.1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 62.2 (C-2), 62.0 (C-2-rotamer), 56.2 (C-7-rotamer), 56.2 (C-7), 52.9 (C-5), 52.3 (C-5-rotamer), 47.6 (C-6), 46.9 (C-6-rotamer), 15.2 (C-8). The title compound (63 mg, 95% yield) was prepared according to the general procedure described above.

$[\alpha]_D^{22} = +22.2$  ( $c$  1.2 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.34 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.7, 6.4$  Hz, 1H), 4.22 (q,  $^3J(\text{H,H}) = 7.3$  Hz, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.85 (m, 3H), 3.51 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6, 6.3$  Hz, 1H), 3.40 (m, 1H), 1.61 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  166.1, 77.5, 72.8, 57.3, 51.2, 49.2, 40.5, 14.2. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$  187.1083 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found: 187.1089.

(3*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-7,8-Dihydroxy-3-isobutylhexahydropyrrolo-[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**28p**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-leucineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**26p**) (132 mg, 62% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 18.3$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.46 (m, 5H, Ar), 5.20 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.24 (m, 1H, H-4), 4.18 (s, 1H, H-3-rotamer), 4.10 (br s, 2H, H-2-H-3), 4.03 (br s, 1H, H-2-rotamer), 3.94 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-7), 3.82 (m, 2H, H-5-H-7-rotamer), 3.50 (m, 2H, H-5'-H-6), 3.36 (m, 2H, H-6'-H-6-rotamer), 3.20 (dd,  $J = 13.1, 6.6$  Hz, 1H, H-6'-rotamer), 1.62 (m, 3H, H-8-H8'-H-9), 0.94 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  171.3 ( $\text{CONH}_2$ ), 158.0 (COBn), 156.6 (COBn-rotamer), 135.8 (C-Ar), 135.3 (C-Ar-rotamer), 128.9 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 78.3 (C-3 rotamer), 77.5 (C-3), 73.4 (C-4), 73.0 (C-4 rotamer), 68.4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  rotamer), 68.1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 62.2 (C-2), 62.1 (C-2 rotamer), 59.8 (C-7 rotamer), 59.6 (C-7), 53.0 (C-5 rotamer), 52.3 (C-5), 48.5 (C-6), 47.4 (C-6 rotamer), 38.9 (C-8), 38.7 (C-8 rotamer), 24.0 (C-9 rotamer), 24.0 (C-9), 21.8 (C-10 rotamer), 21.5 (C-10), 21.3 (C-11), 21.0 (C-11 rotamer). The title compound (94 mg, 96% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = -9.0$  ( $c$  1.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.32 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.3, 6.1$  Hz, 1H), 4.00 (m, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.50 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.7, 5.9$  Hz, 1H), 3.30 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 0.98 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 5.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  166.6, 77.7, 72.9, 57.7, 53.6, 49.3, 41.1, 37.9, 24.3, 21.7, 20.6. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$  229.1552 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found: 229.1538.

(3*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-3-Benzyl-7,8-dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**28q**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-phenylalanineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**26q**) (165 mg, 70% yield) was purified by HPLC: 0% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 20.0$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.33 (m, 10H, Ar), 5.06 (q,  $J = 12.3$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.15 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-7), 4.05 (br s, 1H, H-4), 3.93 (br s, 2H, H-2-H-3), 3.70 (dd,  $J = 11.6, 4.3$  Hz, 1H, H-5), 3.43 (m, 3H, H-5'-H-6-H-6'), 3.19 (ddd,  $J = 38.2, 14.1, 7.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170.6 ( $\text{CONH}_2$ ), 159.0 (COBn), 137.5 (C-Ar), 135.0 (C-Ar), 130.6 (2C-Ar), 130.11 (2C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 79.4 (C-3), 75.11 (C-4), 68.9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 64.3 (C-2), 63.4 (C-7), 54.2 (C-5), 51.2 (C-6), 37.9 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-3,4-dihydroxy-2-(((*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)methylpyrrolidine (**26r**) (230 mg, 70% yield) was purified by HPLC: gradient elution 10% to 80% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 23.5$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$

$\delta$  7.30 (m, 10H, Ar), 5.12 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.29 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-7), 4.04 (br s, 1H, H-4), 3.93 (m, 2H, H-2-H-3), 3.77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.73 (dd,  $J = 11.6, 4.5$  Hz, 1H, H-5), 3.48 (dd,  $J = 13.0, 2.8$  Hz, 1H, H-6), 3.43 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, H-5'), 3.36 (m, 1H, H-6'), 3.22 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H, H-8-H-8').  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  173.87 ( $\text{CONH}_2$ ), 158.95 (COBn), 137.62 (C-Ar), 135.15 (C-Ar), 130.44 (2C-Ar), 130.14 (2C-Ar), 129.60 (2C-Ar), 129.32 (2C-Ar), 129.06 (2C-Ar), 79.54 (C-3), 75.32 (C-4), 68.89 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 64.86 (C-2), 62.83 (C-7), 54.50 (C-5), 53.53 ( $\text{OCH}_3$ ), 50.85 (C-6), 37.20 (C-8). The title compound (100 mg, 95% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = -11.4$  ( $c$  1.2 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.37 (m, 5H), 4.41 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 7.5, 5.5$  Hz, 1H), 4.28 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.3, 6.1$  Hz, 1H), 3.80 (m, 3H), 3.65 (m, 1H), 3.52 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.8, 5.8$  Hz, 1H), 3.43 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 15.1, 5.3$  Hz, 1H), 3.31 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 15.1, 7.7$  Hz, 1H), 2.91 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  164.6, 134.0, 129.3, 129.2, 128.1, 77.7, 72.8, 57.2, 55.8, 49.3, 41.5, 34.5. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$  263.1396 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found: 263.1377.

1-(3-((3*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-7,8-Dihydroxy-4-oxooctahydropyrrolo-[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)propyl)guanidine (**28u**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-arginineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**26u**) (129 mg, 55% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% MeOH for 5 min, then from 0% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 12.4$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.45 (m, 5H, Ar), 5.20 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.25 (m, 1H, H-4), 4.18 (s, 1H, H-3 rotamer), 4.10 (br s, 2H, H-2-H-3), 4.06 (br s, 1H, H-2 rotamer), 3.97 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, H-7), 3.85 (m, 2H, H-5-H-7 rotamer), 3.44 (m, 3H, H-5'-H-6-H-6'), 3.19 (m, 2H, H-10-H-10'), 1.93 (m, 1H, H-8), 1.64 (m, 3H, H-8'-H-9-H-9').  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  170.4 ( $\text{CONH}_2$ ), 158.1 (COBn), 156.7 (C=NH), 135.9 (C-Ar), 135.4 (C-Ar rotamer), 128.9 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 127.8 (C-Ar), 78.2 (C-3 rotamer), 77.4 (C-3), 73.4 (C-4), 73.0 (C-4 rotamer), 68.3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  rotamer), 68.1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 62.2 (C-2), 62.0 (C-2 rotamer), 60.4 (C-7 rotamer), 60.2 (C-7), 53.0 (C-5 rotamer), 52.3 (C-5), 48.6 (C-6), 47.6 (C-6 rotamer), 40.2 (C-10), 26.8 (C-8), 26.7 (C-8 rotamer), 23.3 (C-9 rotamer), 23.3 (C-9). The title compound (100 mg, 92% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = -2.0$  ( $c$  1.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.32 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6, 6.5$  Hz, 1H), 4.03 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 11.9, 5.7$  Hz, 2H), 3.82 (m, 3H), 3.53 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.7, 5.7$  Hz, 1H), 3.26 (m, 3H), 2.14 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.78 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  165.8, 156.7, 77.7, 72.9, 57.8, 54.7, 49.3, 41.6, 40.4, 26.4, 24.8. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_3$  272.1723 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found: 272.1726.

(1*R*,2*R*,5*aS*,10*aR*)-1,2-Dihydroxyoctahydrodipyrrolo[1,2-*a*:1',2'-*d*]pyrazin-5(1*H*)-one (**28v**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-prolineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**26v**) (128 mg, 63% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 2% to 62% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 18.0$  min. Assigned the major rotamer:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.44 (m, 5H, Ar), 5.23 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.28 (s, 1H, H-7), 4.16 (m, 2H, H-3-

H-4), 4.00 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H, H-2), 3.87 (br s, 1H, H-10), 3.75 (m, 2H, H-5-H-6), 3.53 (m, 2H, H-5'-H-6'), 3.38 (m, 1H, H-10'), 2.59 (m, 1H, H-8), 2.23 (m, 1H, H-9), 2.12 (m, 2H, H-8'-H-9').  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  171.0 (CONH<sub>2</sub>), 159.8 (COBn), 137.8 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 78.8 (C-3), 76.0 (C-4), 70.5 (C-7) 68.7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 63.7 (C-2), 59.5 (C-6), 55.4 (C-10), 54.1 (C-5), 30.3 (C-8), 24.2 (C-9). The title compound (90 mg, 97% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -19.0$  ( $c$  1 in MeOH) of the mixture. (major)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.38 (m, 1H), 4.33 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.7$ , 6.9 Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.93 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.1$ , 2.7 Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.47 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6$ , 6.8 Hz, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.23 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 11.4$  Hz, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.09 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  165.7, 77.0, 72.6, 62.1, 58.2, 56.9, 50.6, 48.7, 27.4, 21.8. (minor)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.40 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.52 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 14.0$  Hz, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.33 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.98 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  168.2, 74.1, 68.1, 61.0, 52.7, 51.8, 51.6, 48.5, 29.5, 23.6. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$  213.1239  $[\text{M} + \text{H}^+]$ ; found: 213.1226.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((*S*)-Valineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**30o**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-valineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**26o**) (104 mg, 51% yield) was purified by HPLC: gradient elution: 0% MeOH for 5 min, then from 10% to 80% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 16.5$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.35 (m, 5H, Ar), 5.19 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.09 (br s, 1H, H-4), 3.99 (m, 2H, H-2-H-3), 3.75 (dd,  $J = 11.5$ , 4.3 Hz, 1H, H-5), 3.68 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H, H-7), 3.49 (m, 2H, H-5'-H-6), 3.32 (m, 1H, H-6'), 2.20 (td,  $J = 13.5$ , 6.8 Hz, 1H, H-8), 1.07 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170.1 (CONH<sub>2</sub>), 159.3 (COBn), 137.5 (C-Ar), 129.6 (2C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (2C-Ar), 79.5 (C-3), 75.0 (C-4), 69.1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 68.0 (C-7), 64.4 (C-2), 54.3 (C-5), 51.8 (C-6), 31.1 (C-8), 18.6 (CH<sub>3</sub>), 18.5 (CH<sub>3</sub>). The title compound (65 mg, 87% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +8.0$  ( $c$  1.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.35 (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 4.4$ , 2.2 Hz, 1H), 4.14 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 2.3$  Hz, 1H), 3.60 (m, 2H), 3.41 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6$ , 1.7 Hz, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.97 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.3$ , 8.5 Hz, 1H), 1.93 (tt,  $^3J(\text{H,H}) = 13.6$ , 6.8 Hz, 1H), 0.98 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ , 6.9 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  179.0, 77.1, 74.5, 67.9, 65.6, 50.3, 47.3, 31.0, 18.4, 18.1. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3$  232.1661  $[\text{M} + \text{H}^+]$ ; found: 232.1642.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-(((*S*)-Aspartic( $\beta$ -tert-butyl)amidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**30t**). The precursor (2*R*,3*R*,4*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-aspartic( $\beta$ -*t*Bu)amidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**26t**) (138 mg, 56% yield) was purified by HPLC: gradient elution 10% to 80% MeOH in 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 20.8$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.36 (m, 5H, Ar), 5.18 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.07 (m, 2H, H-4-H-7), 3.99 (br s, 2H, H-2-H-3), 3.76 (dd,  $J = 11.6$ , 4.5 Hz, 1H, H-5), 3.42 (m, 3H, H-5'-H-6-H-6'), 2.87

(m, 2H, H-8-H-8'), 1.48 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170.2 (CONH<sub>2</sub>), 170.1 (COO<sup>*t*</sup>Bu), 158.9 (COBn), 137.5 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 84.1 (C-CH<sub>3</sub>), 79.4 (C-3), 75.3 (C-4), 68.8 (OCH<sub>2</sub>Ph), 64.4 (C-2), 58.4 (C-7), 54.3 (C-5), 51.0 (C-6), 36.3 (C-8), 28.2 (3CH<sub>3</sub>). The title compound (95 mg, 93% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +16.6$  ( $c$  0.9 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.36 (dt,  $^3J(\text{H,H}) = 4.4$ , 2.3 Hz, 1H), 4.14 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 2.3$  Hz, 1H), 3.62 (m, 3H), 3.42 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6$ , 1.8 Hz, 1H), 3.13 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.3$ , 5.4 Hz, 1H), 3.05 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 13.3$ , 9.0 Hz, 1H), 2.74 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 6.3$  Hz, 2H), 1.47 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  177.7, 172.3, 83.5, 77.0, 74.5, 65.4, 57.7, 50.3, 46.4, 37.8, 27.3. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_5$  304.1872  $[\text{M} + \text{H}^+]$ ; found: 304.1869.

(7*S*,8*S*,8*aS*)-7,8-Dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4-(1*H*)-one (**29m**). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-((glycineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**27m**) (147 mg, 60% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% MeOH for 5 min, then from 0% to 70% MeOH in 35 min. HPLC analysis: identical to that **26m**.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR matched those listed above for compound **26m**. The title compound (100 mg, 99% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -2.5$  ( $c$  2.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.31 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 14.3$ , 7.1 Hz, 1H), 3.94 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 6.2$  Hz, 1H), 3.83 (m, 4H), 3.47 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.5$ , 6.9 Hz, 1H), 3.18 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  163.3, 77.5, 72.6, 57.4, 48.8, 43.9, 43.3. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$  173.0926  $[\text{M} + \text{H}^+]$ ; found: 173.0930.

(3*S*,7*S*,8*S*,8*aS*)-7,8-Dihydroxy-3-methylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**29n**). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-alanineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**27n**) (50 mg, 44% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 13.4$  min.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ar), 5.05 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.11 (m, 1H, H-4), 4.08 (m, 1H, H-4-rotamer), 4.02 (s, 1H, H-3-rotamer), 3.93 (m, 3H, H-2-H-3-H-7), 3.77 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-7-rotamer), 3.68 (dt,  $J = 11.0$ , 5.3 Hz, 1H, H-5), 3.36 (m, 2H, H-5'-H-6), 3.15 (ddd,  $J = 25.4$ , 13.1, 7.1 Hz, 1H, H-6'), 1.41 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> rotamer).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  172.0 (CONH<sub>2</sub>), 171.8 (CONH<sub>2</sub> rotamer), 158.0 (COBn), 156.5 (COBn-rotamer), 135.8 (C-Ar), 135.3 (C-Ar-rotamer), 128.9 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 78.2 (C-3-rotamer), 77.6 (C-3), 73.5 (C-4-rotamer), 73.0 (C-4), 68.4 (OCH<sub>2</sub>Ph-rotamer), 68.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 62.1 (C-2), 62.1 (C-2-rotamer), 56.4 (C-7-rotamer), 56.2 (C-7), 53.1 (C-5-rotamer), 52.3 (C-5), 48.3 (C-6), 47.4 (C-6-rotamer), 15.4 (C-8), 15.2 (C-8-rotamer). The title compound (45 mg, 99% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +26.0$  ( $c$  1.0 in MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.34 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 14.2$ , 7.3 Hz, 1H), 4.09 (q,  $^3J(\text{H,H}) = 7.2$  Hz, 1H), 3.91 (m, 3H), 3.82 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.7$ , 8.0 Hz, 1H), 3.50 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.7$ , 6.9 Hz, 1H), 3.31 (m, 1H), 1.59 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  165.9, 77.5, 72.8, 57.4, 52.6, 49.1, 43.3,

14.4. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_8H_{15}N_2O_3$  187.1083  $[M + H^+]$ ; found: 187.1085.

(3*S*,7*S*,8*S*,8*aS*)-7,8-Dihydroxy-3-isobutylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**29p**). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-leucineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**27p**) (45 mg, 50% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_R$  = 18.5 min.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.47 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 5H, Ar), 5.21 (m, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 4.26 (m, 1H, H-4), 4.15 (m, 2H, H-2-H-3), 4.10 (br s, 1H, H-3-rotamer), 4.02 (m, 1H, H-7), 3.84 (m, 2H, H-5-H-7-rotamer), 3.47 (m, 2H, H-5'-H-6), 3.32 (m, 1H, H-6'), 1.75 (m, 3H, H-8-H-8'-H-9), 1.55 (m, 2H, H-8-rotamer-H-9-rotamer), 0.94 (m, 6H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  171.08 ( $CONH_2$ ), 158.19 (COBn), 156.45 (COBn-rotamer), 135.74 (C-Ar), 131.96 (C-Ar-rotamer), 129.03 (C-Ar), 128.95 (C-Ar), 128.74 (C-Ar), 128.54 (C-Ar), 127.97 (C-Ar), 78.27 (C-3), 77.51 (C-3 rotamer), 73.42 (C-4), 72.93 (C-4 rotamer), 68.53 ( $CH_2Ph$ ), 68.18 ( $CH_2Ph$  rotamer), 62.01 (C-2), 59.80 (C-7), 59.42 (C-7 rotamer), 53.07 (C-5), 52.35 (C-5 rotamer), 48.92 (C-6), 48.26 (C-6 rotamer), 38.91 (C-8), 38.62 (C-8 rotamer), 23.96 (C-9), 21.92 (C-10), 21.86 (C-10 rotamer), 21.12 (C-11), 20.92 (C-11 rotamer). The title compound (20 mg, 99% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22}$  = -3.8 ( $c$  0.9 in MeOH).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  4.33 (dd,  $^3J(H,H)$  = 14.3, 7.2 Hz, 1H), 4.06 (dd,  $^3J(H,H)$  = 10.0, 3.5 Hz, 1H), 3.96 (t,  $^3J(H,H)$  = 7.5 Hz, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.80 (dd,  $^3J(H,H)$  = 12.5, 7.8 Hz, 1H), 3.52 (dd,  $^3J(H,H)$  = 12.6, 6.8 Hz, 1H), 3.29 (t,  $^3J(H,H)$  = 11.6 Hz, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.79 (m, 2H), 0.98 (t,  $^3J(H,H)$  = 5.7 Hz, 6H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  165.7, 77.4, 72.6, 57.1, 54.8, 49.2, 43.3, 38.6, 23.7, 22.1, 19.9. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{11}H_{21}N_2O_3$  229.1552  $[M + H^+]$ ; found: 229.1545.

(3*S*,7*S*,8*S*,8*aS*)-3-Benzyl-7,8-dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one (**29q**). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-phenylalanineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**27q**) (54 mg, 55% yield) was purified by HPLC: gradient elution: 0% to 70% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_R$  = 19.4 min.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.32 (m, 10H, Ar), 5.20 (m, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 4.23 (dd,  $J$  = 7.4, 6.1 Hz, 1H, H-7), 4.06 (br s, 1H, H-4), 4.00 (m, 1H, H-2), 3.95 (s, 1H, H-3), 3.73 (dd,  $J$  = 11.7, 4.3 Hz, 1H, H-5), 3.40 (m, 3H, H-5'-H-6-H-6'), 3.21 (ddd,  $J$  = 21.5, 13.9, 6.8 Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  170.3 ( $CONH_2$ ), 159.1 (COBn), 137.6 (C-Ar), 135.0 (C-Ar), 130.6 (2C-Ar), 130.0 (2C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 79.4 (C-3), 75.3 (C-4), 68.9 ( $OCH_2Ph$ ), 64.3 (C-2), 62.8 (C-7), 54.5 (C-5), 50.7 (C-6), 37.8 (C-8). The title compound (34 mg, 99% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22}$  = -5.7 ( $c$  1.1 in MeOH).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.42 (m, 5H), 4.34 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.84 (m, 3H), 3.61 (dd,  $^3J(H,H)$  = 14.8, 4.2 Hz, 1H), 3.56 (dd,  $^3J(H,H)$  = 12.7, 6.9 Hz, 1H), 3.26 (t,  $^3J(H,H)$  = 12.1 Hz, 1H), 3.14 (dd,  $^3J(H,H)$  = 14.9, 10.1 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  164.2, 133.9, 129.3, 129.2, 128.1, 77.4, 72.7, 58.0, 57.1, 49.2, 43.5, 35.0. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{14}H_{19}N_2O_3$  263.1396  $[M + H^+]$ ; found: 263.1399.

2-(((3*S*,7*S*,8*S*,8*aS*)-7,8-Dihydroxy-4-oxooctahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)acetic acid (**29s**). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-aspartic( $\beta^tBu$ )amidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**27t**) (64 mg, 47% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_R$  = 20.6 min.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.36 (m, 5H, Ar), 5.19 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 4.19 (m, 1H, H-7), 4.09 (br s, 1H, H-4), 4.02 (br s, 2H H-2-H-3), 3.75 (dd,  $J$  = 11.6, 4.1 Hz, 1H, H-5), 3.47 (m, 3H, H-5'-H-6-H-6'), 3.00 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H, H-8-H-8'), 1.48 (s, 9H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  170.0 (2C- $CONH_2$ - $COO^tBu$ ), 159.0 (COBn), 137.6 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 84.1 (C- $CH_3$ ), 79.5 (C-3), 75.2 (C-4), 68.9 ( $OCH_2Ph$ ), 64.4 (C-2), 58.4 (C-7), 54.4 (C-5), 51.8 (C-6), 36.7 (C-8), 28.2 (3 $CH_3$ ). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-asparticamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**27s**) (55 mg, 47% yield) was prepared by removing the *tBu* ester of the  $\beta$ -carboxylate group. Deprotection of the *tBu* group: **27t** (60 mg, 0.13 mmol) was dissolved in trifluoroacetic acid (TFA) (7 mL) and left to stand at room temperature for 6 h. After that time, no starting material was detected by HPLC. The derivative was purified by HPLC using a gradient elution: 0% to 70% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_R$  = 13.3 min.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.35 (m, 5H, Ar), 5.20 (m, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 4.21 (m, 1H, H-7), 4.09 (br s, 1H, H-4), 4.03 (br s, 2H, H-2-H-3), 3.75 (dd,  $J$  = 11.7, 4.3 Hz, 1H, H-5), 3.56 (dd,  $J$  = 13.0, 2.6 Hz, 1H, H-6), 3.45 (m, 2H, H-5'-H-6'), 3.05 (dd,  $J$  = 9.2, 5.8 Hz, 2H, H-8-H-8').  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  172.5 ( $CONH_2$ ), 170.2 (COOH), 158.9 (COBn), 137.6 (C-Ar), 129.6 (2C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (2C-Ar), 79.6 (C-3), 75.3 (C-4), 68.9 ( $OCH_2Ph$ ), 64.5 (C-2), 58.5 (C-7), 54.5 (C-5), 51.6 (C-6), 35.5 ( $CONH_2$ ). The title compound (32 mg, 99% yield) was then prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22}$  = +46.6 ( $c$  0.8 in MeOH).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  4.35 (dd,  $^3J(H,H)$  = 14.3, 7.1 Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.95 (m, 3H), 3.84 (dd,  $^3J(H,H)$  = 12.6, 7.9 Hz, 1H), 3.48 (dd,  $^3J(H,H)$  = 12.6, 6.8 Hz, 1H), 3.39 (t,  $^3J(H,H)$  = 11.8 Hz, 1H), 3.23 (dd,  $^3J(H,H)$  = 18.4, 5.5 Hz, 1H), 3.07 (dd,  $^3J(H,H)$  = 18.4, 3.7 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  173.8, 164.3, 77.4, 72.7, 57.2, 53.1, 49.1, 43.8, 33.6. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_9H_{15}N_2O_5$  231.0981  $[M + H^+]$ ; found: 231.0995.

1-(3-(((3*S*,7*S*,8*S*,8*aS*)-7,8-Dihydroxy-4-oxooctahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl)propyl)guanidine (**29u**). The precursor (2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-arginineamidyl)methyl)-3,4-dihydropyrrolidine (**27u**) (49 mg, 48% yield) was purified by HPLC: gradient elution 0% to 60% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_R$  = 12.2 min.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.36 (m, 5H, Ar), 5.15 (m, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 4.10 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H, H-4), 4.03 (br s, 3H, H-2-H-3-H-7), 3.75 (dd,  $J$  = 11.7, 4.3 Hz, 1H, H-5), 3.49 (m, 2H, H-5'-H-6), 3.35 (m, 1H, H-6'), 3.23 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, H-10-H-10'), 1.98 (m, 2H, H-8-H-8'), 1.66 (m, 2H, H-9-H-9').  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  170.7 ( $CONH_2$ ), 159.2 (COBn), 158.7 (C=NH), 137.6 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 79.4 (C-3), 75.3 (C-4), 68.9 ( $OCH_2Ph$ ), 64.4 (C-2), 61.1 (C-7), 54.5 (C-5), 50.9 (C-6), 41.7 (C-10), 28.8

(C-8), 25.0 (C-9). The title compound (60 mg, 99% yield) was prepared according to the general procedure described above.  $[\alpha]_D^{22} = +16.9$  ( $c$  1.2 in MeOH).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.33 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 14.4, 7.1$  Hz, 1H), 4.00 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 8.3, 4.4$  Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.81 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6, 7.8$  Hz, 1H), 3.52 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12.6, 6.9$  Hz, 1H), 3.26 (m, 3H), 2.18 (ddd,  $^3J(\text{H,H}) = 15.6, 10.2, 4.8$  Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.77 (m, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  166.8, 156.7, 77.5, 72.7, 58.4, 56.3, 49.1, 43.7, 40.3, 27.2, 24.2. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_3$  272.1723 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]; found: 272.1716.

(2*S*,3*S*,4*S*)-*N*-Benzyloxycarbonyl-2-(((*S*)-valineamidyl)methyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine (**27o**). The title compound (60 mg, 50% yield) was prepared according to the general procedure described above and purified by HPLC: gradient elution 0% to 70% B during 40 min. HPLC analysis: gradient elution from 10% to 70% B in 30 min;  $t_{\text{R}} = 16.4$  min.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.37 (m, 5H, Ar), 5.18 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.08 (br s, 1H, H-4), 4.05 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-2), 4.00 (br s, 1H, H-3), 3.83 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, H-7), 3.75 (dd,  $J = 11.7, 4.3$  Hz, 1H, H-5), 3.48 (d,  $J = 11.8$  Hz, 1H, H-5'), 3.43 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-6), 3.35 (m, 1H, H-6'), 2.26 (m, 1H, H-8), 1.10 (m, 6H,  $2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169.7 (CONH<sub>2</sub>), 159.3 (COBn), 137.6 (C-Ar), 129.6 (2C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (2C-Ar), 79.5 (C-3), 75.3 (C-4), 69.0 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 66.8 (C-7), 64.4 (C-2), 54.5 (C-5), 51.4 (C-6), 31.1 (C-8), 18.8 ( $\text{CH}_3$ ), 17.8 ( $\text{CH}_3$ ). This compound could not be converted to the corresponding bicyclic (3*S*,7*S*,8*S*,8*aS*)-7,8-dihydroxy-3-isopropylhexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-4(1*H*)-one. No further characterization was conducted.

### Inhibitory activity assays

Enzymatic inhibition assays on commercial glycosidases, the kinetics of the inhibition, preparation of gut mucosal suspensions, inhibition assays on rat intestinal disaccharidases and MIC determination against the H37Rv Pasteur *Mycobacterium tuberculosis* strain using the REMA plate method were performed as described in previous work.<sup>7,24</sup> The experimental details are given in the ESI.†

### Acknowledgements

This work was supported by the Spanish MICINN CTQ2009-07359 and CTQ2009-08328, Generalitat de Catalunya (2009 SGR 00281) and ERA-IB MICINN. PIM2010EEI-00607 (EIB. 10.012.MicroTechEnz). L. Gomez acknowledges Generalitat de Catalunya and Bioglane S.L.N.E. for the predoctoral contract.

### References

- In this work the derivatives were named pyrrolidine derivatives using the heterocyclic nomenclature rather than the sugar nomenclature.
- D. W. C. Jones, R. J. Nash, E. A. Bell and J. M. Williams, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 3125–3126; K. Yasuda, H. Kizu, T. Yamashita, Y. Kameda, A. Kato, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, R. J. Molyneux and N. Asano, *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**, 198–202.
- J. P. Saludes, S. C. Lievens and T. F. Molinski, *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 436–438.
- N. Asano, R. J. Nash, R. J. Molyneux and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 1645–1680.
- G. W. J. Fleet and P. W. Smith, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 5685–5692.
- N. Asano, K. Ikeda, L. Yu, A. Kato, K. Takebayashi, I. Adachi, I. Kato, H. Ouchi, H. Takahata and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 223–229.
- X. Garrabou, L. Gomez, J. Joglar, S. Gil, T. Parella, J. Bujons and P. Clapés, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 10691–10706.
- A. M. Scofield, L. E. Fellows, R. J. Nash and G. W. J. Fleet, *Life Sci.*, 1986, **39**, 645–650.
- B. Andersen, A. Rassov, N. Westergaard and K. Lundgren, *Biochem. J.*, 1999, **342**, 545–550; K. Fosgerau, N. Westergaard, B. Quistorff, N. Grunnet, M. Kristiansen and K. Lundgren, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **380**, 274–284; N. G. Oikonomakos, C. Tiraidis, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, M. Kristiansen, C. U. Jessen, L. Norskov-Lauritsen and L. Agius, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 5687–5701; A. B. Walls, H. M. Sickmann, A. Brown, S. D. Bouman, B. Ransom, A. Schousboe and H. S. Waagepetersen, *J. Neurochem.*, 2008, **10**, 1–9; Y. Minami, C. Kuriyama, K. Ikeda, A. Kato, K. Takebayashi, I. Adachi, G. W. J. Fleet, A. Kettawan, T. Okamoto and N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 2734–2740.
- M. Kimura, F.-j. Chen, N. Nakashima, I. Kimura, N. Asano and S. Koya, *J. Tradit. Med.*, 1995, **12**, 214–219.
- J. Churruca, L. Vigil, E. Luna, J. Ruiz-Galiana and M. Varela, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, 2008, **1**, 3–11; F. Donatelli, P. Cavagna, G. Di Dedda, A. Catenacci, M. Di Nicola, L. Lorini, R. Fumagalli and F. Carli, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 2008, **52**, 1103–1110; A. Esteghamati, O. Khalilzadeh, M. Anvari, M. S. Ahadi, M. Abbasi and A. Rashidi, *Arch. Med. Res.*, 2008, **39**, 803–808.
- R. R. Holman, C. A. Cull and R. C. Turner, *Diabetes Care*, 1999, **22**, 960–964.
- A. Ceriello, *Diabetes Vasc. Dis. Res.*, 2008, **5**, 260–268; M. Cho, J. H. Han and S. You, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 1164–1171; J. Singh, A. Dartois and L. Kaur, *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, **21**, 168–180.
- L. Gómez, E. Molinar-Toribio, M. Á. Calvo-Torras, C. Adelantado, M. E. Juan, J. M. Planas, X. Cañas, C. Lozano, S. Pumarola, P. Clapés and J. L. Torres, *Br. J. Nutr.*, 2012, **107**, 1739–1746.
- D. Best, S. F. Jenkinson, A. W. Saville, D. S. Alonzi, M. R. Wormald, T. D. Butters, C. Norez, F. Becq, Y. Blierot, I. Adachi, A. Kato and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 4170–4174.
- J. S. S. Rountree, T. D. Butters, M. R. Wormald, R. A. Dwek, N. Asano, K. Ikeda, E. L. Evinson, R. J. Nash and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 4287–4291; J. S. S. Rountree, T. D. Butters, M. R. Wormald, S. D. Boomkamp, R. A. Dwek, N. Asano, K. Ikeda,



- E. L. Evinson, R. J. Nash and G. W. J. Fleet, *ChemMedChem*, 2009, **4**, 378–392.
- 17 F. Popowycz, S. Gerber-Lemaire, R. Demange, E. Rodriguez-Garcia, A. T. C. Asenjo, I. Robina and P. Vogel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 2489–2493; A. T. Carmona, F. Popowycz, S. Gerber-Lemaire, E. Rodriguez-Garcia, C. Schutz, P. Vogel and I. Robina, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 4897–4911; H. Fiaux, D. A. Kuntz, D. Hoffman, R. C. Janzer, S. Gerber-Lemaire, D. R. Rose and L. Juillerat-Jeanerret, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 7337–7346.
- 18 F. Popowycz, S. Gerber-Lemaire, E. Rodriguez-Garcia, C. Schütz and P. Vogel, *Helv. Chim. Acta*, 2003, **86**, 1914–1948; F. Popowycz, S. Gerber-Lemaire, C. Schutz and P. Vogel, *Helv. Chim. Acta*, 2004, **87**, 800–810.
- 19 H. Fiaux, F. Popowycz, S. Favre, C. Schutz, P. Vogel, S. Gerber-Lemaire and L. Juillerat-Jeanerret, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4237–4246.
- 20 N. Asano, K. Oseki, H. Kizu and K. Matsui, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 3701–3706; A. E. Stutz, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- 21 S. Ishida, M. Okasaka, F. Ramos, Y. Kashiwada, Y. Takaishi, O. Kodzhimatov and O. Ashurmetov, *J. Nat. Med.*, 2008, **62**, 236–238.
- 22 M. Shibano, D. Tsukamoto, A. Masuda, Y. Tanaka and G. Kusano, *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, **49**, 1362–1365; M. Shibano, D. Tsukamoto and G. Kusano, *Heterocycles*, 2002, **57**, 1539–1553.
- 23 E.-L. Tsou, S.-Y. Chen, M.-H. Yang, S.-C. Wang, T.-R.R. Cheng and W.-C. Cheng, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 10198–10204.
- 24 L. Gómez, X. Garrabou, J. Joglar, J. Bujons, T. Parella, C. Vilaplana, P. J. Cardona and P. Clapés, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6309–6321.
- 25 D. A. Horton, G. T. Bourne and M. L. Smythe, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 893–930.
- 26 C. De Risi, M. Pelà, G. P. Pollini, C. Trapella and V. Zanirato, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2010, **21**, 255–274.
- 27 B. E. Maryanoff and M. J. Costanzo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 1562–1595.
- 28 R. Lucas, P. Balbuena, J. C. Errey, M. A. Squire, S. S. Gurcha, M. McNeil, G. S. Besra and B. G. Davis, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2197–2199; J. P. Shilvock, J. R. Wheatley, R. J. Nash, A. A. Watson, R. C. Griffiths, T. D. Butters, M. Muller, D. J. Watkin, D. A. Winkler and G. W. J. Fleet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1999, 2735–2745; J. A. Maddy, N. Bansal, L. E. Bermudez, R. N. Comber, I. M. Orme, W. J. Suling, L. N. Wilson and R. C. Reynolds, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 237–242.
- 29 M. Gutierrez, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons and P. Clapés, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 5762–5764.
- 30 X. Garrabou, J. Calveras, J. Joglar, T. Parella, J. Bujons and P. Clapes, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 8430–8436.
- 31 G. W. J. Fleet, S. J. Nicholas, P. W. Smith, S. V. Evans, L. E. Fellows and R. J. Nash, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 3127–3130; G. W. J. Fleet and D. R. Witty, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1990, **1**, 119–136; Y. J. Kim, M. Kido, M. Bando and T. Kitahara, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 7501–7508; X. Zhou, W.-J. Liu, J.-L. Ye and P.-Q. Huang, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 6346–6357; Y.-F. Chang, C.-W. Guo, T.-H. Chan, Y.-W. Pan, E.-L. Tsou and W.-C. Cheng, *Mol. Diversity*, 2011, **15**, 203–214; P. K. Upadhyay and P. Kumar, *Synthesis*, 2010, 3063–3066; G.-N. Wang, L. Yang, L.-H. Zhang and X.-S. Ye, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 2001–2009.
- 32 L. Espelt, T. Parella, J. Bujons, C. Solans, J. Joglar, A. Delgado and P. Clapés, *Chem.–Eur. J.*, 2003, **9**, 4887–4899; L. Espelt, J. Bujons, T. Parella, J. Calveras, J. Joglar, A. Delgado and P. Clapés, *Chem.–Eur. J.*, 2005, **11**, 1392–1401; X. Garrabou, J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire and P. Clapés, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 5521–5525.
- 33 A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar and P. Clapés, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 3808–3816.
- 34 M. A. Casadei, C. Galli and L. Mandolini, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 1051–1056.
- 35 H. J. Jeong, J. M. Lee, M. K. Kim and S.-G. Lee, *J. Heterocycl. Chem.*, 2002, **39**, 1019–1024.
- 36 G. M. Raghavendra, A. B. Ramesha, C. N. Revanna, K. N. Nandeesh, K. Mantelingu and K. S. Rangappa, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 5571–5574; M. Chakrabarty, R. Mukherjee, S. Karmakar and Y. Harigaya, *Monatsh. Chem.*, 2007, **138**, 1279–1282.
- 37 A. Kumar, M. A. Alam, S. Rani and Y. D. Vankar, *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 1142–1148; B. Chandrasekhar, A. Madhan and B. V. Rao, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 8746–8751; A. E. Hakansson, J. van Ameijde, L. Gughelmini, G. Horne, R. J. Nash, E. L. Evinson, A. Kato and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 282–289; U. M. Lindstrom, R. Ding and O. Hidestøl, *Chem. Commun.*, 2005, 1773–1774; D.-P. Pham-Huu, Y. Gizaw, J. N. BeMiller and L. Petruš, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 9413–9417; A. T. Carmona, J. Fuentes, I. Robina, E. Rodriguez Garcia, R. Demange, P. Vogel and A. L. Winters, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3874–3883; I. Navarro and P. Vogel, *Helv. Chim. Acta*, 2002, **85**, 152–160; R. E. Lee, M. D. Smith, R. J. Nash, R. C. Griffiths, M. McNeil, R. K. Grewal, W. Yan, G. S. Besra, P. J. Brennan and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 6733–6736.
- 38 G. A. R. Y. Suaifan, M. F. Mahon, T. Arafat and M. D. Threadgill, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 11245–11266; B. F. Gisin and R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 3102–3106; E. Pedroso, A. Grandas, X. de las Heras, R. Eritja and E. Giralt, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 743–746.
- 39 A. M. Abdula, R. A. Khalaf, M. S. Mubarak and M. O. Taha, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 463–482; G. Dickson Lucas, E. Leroy and J.-L. Reymond, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1217–1226.
- 40 T. M. Chapman, S. Courtney, P. Hay and B. G. Davis, *Chem.–Eur. J.*, 2003, **9**, 3397–3414.
- 41 J. H. Kim, M. J. Curtis-Long, W. D. Seo, J. H. Lee, B. W. Lee, Y. J. Yoon, K. Y. Kang and K. H. Park, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 4282–4285.

- 42 S. P. Kawatkar, D. A. Kuntz, R. J. Woods, D. R. Rose and G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8310–8319; D. A. Kuntz, W. Z. J. Guo, D. R. Rose and G.-J. Boons, *Chem-BioChem*, 2009, **10**, 268–277; D. A. Kuntz, C. A. Tarling, S. G. Withers and D. R. Rose, *Biochemistry*, 2008, **47**, 10058–10068; W. Zhong, D. A. Kuntz, B. Ember, H. Singh, K. W. Moremen, D. R. Rose and G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8975–8983; S. Howard, S. He and S. G. Withers, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 2067–2072; V. R. Doddi and Y. D. Vankar, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 5583–5589.
- 43 J. Calveras, M. Egado-Gabás, L. Gómez, J. Casas, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons and P. Clapés, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 7310–7328.
- 44 E. Moreno-Clavijo, A. T. Carmona, Y. Vera-Ayoso, A. J. Moreno-Vargas, C. Bello, P. Vogel and I. Robina, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 1192–1202; A. J. Moreno-Vargas, A. T. Carmona, F. Mora, P. Vogel and I. Robina, *Chem. Commun.*, 2005, 4949–4951; C. Chevrier, D. LeNouen, M. Neuburger, A. Defoin and C. Tarnus, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 5363–5366.
- 45 N. Asano, K. Yasuda, H. Kizu, A. Kato, J.-Q. Fan, R. J. Nash, G. W. J. Fleet and R. J. Molyneux, *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**, 35–41.
- 46 *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists*, ed. R. A. Copeland, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2005.
- 47 J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings and F. Portaels, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**, 2720–2722.
- 48 H. Kayakiri, K. Nakamura, S. Takase, H. Setoi, I. Uchida, H. Terano, M. Hashimoto, T. Tada and S. Koda, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 2807–2812.
- 49 A. Lei, G. Liu and X. Lu, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 974–980.
- 50 Y. Huang, D. R. Dalton and P. J. Carroll, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 372–376.

## Chemoenzymatic synthesis, structural study and biological activity of novel indolizidine and quinolizidine iminocyclitols†

Livia Gómez,<sup>a</sup> Xavier Garrabou,<sup>a</sup> Jesús Joglar,<sup>a</sup> Jordi Bujons,<sup>a</sup> Teodor Parella,<sup>b</sup> Cristina Vilaplana,<sup>c</sup> Pere Joan Cardona<sup>c</sup> and Pere Clapés<sup>\*a</sup>

Received 16th May 2012, Accepted 14th June 2012

DOI: 10.1039/c2ob25943e

The synthesis, conformational study and inhibitory properties of diverse indolizidine and quinolizidine iminocyclitols are described. The compounds were chemo-enzymatically synthesized by two-step aldol addition and reductive amination reactions. The aldol addition of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to *N*-Cbz-piperidine carbaldehyde derivatives catalyzed by *L*-rhamnulose 1-phosphate aldolase from *Escherichia coli* provides the key intermediates. The stereochemical outcome of both aldol addition and reductive amination depended upon the structure of the starting material and intermediates. The combination of both reactions furnished five indolizidine and six quinolizidine type iminocyclitols. A structural analysis by NMR and *in silico* density functional theory (DFT) calculations allowed us to determine the population of stereoisomers with the *trans* or *cis* ring fusion, as a consequence of the inversion of configuration of the bridgehead nitrogen. The *trans* fusion was by far the most stable, but for certain stereochemical configurations of the 3-hydroxymethyl and hydroxyl substituents both *trans* and *cis* fusion stereoisomers coexisted in different proportions. Some of the polyhydroxylated indolizidines and quinolizidines were shown to be moderate to good inhibitors against  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens*. Indolizidines were found to be moderate inhibitors of the rat intestinal sucrase and of the exoglucosidase amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. In spite of their activity against  $\alpha$ -L-rhamnosidase, all the compounds were ineffective to inhibit the growth of the *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis.

## Introduction

Polyhydroxylated indolizidines, *e.g.* D-swainsonine, castanospermine, lentiginosine, and steviamine (Fig. 1), and quinolizidines are conformationally restricted iminocyclitols. Several of them are effective glycosidase inhibitors and possess potential therapeutic applications as antidiabetic, antiviral, anticancer, antimetastatic and immunoregulating agents.<sup>1–4</sup>

Many efforts have been devoted to the chemical synthesis of polyhydroxylated indolizidine and quinolizidine iminocyclitols<sup>5,6</sup> as well as to evaluate their inhibitory properties against

glycoprocessing enzymes.<sup>3,4,7–10,11</sup> However, few studies on the use of aldolases to construct stereoselectively the polyhydroxylated scaffold have been reported.<sup>8</sup>

We have recently reported that iminocyclitols of the pyrrolizidine type can be expediently prepared by an aldol addition reaction of DHAP to *N*-Cbz-pyrrolizidine carbaldehyde derivatives from proline and 3- and 4-hydroxyproline derivatives catalyzed by *L*-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA) and the *L*-fucose-1-phosphate aldolase F131A mutant (FucA F131A) in good yields.<sup>12,13</sup> This chemo-enzymatic approach has been demonstrated to be attractive for the diversity-oriented synthesis.<sup>14</sup>

The versatility of this methodology has led us to explore the chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxylated indolizidines and quinolizidines in the frame of our ongoing project on the chemo-enzymatic synthesis of iminocyclitols. Our previous results prompted us to explore the use of *N*-Cbz-piperidine carbaldehyde derivatives as aldehyde acceptors to prepare novel polyhydroxylated indolizidine and quinolizidine iminocyclitols and test their preliminary biological activity as inhibitors of selected commercial glycosidases and rat intestinal disaccharide glycosidases. Inhibitors of digestive glycosidases decrease the post-prandial glycaemia by diminishing the rate of the digestion

<sup>a</sup>Dept Biological Chemistry and Molecular Modeling, Instituto de Química Avanzada de Cataluña, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain. E-mail: pere.clapes@iqac.csic.es

<sup>b</sup>Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>c</sup>Unitat de Tuberculosi Experimental, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Edifici Laboratoris de Recerca, Crtra. de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, 08916 Badalona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2ob25943e

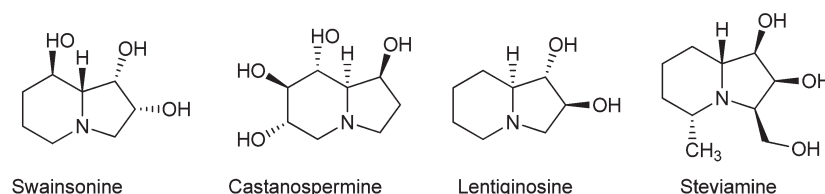
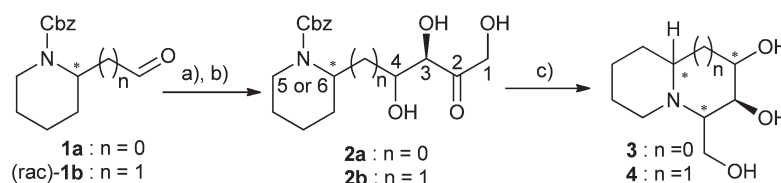


Fig. 1 Structures of biologically active indolizidine iminocyclitols.



Scheme 1 Chemoenzymatic synthesis of indolizidines and quinolizidine analogues: (a) dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and DHAP-dependent aldolase; (b) acid phosphatase, (c)  $\text{H}_2$ , Pd/C.

of dietary carbohydrates and, therefore, retarding the glucose absorption.<sup>15,16</sup> This is one of the therapeutic approaches to reduce the severity of diabetes mellitus type 2 and a way to prevent the metabolic syndrome associated with hypercaloric diets, provided that the inhibitor does not stimulate the insulin secretion.<sup>17,18</sup>

## Results and discussion

We focused our attention on the commercial (*R*) or (*S*)-*N*-Cbz-piperidin-2-carbaldehyde ((*S*)-**1a** and (*R*)-**1a**) and *rac*-*N*-Cbz-2-(piperidin-4-yl)acetaldehyde ((*rac*)-**1c**) which are the starting aldehydes of choice for the key enzymatic aldol addition with DHAP (Scheme 1). DHAP dependent aldolases, investigated in previous work,<sup>13</sup> L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA), L-fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) wild type and the mutants FucA F131A, FucA F206A and FucA F206A/F131A, were selected as potential biocatalysts. FucA F131A was particularly effective as a catalyst for the aldol addition of DHAP to (*R*) and (*S*)-*N*-Cbz-prolinal derivatives, and therefore it may be also effective for the piperidine derivatives.<sup>13</sup> Both FucA F206A and F206A/F131A were also designed to accommodate sterically demanding aldehyde acceptors. Although they were not as effective as the single F131A mutant, we considered that they could be worth trying towards piperidine derivatives. The screening (Table 1) revealed that the FucA catalysts rendered scarce yields which were not satisfactory from a preparative point of view. RhuA gave the best results and was the selected aldolase to scale up the reactions (Table 2).

The aldol adducts (*5S*)-**2a**, (*5R*)-**2a**, **2b** (*i.e.* product mix from (*rac*)-**1b**) obtained were converted into the corresponding indolizidines and quinolizidines by one pot two-step *N*-Cbz-deprotection/reductive amination with  $\text{H}_2$  (Scheme 1) in the presence of Pd/C, using the procedures previously published.<sup>13</sup> The iminocyclitols were purified by ion exchange chromatography, which rendered the pure compounds or mixtures of diastereomers (Table 2 and Fig. 2). From the structural analysis of the iminocyclitols thus obtained, it was inferred that the aldol addition of

DHAP to (*S*)-**1a** catalyzed by RhuA furnished the *syn* configuration of the aldol adduct, (*5S*)-**2a**, which was consistent with the results obtained with (*S*)-*N*-Cbz-prolinal derivatives.<sup>13</sup> On the other hand, its enantiomer, (*R*)-**1a**, furnished the (*5R*)-**2a** adduct as a *syn*:*anti* 2:3 mixture. This was not observed in the case of the pyrrolidine derivative, (*R*)-*N*-Cbz-prolinal, which exclusively provided the *syn* adduct.<sup>13</sup> Both enantiomers of (*rac*)-**1b** yielded aldol adducts, (*6S*)-**2b** and (*6R*)-**2b**, as *syn*:*anti* mixtures, the *syn* configuration being the major diastereomers (Table 2). According to our previous observations, the reductive amination of polyhydroxylated pyrrolizidines gave preferentially the 3-hydroxymethyl and 1-hydroxy groups in a *syn* orientation.<sup>13,14</sup> In the present case, the reductive amination followed this trend for (*5R*)-**2a** and (*6R*)-**2b** adducts furnishing the corresponding indolizidines with a 6:1 *syn*(*1R,3R* or *1S,3S*):*anti*(*1R,3S*) ratio and the quinolizidines with an ~8:1 *syn*(*2S,4S*):*anti*(*2S,4R* or *2R,4S*) ratio, respectively with the major configuration consistent with the stereochemistry reported in previous studies. On the other hand, for (*5S*)-**2a** and (*6S*)-**2b** adducts the reductive amination was not (dia)stereoselective furnishing *syn*:*anti* mixtures with 1:1 and ~1:2 ratios, respectively.

## Structural studies

Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift assignments for all derivatives **3a–e** and **4a–f** were performed by the aid of two-dimensional COSY and HSQC spectra. Furthermore, *J*(HH) coupling constants and NOESY data were required for the determination of the relative configuration of all stereogenic centers (see ESI† for detailed nOe contacts in each molecule). Another important question is whether a unique or several stereoisomers co-exist for each compound in solution. For the compounds considered in this work, *cis* and *trans* ring fusion can be achieved through inversion of the configuration at the bridgehead nitrogen with concomitant change of the conformation of the ring systems. In general, as it is known for decalin, most of them present a *trans* fusion that is energetically more stable. However, the

**Table 1** Aldol addition reaction of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to *N*-Cbz-piperidinaldehyde derivatives (*S*)-**1a**, (*R*)-**1a** and (*rac*)-**1b**, catalysed by FucA and RhuA DHAP-dependent aldolases

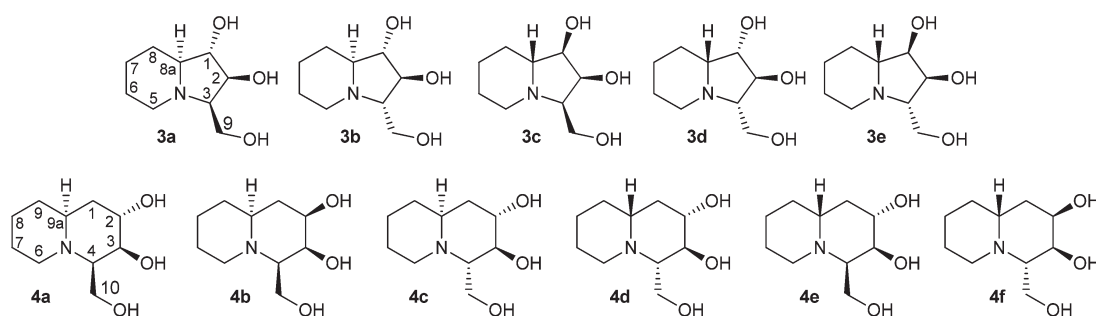
Aldehyde	FucA % aldol adduct; <sup>a</sup> ( <i>syn</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ) : <i>anti</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ))	FucA F131A % aldol adduct; <sup>a</sup> ( <i>syn</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ) : <i>anti</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ))	FucA F206A % aldol adduct; <sup>a</sup> ( <i>syn</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ) : <i>anti</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ))	FucA F131A/F206A % aldol adduct; <sup>a</sup> ( <i>syn</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ) : <i>anti</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ))	RhuA % aldol adduct; <sup>a</sup> ( <i>syn</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ) : <i>anti</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ))
( <i>S</i> )- <b>1a</b>	7 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	71; (>97 : 3)
( <i>R</i> )- <b>1a</b>	4 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	81; (40 : 60)
( <i>rac</i> )- <b>1b</b>	7 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	66; (°)

<sup>a</sup> Percentage of aldol adduct formed with respect to the limiting substrate DHAP. The amount of aldol adduct was determined by HPLC using an external standard method. <sup>b</sup> *syn*(3*R*,4*S*) : *anti*(3*R*,4*R*) ratio not determined. <sup>c</sup> See Table 2.

**Table 2** RhuA catalyzed synthesis of polyhydroxylated indolizidines and quinolizidines

Aldehyde	% <sup>a</sup>	Isolated yield %; aldol adduct	<i>syn</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ) : <i>anti</i> (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ) <sup>b</sup>	Isolated indolizidine or quinolizidine	Isolated amount (mg)
( <i>S</i> )- <b>1a</b>	71	34; ( <i>S</i> )- <b>2a</b>	>97 : 3	<b>3a</b> <b>3b</b>	20 20
( <i>R</i> )- <b>1a</b>	81	32; ( <i>S</i> )- <b>2a</b>	40 : 60	<b>3c</b> <b>3d</b> <b>3e</b>	13 11 4
( <i>rac</i> )- <b>1b</b>	66	54 <sup>c</sup>	64 : 36 <sup>d</sup>	<b>4a</b> <b>4b/4c/4f</b> 70 : 21 : 9 <b>4c/4b</b> 62 : 38 <b>4d</b> <b>4e</b> <b>4f</b>	17 17 25 47 3 3
		( <i>6S</i> )- <b>2b</b> and ( <i>6R</i> )- <b>2b</b>	87 : 13 <sup>e</sup>		

Conversions, isolated yields and stereochemical outcome of the aldol additions of DHAP to *N*-Cbz-piperidinaldehyde derivatives and the corresponding isolated bicyclic products. <sup>a</sup> Percentage of aldol adduct formed in the reaction mixture determined by HPLC with respect to the limiting (DHAP) reagent. <sup>b</sup> *syn* : *anti* ratio for the RhuA-catalyzed aldol addition reaction. Inferred from the stereochemical analysis of the polyhydroxylated quinolizidine and indolizidine derivatives obtained. <sup>c</sup> The adducts corresponding to (*6S*)-**2b** and (*6R*)-**2b** from the aldol addition of DHAP to (*rac*)-**1b** were not separated by HPLC. <sup>d</sup> *syn* : *anti* ratio for the (*6S*)-**2b** adduct. <sup>e</sup> *syn* : *anti* ratio for the (*6R*)-**2b** adduct.

**Fig. 2** Polyhydroxylated indolizidines and quinolizidines generated by enzymatic aldol addition, dephosphorylation and reductive amination steps.

pattern substitution and the relative configuration of the hydroxyl and hydroxymethylene groups play an important role to understand the conformational aspects of the five- or six-membered rings and to know the existence of different *cis*–*trans* fused stereoisomers.

<sup>1</sup>H NMR spectra of the different indolizidine derivatives **3a**–**e** showed clear signals at room temperature. Two sets of stereoisomeric-related compounds (**3a/3d/3e** vs. **3b/3c**) were distinguished that could be correlated from the relative *cis/trans* configuration between the C3 and C8a stereocenters. Thus, distinctive upfield effects on H8a and H3 chemical shifts owing to their well-defined axial positions, high diastereotopicity for the two H5 methylene protons ( $\Delta\delta = 1.1$  ppm vs. 0.2/0.3 ppm)

owing to well-defined axial–equatorial positions, and characteristic downfield effects on the methylene C5 chemical shift were clearly observed for the **3a/3d/3e** compounds, which practically exist as a single *trans* stereoisomer (see ESI Table S1†). Otherwise, the relative configuration of the C1–C2–C3 centers could be determined from their corresponding chemical shift values as well as from the characteristic nOe data (see ESI†). On the other hand, compounds **3b** and **3c** present relevant chemical shift differences for H8a, H3, H5 protons and for the C5 carbon (see ESI Table S1†). In addition, characteristic nOe data evidenced the presence of different *cis/trans* states in fast equilibrium on the NMR timescale, in quite good agreement with theoretical calculations (see below).

<sup>1</sup>H NMR spectra of the different quinolizidine derivatives **4a–f** also show clear signals at room temperature except for **4e** that shows some broad signals due to some slow dynamic equilibria on the NMR timescale. In all these compounds, the well-defined chair conformation related to a six-membered ring allows a more simple analysis of chemical shifts and *J*(HH) values. The relative configuration of the C2/C3/C4 is easily determined from *J*(HH) and nOe data (see ESI†). Large axial–axial *J*(HH) values (8–9 Hz) and characteristic 1,3-diaxial nOe contacts among others confirm the axial position whereas smaller *J*(HH) values and the absence of 1,3-diaxial nOe contacts confirm the equatorial position of H2/H3/H4 protons. In addition, the relative configuration of the C4 center is determined in all compounds from the hydroxymethyl C10 chemical shift as well as from key nOe contacts (see ESI Table S2 and Fig. S1–S12†). Exclusive *trans* stereoisomers are clearly determined for compounds **4a**, **4b**, **4d** and **4f** whereas important contributions of the *cis* stereoisomer must be effective for **4c** and **4e**. As discussed above, there is a strong correlation between the relative configurations of C4 and C9a centers in *trans* fused products as observed from the following experimental NMR data (see ESI Table S2†): (i) a notorious upfield effect on H9a and H4 chemical shifts, (ii) a high diastereotopicity for the two H6 methylene protons owing to a clear axial–equatorial position, and (iii) characteristic C6 and C9 chemical shifts. All these experimental aspects are also in strong agreement with theoretical calculations (see below).

To corroborate the NMR results, an *in silico* conformational analysis of compounds **3a–e** and **4a–f** was carried out by using density functional theory (DFT) calculations (see ESI†). Two additional model compounds, 1-deoxy-castanospermine (DOC) and 1-deoxy-8a-*epi*-castanospermine (DOEC), which have been reported to exist as <sup>8</sup>C<sub>5</sub> and <sup>5</sup>C<sub>8</sub> stereoisomers in solution,<sup>19</sup> were also analyzed to assess the suitability of the method used. The results for these model compounds were in good agreement with the experimental observations, showing that all DOC minima detected showed *trans*-fused <sup>8</sup>C<sub>5</sub> geometry, while for DOEC an 8 : 2 *trans*-<sup>5</sup>C<sub>8</sub> : *cis*-<sup>8</sup>C<sub>5</sub> ratio was estimated (Table 3). Furthermore, among the indolizidines synthesized in this work, significant populations of *cis*-fused stereoisomers were only

determined for compounds **3b** and **3c**, while **3a**, **3d** and **3e** yielded exclusively *trans*-fused ones (Table 3, Fig. 3 and ESI Table S3, Chart S1 and Fig. S15†). On the other hand, among the quinolizidines, only **4c** and **4e** showed a significant contribution of *cis*-fused stereoisomers. Thus, the theoretical results obtained support the analysis of the NMR data of the compounds synthesized.

**Inhibitory activity against glycosidases, rat intestinal disaccharidases and endo/exoglycosidases.** The polyhydroxylated indolizidines **3a–e** and quinolizidines **4a–f** synthesized were tested as inhibitors against commercial glycosidases (Table 4) and rat intestinal disaccharidases (Table 5) as preliminary targets for inhibition. Their activity was compared with the known glycosidase inhibitors 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB1, **8**), 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol (LAB1, **9**), D-fagomine (**10**) and L-fagomine (**11**) (Fig. 4). D-Fagomine (**10**) effectively lowers blood glucose in a dose-dependent manner when ingested together with sucrose or starch, without stimulating insulin secretion.<sup>15</sup>

**Indolizidines.** Compounds **3a–e** can be considered ring extended analogues of the pyrrolidines **8** and **9** (Fig. 4) but also analogues of lentiginosine and swainsonine (Fig. 1).<sup>9,20</sup> Lentiginosine was a selective inhibitor of amyloglucosidases from *Aspergillus niger* and *Rhizopus* mold but does not inhibit rat intestinal sucrase and maltase as well as α-D-glucosidase from Baker's yeast, β-D-glucosidase from almonds and *A. niger* and α-D-mannosidase from jack beans.<sup>21</sup> Swainsonine is a strong inhibitor of α-D-mannosidase from different origins (IC<sub>50</sub> = 0.1 μM, against α-D-mannosidase from jack beans).<sup>2,20</sup>

Interestingly, we found that compounds **3a** and **3e** are selective inhibitors of α-L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens*, while **3c** was found to inhibit also α-D-mannosidase and moderately, α-L-fucosidase (Table 4). Product **3b** was also found to be a weak inhibitor of α-D-glucosidase from Baker's yeast. Among the indolizidines synthesized in this work, **3a** was the most potent inhibitor (Table 4) of α-L-rhamnosidase. Because **3a** has no activity with the other commercial glycosidases tested (Table 4) nor against rat intestinal glycosidases (see below, Table 5), this may indicate a highly selective inhibitor of α-L-rhamnosidase. Changing the configuration of any stereogenic centre resulted in a loss of inhibitory properties.

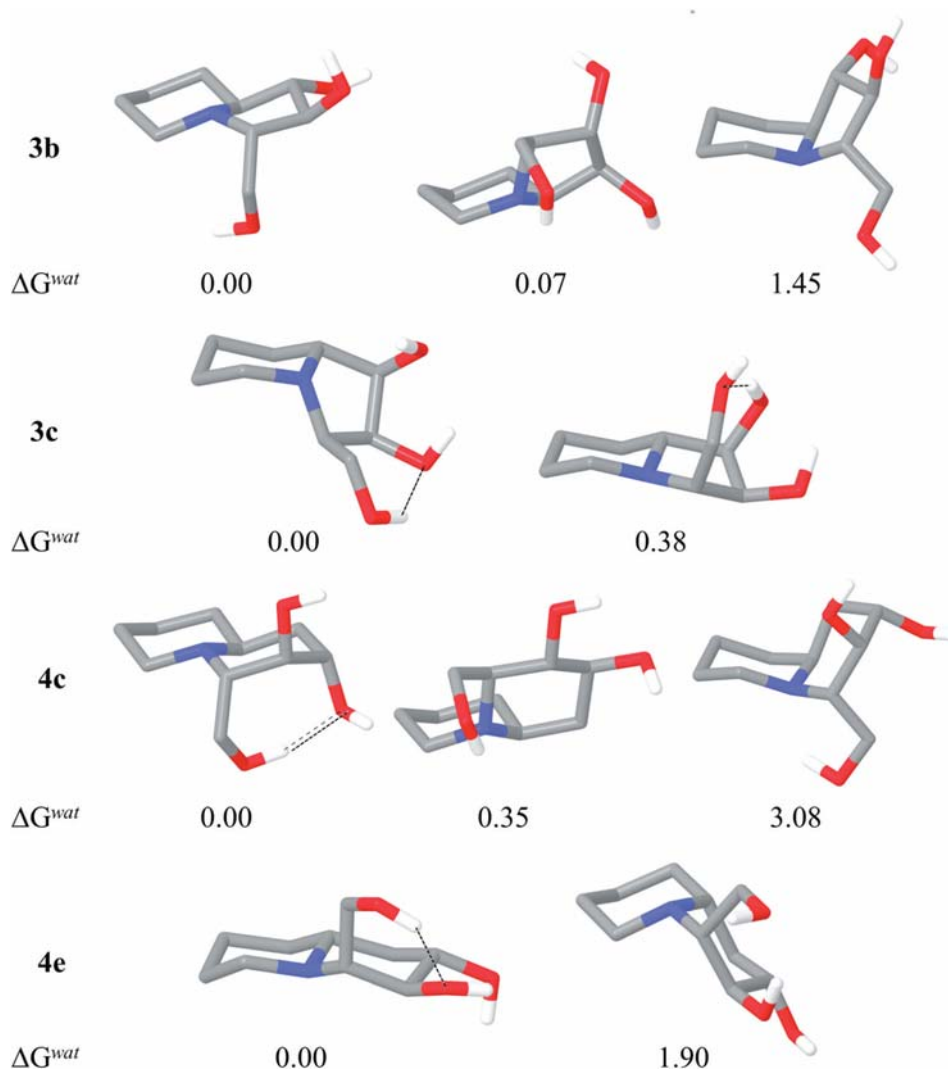
Regarding the inhibitory properties against rat intestinal glycosidases, **3b**, **3c**, and **3e** are selective inhibitors of rat intestinal sucrase (Table 5). Interestingly, **3b** has an IC<sub>50</sub> against sucrase comparable to DAB1 (**8**) and lower than that of D- and L-fagomine. D-Fagomine effectively lowers the postprandial glycaemia and therefore compound **3b** is a promising analogue with a potential application in controlling blood glucose levels.

**Quinolizidines.** The polyhydroxylated quinolizidines **4a–f** can also be considered ring extended analogues of **10** and **11**. They can also be seen as deoxy analogues of quinolizidine (**12**) (Fig. 3), which was reported by Liu *et al.*<sup>7</sup> and it was found to be a potent inhibitor of α-D-glucosidase I from pig kidney (IC<sub>50</sub> = 0.15 μM).

Interestingly, among the quinolizidines, only **4e** and **4f** were found to be selective inhibitors of α-L-rhamnosidase (Table 4). Moreover, **4a** and **4d** were selective but weak inhibitors of rat

**Table 3** Relative population of *trans* and *cis* stereoisomers in water solution for compounds **3a–e**, **4a–f**, 1-deoxycastanospermine (DOC) and 1-deoxy-8a-*epi*-castanospermine (DOEC) determined from DFT calculations and calculated as the sum of Boltzmann contributions of the stereoisomers of each type

Compound	<i>trans</i> (%)	<i>cis</i> (%)
<b>3a</b>	100	
<b>3b</b>	73.2	26.8
<b>3c</b>	56.9	43.1
<b>3d</b>	100	
<b>3e</b>	100	
<b>4a</b>	100	
<b>4b</b>	100	
<b>4c</b>	48.6	51.4
<b>4d</b>	100	
<b>4e</b>	96.4	3.6
<b>4f</b>	100	
DOC	100	
DOEC	81.0	19.0



**Fig. 3** Minimum energy *cis/trans*-stereoisomers determined for compounds **3b**, **3c**, **4c** and **4e**, and relative Gibbs free energies in water solution ( $\Delta G^{\text{wat}}$ , kcal mol<sup>-1</sup>) estimated through density functional theory calculations at B3LYP/cc-pVTZ(-f) level.

intestinal sucrase (Table 5). The rest of the compounds showed no inhibitory activity against both the selected commercial glycosidases and the rat intestinal disaccharidases tested. Most of the quinolizidines described in the literature are either weak inhibitors or inactive against the most common commercial glycosidases.<sup>4,11</sup>

**Inhibitory properties against endo and exoglucosidases.** The indolizidines and quinolizidines were also assayed as inhibitors of the endoglucosidase  $\alpha$ -amylase from human saliva and porcine pancreas.<sup>6,23</sup> Two substrates were used: starch and the chromophore-tagged starch-azure.<sup>24</sup> The compounds synthesized, including the parent DAB1 (**8**), LAB1 (**9**), D-fagomine (**10**) and L-fagomine (**11**), were inactive against the  $\alpha$ -amylases. The amyloglucosidase from *A. niger* was selected as *exoglucosidase* using *p*-nitrophenyl glucopyranoside as the substrate. Among the parent compounds, DAB1 (**8**) was the most potent inhibitor while **9**, **10** and **11** were moderate to weak inhibitors of

amyloglucosidase, the D-series of these iminocyclitols being more potent than the corresponding L-ones (Table 6). Among the indolizidines, **3d** had moderate activity, comparable to LAB1 (**9**) and D-fagomine (**10**), while compounds **3a** and **3b** were >10-fold less active (Table 6). Interestingly, **3a** and **3b** are 3-hydroxymethyl analogues of (+)-lentiginosine, which is a potent and selective inhibitor of *A. niger* amyloglucosidase ( $K_i = 2 \mu\text{M}^9$ ). Thus, the introduction of a hydroxymethyl substituent with *R/S*-configuration at C-3 of (+)-lentiginosine leads to a strong decrease of its activity. However, this effect is partially reverted if the (3*S*)-hydroxymethyl substitution is combined with the epimeric configuration at C-8a (*i.e.* **3d**). On the other hand, no activity was observed with the quinolizidines synthesized.

**Inhibition of the glucose release from starch hydrolysis.** We explore the ability of the compounds synthesized to inhibit the release of glucose from the hydrolysis of starch by the gut mucosal suspension from rat intestine. In this case starch can be

**Table 4** Activities, IC<sub>50</sub> (μM) and K<sub>i</sub> (μM) (in parenthesis), of the compounds synthesized against commercial glycosidases<sup>a</sup>

Compound	α-D-Glucosidase <sup>b</sup>	α-D-Glucosidase <sup>c</sup>	β-D-Glucosidase <sup>d</sup>	β-D-Galactosidase <sup>e</sup>	α-L-Rhamnosidase <sup>f</sup>	α-D-Mannosidase <sup>g</sup>	α-L-Fucosidase <sup>h</sup>
<b>8</b> <sup>i</sup>	0.33 ± 0.02 (0.17 ± 0.01) C	61 ± 7 (104 ± 75) C	276 ± 25 (100 ± 64) C	n.i.	n.i.	286 ± 27 (111 ± 60) NC, α > 1	20 ± 1 (5 ± 1) C
<b>9</b> <sup>i</sup>	1.8 ± 0.1 (0.8 ± 0.1) NC, α = 1	0.05 ± 0.01 (0.04 ± 0.01) NC, α > 1	685 ± 112 (1014 ± 81) NC, α > 1	n.i.	56 ± 5 (98 ± 5) NC, α = 1	n.i.	n.i.
<b>10</b> <sup>i</sup>	n.i.	126 ± 7 (236 ± 61) C	n.i.	154 ± 22 (76 ± 21) C <sup>j</sup>	n.i.	n.i.	n.i.
<b>11</b> <sup>i</sup>	n.i.	61 ± 7 (18 ± 8) C	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>3a</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3.3 ± 0.2 (3.0 ± 0.8) NC, α = 1	n.i.	n.i.
<b>3b</b>	n.i.	237 ± 68 (229 ± 44) C	n.i.	n.i.	113 ± 30 (84 ± 9) NC, α = 1	n.i.	n.i.
<b>3c</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	35 ± 2 (21 ± 2) C	82 ± 9 (89 ± 1) C	593 ± 86 (135 ± 28) C
<b>3e</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	55 ± 4 (52 ± 3) C	n.i.	n.i.
<b>4e</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	26 ± 5 (17 ± 2) C	n.i.	n.i.
<b>4f</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	85 ± 24 (76 ± 7) C	n.i.	n.i.

<sup>a</sup> Data are means of triplicate experiments ± standard error of the mean (SE). <sup>b</sup> From Baker's yeast. <sup>c</sup> From rice. <sup>d</sup> From sweet almonds. <sup>e</sup> From bovine liver. <sup>f</sup> From *Penicillium decumbens*. <sup>g</sup> From jack beans, *Genus canavalia*. <sup>h</sup> From bovine kidney. <sup>i</sup> Data from ref. 13. C: competitive inhibition. NC: non-competitive inhibition. <sup>j</sup> n.i. no inhibition, that is IC<sub>50</sub> ≥ 1 mM.

**Table 5** IC<sub>50</sub> (μM) values of the compounds synthesized against rat intestinal disaccharide glycosidases<sup>a</sup>

Compound	Sucrase	Lactase	Trehalase	Maltase
<b>8</b> <sup>b</sup>	22 ± 12	140 ± 84	67 ± 19	50 ± 36
<b>9</b> <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02	50 ± 36	74 ± 34	0.2 ± 0.1
<b>10</b> <sup>b</sup>	144 ± 26	n.i.	n.i.	n.i.
<b>11</b> <sup>b</sup>	484 ± 4	n.i.	n.i.	209 ± 92
<b>3b</b>	62 ± 3	n.i.	n.i.	293 ± 19
<b>3c</b>	207 ± 44	n.i.	n.i.	n.i.
<b>3e</b>	117 ± 6	n.i.	n.i.	n.i.
<b>4a</b>	339 ± 266	n.i.	n.i.	n.i.
<b>4d</b>	824 ± 288	n.i.	n.i.	n.i.
Activity (UI) <sup>c</sup>	4.01 ± 0.48	0.75 ± 0.07	2.44 ± 0.41	27.50 ± 3.55

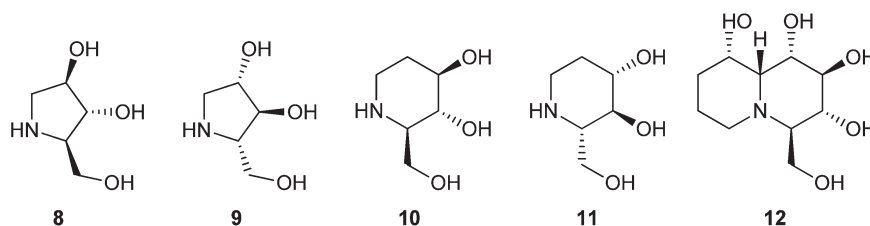
<sup>a</sup> The experiments were performed in triplicate for each set of disaccharide glycosidases obtained from one rat. Two different rats (*n* = 2) were used. Activities are expressed as μM ± standard error of the mean (SE). <sup>b</sup> Data from ref. 13. <sup>c</sup> Definition of activity: 1 U corresponds to 1 μmol of glucose formation per hour at 37 °C in phosphate buffer, pH 6.8. n.i. no inhibition, IC<sub>50</sub> ≥ 1 mM.

hydrolysed by the amylases and amyloglucosidases releasing glucose and other reducing oligosaccharides, which can be further hydrolysed by the presence of disaccharidases.<sup>18</sup> The Dahlqvist methodology<sup>25</sup> was employed to measure the glucose formed and therefore the activity was determined as the rate of glucose formation (Table 6). Among the parent compounds,

LAB1 (**9**) was found to be a strong inhibitor of the glucose release from starch followed by DAB1 (**8**), which had good inhibitory properties. D-Fagomine (**10**) was a moderate inhibitor whereas its enantiomer, **11**, was only a weak inhibitor. Among the compounds synthesized, only the indolizidine **3b** was found to be a weak inhibitor, with an activity comparable to that of L-fagomine (**11**). The inhibition of glucose released from the starch hydrolysis is consistent with the observed disaccharidase inhibition (Table 5): DAB1 (**8**) and LAB1 (**9**) inhibited all the intestinal disaccharidases assayed whereas L-fagomine (**11**) was a weak inhibitor of sucrase and maltase, D-fagomine (**10**) being a weak inhibitor of sucrase. Compound **3b** was comparable to L-fagomine and did not correlate well with the observed activities against intestinal disaccharidases and amyloglucosidase from *A. niger*.

**Inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv laboratory strain.** The L-rhamnopyranosyl moiety is present in a disaccharide linker between the arabinogalactan polysaccharide and peptidoglycan regions of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis.<sup>26,27</sup> Therefore inhibitors either of thymidine diphosphate-(dTDP)-rhamnose biosynthesis from dTDP-glucose or of incorporation of L-rhamnose into the mycobacterial cell wall may have potential as novel chemotherapeutic agents for the treatment of mycobacterial infection.<sup>27,28</sup> It has been suggested that iminocyclitol derivative inhibitors of α-L-rhamnosidase from *P. decumbens* could have





**Fig. 4** Structures of polyhydroxylated pyrrolidine and piperidine iminocyclitols with known glycosidase inhibitory properties, analogues of the indolizidines **3a–e** and quinolizidines **4a–f**.

**Table 6** Activities of the parent and synthesized compounds as inhibitors of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* and as inhibitors of the glucose release from the hydrolysis of starch by the rat intestinal mucosa

Compound	Amyloglucosidase <i>A. niger</i> IC <sub>50</sub> (μM)	Intestinal mucosa <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
<b>8</b>	6.7 ± 1.8	15.4 ± 2.1
<b>9</b>	43 ± 14	0.34 ± 0.03
<b>10</b>	27 ± 3	78 ± 13
<b>11</b>	98 ± 11	160 ± 30
<b>3a</b>	366 ± 29	n.i.
<b>3b</b>	347 ± 145	237 ± 51
<b>3d</b>	26 ± 9	n.i.

<sup>a</sup> Activity (U) = 20.8 ± 2.4. Definition of activity: 1 U corresponds to 1 μmol of glucose formation per hour at 37 °C in phosphate buffer pH 6.8. <sup>b</sup> IC<sub>50</sub>: concentration of the compound that is required for 50% reduction of the rate of glucose released per hour.

the ability to inhibit dTDP-L-rhamnose biosynthesis and therefore the bacterial growth.<sup>27</sup> Compounds **3a**, **3e**, **4e** and **4f** were good inhibitors of rhamnosidase, and thus they were assayed in mycobacterial systems. However, no differences were found between the positive growth control experiment and the one in the presence of **3a**, **3b**, **3c**, and **3e** at 3 mg mL<sup>-1</sup>, or **4e** and **4f** at 0.75 mg mL<sup>-1</sup>. The minimal inhibitory concentration (MIC) (*i.e.* the lowest drug concentration that prevented the development of color akin to the bacterial growth) of LAB1 (**9**) was 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. As a reference, the MIC value found for isoniazid in this assay was 0.25 μg mL<sup>-1</sup>, which is in good agreement with the reported values.<sup>29</sup>

## Conclusions

We have developed a new strategy based on RhuA catalysis for the diversity-oriented synthesis of polyhydroxylated indolizidine and quinolizidine iminocyclitols in two steps. The key reaction was the aldol addition of DHAP to *N*-Cbz-piperidin-2-carbaldehyde ((*S*)-**1a** and (*R*)-**1a**) or *rac*-*N*-Cbz-2-(piperidin-4-yl)acetaldehyde ((*rac*)-**1b**). Structural analysis of indolizidines **3a–e** and quinolizidines **4a–f** by means of NMR and *in silico* density functional theory (DFT) calculations showed populations of stereoisomers with *trans* or *cis* ring fusion, because of the inversion of configuration of the bridgehead nitrogen, that depends upon the stereochemistry of the hydroxymethyl and hydroxyl substituents. For instance, the indolizidine series **3a**, **3d** and **3e** showed exclusively a *trans* fused stereoisomer, whereas for **3b**

and **3c** both *trans* and *cis* coexisted. Interestingly **3b** and **3c** possess a *syn* configuration (*i.e.* 3*S*,8*aS* or 3*R*,8*aR*, respectively) between H8a and the 3-hydroxymethyl group. Similarly, in the quinolizidine series, **4c** and **4e** showed a coexistence of *trans/cis* fused stereoisomers while the *trans* was the most predominant for the rest. Indolizidines **3a–c** and **3e** and quinolizidines **4e** and **4f** are good inhibitors of α-L-rhamnosidase from *P. decumbens*. Among them, **3a** was the most potent and selective inhibitor of α-L-rhamnosidase synthesized in this work. Concerning the inhibitory properties of rat intestinal disaccharidases, **3b** has an activity comparable to LAB and higher than D-fagomine (**10**), a compound that effectively lowers postprandial glycaemia.<sup>15</sup> Regarding the activity against the exoglucosidase amyloglucosidase from *A. niger*, the indolizidine **3d** has inhibitory properties comparable to DAB1 and D-fagomine, being the most active among the compounds synthesized. However, **3d** was a weak inhibitor of the glucose release from the hydrolysis of the starch by intestinal mucosa, which did not correlate well with its inhibitory properties against rat intestinal disaccharidases and amyloglucosidase. Although **3a–c** and **3e** and quinolizidines **4e** and **4f** are good inhibitors of α-L-rhamnosidase, they did not show any activity against the *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain. Therefore, in this case no correlation was found between both activities.

## Experimental section

### Materials synthesis

Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) was obtained from the cyclic dimer precursor 2,5-diethoxy-*p*-dioxane-2,5-dimethanol-*O*-2'-*O*-5'-bisphosphate, which was synthesized in our lab using a procedure described by Jung *et al.*<sup>30</sup> with slight modifications. DHAP is released from the precursor by acidic hydrolysis at 65 °C. *N*-Cbz-amino aldehydes used in these studies were synthesized in our lab using procedures published in previous work.<sup>13</sup> L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase [Co<sup>II</sup>] (RhuA) (3.8 U mg<sup>-1</sup>) (1 U catalyzes the cleavage of 1 μmol of L-rhamnulose-1-phosphate per minute at 25 °C and pH 7.5 (100 mM Tris-HCl + 150 mM KCl)),<sup>31</sup> L-fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) (9.8 U mg<sup>-1</sup>) protein and mutants FucA F131A (0.1 U mg<sup>-1</sup>), FucA F206A (0.22 U mg<sup>-1</sup>) and FucA F131A/F206A (<0.005 U mg<sup>-1</sup>) were obtained as previously described (1 U cleaves 1 μmol of L-fuculose-1-phosphate per minute at 25 °C and pH 7.5 (100 mM Tris-HCl + 150 mM KCl)).<sup>13,32</sup> 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB1, **8**), 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol (LAB1, **9**), D-fagomine (**10**) and L-fagomine

(11) were synthesized following the procedures developed by us and described in previous work.<sup>33</sup> Aqueous borate solutions were prepared by adjusting the desired pH of a solution of boric acid with 2 M aq. NaOH. Acid phosphatase (PA, EC 3.1.3.2, 5.3 U mg<sup>-1</sup>) was from Sigma-Aldrich. All other solvents used were of analytical grade.

### Biological activity

Ketamine chlorhydrate, Imalgene 1000, was from Merial Laboratorios S.A. (Barcelona, Spain), xylacine, Rompun 2%, was from Química Farmacéutica S.A. (Barcelona, Spain). Starch from potatoes, starch azure, 4-hydroxybenzoic acid, 4-aminoantipyrine, glucose oxidase type II-S from *Aspergillus niger*, peroxidase type II from horseradish,  $\alpha$ -D-glucosidase from Baker's yeast;  $\alpha$ -D-glucosidase from rice;  $\beta$ -D-glucosidase from sweet almonds;  $\beta$ -D-galactosidase from bovine liver;  $\alpha$ -D-mannosidase from jack beans, *Genus Canavalia*;  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens*,  $\alpha$ -L-fucosidase from bovine kidney,  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas type I-A,  $\alpha$ -amylase from human saliva type XIII A and amyloglucosidase from *Aspergillus niger* and the synthetic substrates *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-rhamnopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-fucopyranoside were purchased from Sigma-Aldrich. Water for analytical and preparative HPLC and for the preparation of buffers and other assay solutions was obtained from an Arium® Pro Ultrapure Water Purification System (SartoriusStedim Biotech). All other solvents used were of analytical grade.

**NMR spectroscopy.** All NMR experiments were collected at 298 K in D<sub>2</sub>O solutions on a Bruker Avance DRX-500 NMR instrument operating at 500.13 MHz for <sup>1</sup>H and at 125.77 MHz for <sup>13</sup>C, equipped with a TXI cryoprobe with only Z-gradients. Conventional 1D <sup>1</sup>H and 1D <sup>13</sup>C, selective 1D TOCSY and selective 1D NOESY and 2D COSY, 2D HSQC, 2D multiplicity-edited HSQC and 2D NOESY experiments were collected using standard Bruker software and acquired under routine conditions.

**HPLC analyses.** HPLC analyses were performed on an RP-HPLC cartridge, 250 × 4 mm filled with Lichrosphere® 100, RP-18, 5  $\mu$ m (Merck) or on an RP-HPLC XBridge® C18, 5  $\mu$ m, 4.6 × 250 mm column (Waters). Samples (25  $\mu$ L) were withdrawn from the aldol reactions, dissolved in MeOH (1 mL) to stop the reaction and analysed by HPLC. The solvent system used was solvent (A) 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in H<sub>2</sub>O and solvent (B) 0.095% (v/v) TFA in ACN–H<sub>2</sub>O 4 : 1, gradient elution from 30% to 90% B over 30 min, flow rate 1 mL min<sup>-1</sup>, detection 215 nm, column temperature 30 °C. The amount of aldol adduct produced was quantified from the peak areas using an external standard methodology.

### Preparation of *N*-Cbz-aminoaldehydes

**(*R*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-formylpiperidine ((*R*)-1a).** (*R*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)pipecolic acid (5.0 g, 19.0 mmol) was dissolved in MeOH (20 mL) and the mixture was cooled down to 0 °C with an ice bath. To this solution, SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

(76.3 mmol, 5.56 mL) was added dropwise at such a rate as to maintain the reaction mixture below 4 °C. Stirring of the reaction mixture was continued at room temperature overnight. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the solid obtained washed with ethyl ether (5.1 g, 18.4 mmol, 97%). The methyl ester derivative (2.0 g, 7.2 mmol) was reduced by treatment with NaBH<sub>4</sub> (147.5 mmol, 5.6 g) using the procedure described by Luly *et al.* (method B) with slight modifications.<sup>34</sup> After the addition of NaBH<sub>4</sub> the reaction was allowed to warm up slowly until room temperature. The *N*-Cbz-aminoalcohol (1.5 g, 6.1 mmol) was oxidized by treatment with iodoxybenzoic acid (IBX)<sup>35</sup> using the procedures already described by us.<sup>12,14</sup> NMR spectra matched those previously published.<sup>36</sup>  $[\alpha]_D^{22} = +23.8$  (*c* 1.0 in CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.60 (s, 1H), 7.35 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 4.71 (d, *J* = 19.3 Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 2.95 (m, 1H), 2.22 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.26 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  200.8, 136.3, 128.4, 128.0, 127.8, 67.4, 61.0, 42.6, 42.4, 24.5, 23.3, 20.7. HRMS-ESI: *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub> 248.1281 [M + H<sup>+</sup>]; found 248.1275. This material was used directly in the next step without any further purification.

**(*S*)-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-formylpiperidine ((*S*)-1a).** The title compound was prepared according to the procedure described above. Similar yield and identical NMR spectra and HRMS-ESI to that of the *R* enantiomer were obtained.<sup>37</sup>  $[\alpha]_D^{22} = -26.5$  (*c* 1.0 in CHCl<sub>3</sub>). This material was used directly in the next step without any further purification.

***N*-Benzyloxycarbonyl-2-(2-oxoethyl)-piperidine (*rac*-1b).** To a solution of 2-(2-hydroxyethyl)piperidine (51.1 mmol, 6.60 g) in dioxane–water 4 : 1 (100 mL), Cbz-OSu (51.0 mmol, 12.7 g) in dioxane–water 4 : 1 (50 mL) was added dropwise at 25 °C. After stirring for 24 h, the mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved with ethyl acetate (150 mL) and washed successively with 5% w/v aq. citric acid (3 × 50 mL), 10% w/v aq. NaHCO<sub>3</sub> (3 × 50 mL) and brine (2 × 50 mL). After drying over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the organic layer was evaporated under reduced pressure affording a white solid of *N*-Cbz-2-(2-hydroxyethyl)piperidine (47.5 mmol, 12.5 g, 93%). Oxidation of *N*-Cbz-2-(2-hydroxyethyl)piperidine (15.2 mmol, 4.0 g) was efficiently carried out by treatment with iodoxybenzoic acid (IBX),<sup>35</sup> affording the title compound (14.6 mmol, 3.8 g, 96%) as a colorless oil. NMR spectra matched those previously published.<sup>38</sup> <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.70 (s, 1H), 7.33 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.92 (m, 1H), 4.09 (dd, *J* = 13.5, 9.7 Hz, 1H), 2.83 (td, *J* = 12.5, 8.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 8.0, 2.9 Hz, 1H), 2.59 (ddd, *J* = 15.7, 6.7, 2.1 Hz, 1H), 1.58 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  200.5, 155.1, 136.5, 128.4, 127.9, 127.8, 67.2, 46.1, 44.4, 39.5, 28.6, 25.1, 18.7. HRMS-ESI: *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub> [M + H<sup>+</sup>] 262.1438; found 262.1434. This material was used directly in the next step without any further purification.

**Enzymatic aldol reactions.** Analytical scale reactions (360  $\mu$ L total volume) were conducted in capped 2 mL test tubes stirred with a vortex mixer (VIBRAX VXR basic, Ika) at 1000 rpm and 4 °C. Aldehydes (*S*)-1a, (*R*)-1a and (*rac*)-1b (24.5  $\mu$ mol) were dissolved in dimethylformamide (72  $\mu$ L) and mixed with a sodium borate solution (47.2  $\mu$ L of 1.52 M, pH 7.0), a freshly

neutralized (pH 6.9–7.0) DHAP solution (141  $\mu\text{L}$ , 14.4  $\mu\text{mol}$ ), and the aldolase (for RhuA catalyzed reactions: 100  $\mu\text{L}$ , 0.19 mg of protein, 0.72 U corresponding to 2 U  $\text{mL}^{-1}$  reaction; for reactions with FucA wild-type or FucA mutants: 100  $\mu\text{L}$ , 0.29 mg of protein, corresponding to 2.9 U FucA wild-type (8 U  $\text{mL}^{-1}$ ), 0.029 U FucA F131A (0.08 U  $\text{mL}^{-1}$ ), 0.62 U FucA F206A (1.74 U  $\text{mL}^{-1}$ ), and 0.014 U FucA F131A/F206A (0.04 U  $\text{mL}^{-1}$ ) was added to start the aldol reaction. Conversions were measured at 24 h of reaction time. Reaction monitoring was done as follows: samples (25  $\mu\text{L}$ ) were withdrawn at several reaction times, diluted with methanol (1000  $\mu\text{L}$ ) and analyzed by HPLC under the conditions described above. In parallel, samples (25  $\mu\text{L}$ ) were mixed with a solution (25  $\mu\text{L}$ ) of acid phosphatase (5.3 U  $\text{mL}^{-1}$  in sodium citrate buffer 400 mM, pH 4.5) and incubated for 24 h. After dilution with methanol (975  $\mu\text{L}$ ), samples were analyzed by HPLC.

**Preparative enzymatic aldol additions.** Reactions at preparative scale (20–40 mL total volume) were performed in 100 mL Erlenmeyer flasks with screw caps. Aldehydes (*S*)-**1a** (1.7 mmol), (*R*)-**1a** (2.12 mmol) and (*rac*)-**1c** (3.4 mmol) (85 mM final concentration) were dissolved in DMF (the amount corresponding to 20% v/v of the total), and sodium borate buffer (1.0 M, pH = 7.0, 20% v/v of the total) was added. Then, the DHAP solution (volume corresponding to 60% v/v of the total, 50 mM final concentration, 1.7 equiv. per mol of aldehyde) at pH 6.9, freshly prepared as described above, was added dropwise while stirring at 4  $^{\circ}\text{C}$ , with a vortex mixer. Finally, RhuA (2 U  $\text{mL}^{-1}$  reaction mixture) was added and mixed again. The Erlenmeyer flask was placed on a horizontal shaking bath (200 rpm) at 4  $^{\circ}\text{C}$ . The reactions were monitored by HPLC. When the concentration of the aldol adduct was constant with time (1–3 days, 66–81%) the reaction was stopped by addition of MeOH (1.5 times the reaction volume). Then, methanol was evaporated and the aqueous solution washed with ethyl acetate to remove the unreacted N-protected amino aldehyde. The aqueous layer was collected, and the remaining ethyl acetate removed under reduced pressure and lyophilized. The solid obtained was dissolved in plain water (*ca.* 20 mL) and the pH was adjusted to 5.5 with TFA. To this solution, acid phosphatase (5.3 U  $\text{mmol}^{-1}$  phosphorylated adduct) was added. The reaction was followed by HPLC until no starting material was detected. Then, the reaction mixture was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose membrane filter. The filtrate was loaded onto an RP-Xterra<sup>®</sup> MS C<sub>18</sub> 10  $\mu\text{m}$  (19  $\times$  250 mm) column, and eluted with a gradient of CH<sub>3</sub>CN (8 to 56% over 30 min) in plain water. Pure fractions were pooled and lyophilized.

#### Removal of the Cbz group and reductive amination

The aldol adducts obtained (0.34–1.08 mmol) were dissolved in ethanol (5–10 mL), followed by the addition of plain water (20–50 mL). Pd/C (200 mg) was added. The reaction mixture was shaken under hydrogen (50 psi) overnight at room temperature. After removal of the catalyst by filtration through deactivated aluminum oxide, the pH of the filtrate was adjusted to pH 5.5 with formic acid (1 M), the solvent was removed under reduced pressure, and the product was lyophilized.

#### Purification by ion exchange chromatography

The polyhydroxylated indolizidine and quinolizidine derivatives **3a**, **3b**, **3c–e**, and **4a–f** were purified by ion exchange chromatography with an FPLC system by a procedure previously described by us.<sup>13,14</sup> CM-Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia) stationary phase in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> form was packed into a glass column (450–25 mm) to provide a final bed volume of 220 mL. The flow rate was 4 mL  $\text{min}^{-1}$ . The CM-Sepharose-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was washed initially with H<sub>2</sub>O. An aqueous solution of the crude material at pH 7 was then loaded onto the column. Minor colored impurities were washed away with H<sub>2</sub>O (150 mL, 3 bed volumes). The retained compounds were eluted with aqueous NH<sub>4</sub>OH (0.01 M): compounds **3a** and **3b** (load 100 mg): **3a**: elution volume, 256 mL (17.0 mg); **3b**: elution volume, 309 mL (21.3 mg); compounds **3c–3e** (load 40 mg): **3c**: elution volume, 120 mL (4.4 mg); **3d**: elution volume, 264 mL (14.0 mg); **3e**: elution volume, 408 mL (12.6 mg); compounds **4a–f** (load 242 mg), first elution with aqueous NH<sub>4</sub>OH (0.005 M): **4d**: elution volume, 448 mL (57.6 mg); **4e**: elution volume, 840 mL (3.9 mg); further fractions from this run were pooled, lyophilized, and reloaded (134.5 mg), elution with aqueous NH<sub>4</sub>OH (0.01 M): **4f**: elution volume, 560 mL (3.2 mg); **4b/4c/4f** mixture: elution volume, 608 mL (21.5 mg); **4b/4c** mixture: elution volume, 728 mL (14.1 mg); **4a**: elution volume, 1000 mL (23.1 mg). In each case, when necessary the operation was repeated until the whole crude sample was consumed. Pure fractions were pooled and lyophilized. Physical and NMR data are listed below. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra scans and assignments are given in the ESI.<sup>†</sup>

**(1S,2S,3R,8aS)-3-(Hydroxymethyl)octahydroindolizine-1,2-diol (3a).** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = –76.8 (*c* 1.9 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4.04 (1H, dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7.4, 4.4 Hz), 3.75 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 11.3, 7.3 Hz, 1H), 3.63 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 11.4, 4.7 Hz, 1H), 3.51 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 8.8, 4.4 Hz, 1H), 3.07 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 11.2 Hz, 1H), 2.54 (td, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7.2, 4.7 Hz, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.87 (m, 2H), 1.74 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.19 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O) 81.7, 75.3, 67.8, 67.7, 58.3, 52.1, 27.2, 23.8, 23.0. HRMS-ESI: *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> 188.1287 [M + H<sup>+</sup>]; found 188.1287.

**(1S,2S,3S,8aS)-3-(Hydroxymethyl)octahydroindolizine-1,2-diol (3b).** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = –3.5 (*c* 2.0 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.86 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 4.8 Hz, 1H), 3.78 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 12.1, 5.1 Hz, 1H), 3.71 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 12.1, 5.1 Hz, 1H), 3.67 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7.4, 5.1 Hz, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.60 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 10.5 Hz, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.24 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O): 80.6, 78.5, 67.5, 64.4, 59.5, 46.9, 26.6, 22.8, 22.1. HRMS-ESI: *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>: 188.1287 [M + H<sup>+</sup>]; found 188.1285.

**(1R,2S,3R,8aR)-3-(Hydroxymethyl)octahydroindolizine-1,2-diol (3c).** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = –8.7 (*c* 1.2 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4.39 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6.4 Hz, 1H), 3.87 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 5.7 Hz, 1H), 3.83 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 12.2, 5.0 Hz, 1H), 3.77 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 12.2, 5.5 Hz, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.02 (m, 1H), 2.97 (s, 1H), 2.83 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 10.0 Hz, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.50 (m, 2H), 1.30 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  73.6, 69.7, 64.2, 63.7, 57.8, 47.1, 25.3, 21.5, 21.3. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_9H_{17}NO_3$  188.1287 [M + H<sup>+</sup>]; found 188.1288.

**(1S,2S,3S,8aR)-3-(Hydroxymethyl)octahydroindolizine-1,2-diol (3d).**  $[\alpha]_D^{22} = +10.3$  ( $c$  1.3 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.84 (d, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 4.2 Hz, 1H), 3.74 (d, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 5.4 Hz, 1H), 3.72 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.9, 5.4 Hz, 1H), 3.66 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.9, 5.6 Hz, 1H), 3.18 (m, 1H), 2.32 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.06 (t,  $J$  = 11.2 Hz, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.61 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 14.4 Hz, 2H), 1.38 (m, 2H), 1.28 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  79.5, 77.8, 73.4, 67.5, 60.9, 52.5, 23.8, 23.8, 23.1. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_9H_{17}NO_3$  188.1287 [M + H<sup>+</sup>]; found 188.1285.

**(1R,2S,3S,8aR)-3-(Hydroxymethyl)octahydroindolizine-1,2-diol (3e).**  $[\alpha]_D^{22} = +37.9$  ( $c$  0.48 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.81 (dd,  $J$  = 7.0, 4.7 Hz, 1H), 3.67 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.6, 5.1 Hz, 1H), 3.59 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.6, 6.0 Hz, 1H), 3.49 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 9.2, 7.1 Hz, 1H), 3.11 (d, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 10.7 Hz, 1H), 2.30 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 10.5, 5.1 Hz, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.73 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 1.18 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  73.3, 73.1, 70.7, 67.6, 60.9, 52.0, 27.5, 24.1, 23.0. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_9H_{17}NO_3$  188.1287 [M + H<sup>+</sup>]; found 188.1284.

**(2S,3S,4R,9aS)-4-(Hydroxymethyl)octahydro-1H-quinolizine-2,3-diol (4a).**  $[\alpha]_D^{22} = -36.1$  ( $c$  1.6 in H<sub>2</sub>O) of the mixture. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.80 (m, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.09 (d, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.6 Hz, 1H), 2.45 (s, 1H), 2.30 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 10.8 Hz, 1H), 1.96 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.4 Hz, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.63 (d, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 12.3 Hz, 1H), 1.51 (m, 1H), 1.44 (m, 1H), 1.24 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  70.3, 67.2, 62.0, 61.3, 56.2, 51.2, 33.7, 32.0, 24.7, 23.4. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{19}NO_3$  202.1443 [M + H<sup>+</sup>]; found 202.1446.

**Mixture 4b : 4f : 4c 70 : 9 : 21**  $[\alpha]_D^{22} = -25.3$  ( $c$  1.7 in H<sub>2</sub>O) of the mixture. NMR data for product **(2R,3S,4R,9aS)-4-(hydroxymethyl)octahydro-1H-quinolizine-2,3-diol (4b)**. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.96 (s, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.78 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.7, 5.7 Hz, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.05 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.2 Hz, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.64 (m, 6H), 1.63 (m, 6H), 1.47 (m, 1H), 1.30 (m, 3H), 1.28 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  69.9, 68.7, 66.2, 61.0, 60.9, 51.3, 34.0, 31.7, 24.6, 22.9. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{19}NO_3$  202.1443 [M + H<sup>+</sup>]; found 202.1447.

**Mixture 4c : 4b 62 : 38.** NMR data for product **(2S,3S,4S,9aS)-4-(hydroxymethyl)octahydro-1H-quinolizine-2,3-diol (4c)**. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.85 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.35 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 8.5 Hz, 1H), 3.18 (s, 1H), 3.04 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.68 (td, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 13.7, 2.8 Hz, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.32 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  71.8, 68.6, 58.6, 57.1, 56.1, 49.1, 34.9, 24.5, 24.1, 18.4. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{19}NO_3$  202.1443 [M + H<sup>+</sup>]; found 202.1449.

**(2S,3S,4S,9aR)-4-(Hydroxymethyl)octahydro-1H-quinolizine-2,3-diol (4d).**  $[\alpha]_D^{22} = +18.8$  ( $c$  2.2 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.88 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 12.8, 2.1 Hz, 1H), 3.70 (dd,

<sup>3</sup> $J$ (H,H) = 12.7, 2.9 Hz, 1H), 3.42 (ddd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.9, 9.3, 5.1 Hz, 1H), 3.17 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 19.2, 9.9 Hz, 2H), 2.03 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 9.9 Hz, 1H), 1.86 (s, 2H), 1.80 (ddd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 12.8, 4.8, 2.0 Hz, 1H), 1.57 (m, 3H), 1.34 (m, 1H), 1.17 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  72.6, 72.4, 68.8, 59.8, 58.2, 51.2, 38.5, 32.1, 24.7, 23.6. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{19}NO_3$  202.1443 [M + H<sup>+</sup>]; found 202.1441.

**(2S,3S,4R,9aR)-4-(Hydroxymethyl)octahydro-1H-quinolizine-2,3-diol (4e).**  $[\alpha]_D^{22} = -14.3$  ( $c$  0.28 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.92 (m, 2H), 3.86 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 2.92 (brs, 1H), 2.74 (brs, 1H), 2.67 (brs, 2H), 1.76–1.30 (brs, 6H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  69.7, 66.9, 55.9, 51.4, 37.4, 31.7. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{19}NO_3$  202.1443 [M + H<sup>+</sup>]; found 202.1450.

**(2R,3S,4S,9aR)-4-(Hydroxymethyl)octahydro-1H-quinolizine-2,3-diol (4f).**  $[\alpha]_D^{22} = -30.2$  ( $c$  0.32 in H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.99 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 13.1 Hz, 1H), 3.92 (m, 3H), 3.74 (dd, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 12.8, 2.8 Hz, 1H), 3.26 (m, 1H), 2.36 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 10.7 Hz, 1H), 2.30 (d, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 10.0 Hz, 1H), 2.02 (t, <sup>3</sup> $J$ (H,H) = 11.9 Hz, 1H), 1.72 (m, 2H), 1.65 (m, 3H), 1.51 (m, 4H), 1.41 (m, 3H), 1.26 (m, 2H), 1.17 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  68.2, 67.2, 64.0, 57.8, 55.6, 51.0, 36.8, 31.7, 24.4, 23.3. HRMS-ESI:  $m/z$  calcd for  $C_{10}H_{19}NO_3$  202.1443 [M + H<sup>+</sup>]; found 202.1442.

#### Inhibitory activity assays

Enzymatic inhibition assays on commercial glycosidases, the kinetics of the inhibition, preparation of gut mucosal suspension and the inhibition assays on rat intestinal disaccharidases were performed as described in previous work.<sup>13</sup> The experimental details are summarized in the ESI.†

**$\alpha$ -Amylase activity.** This activity was assayed on  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas type I-A (A6255 Sigma-Aldrich) and  $\alpha$ -amylase from human saliva type XIII A (A1031 Sigma-Aldrich) using the Dahlqvist method and the starch azure assay. For the Dahlqvist method the activity was assayed in the same way as described for the mucosa (see ESI†). In this case, 30 U mL<sup>-1</sup> of  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas (95  $\mu$ L) or 2 U mL<sup>-1</sup> of  $\alpha$ -amylase from human saliva (95  $\mu$ L) was used. Each product was tested at concentrations ranging from 0.2 nM to 1 mM in the presence of 4 g L<sup>-1</sup> starch. For the starch-azure assay the reaction was carried out at 37 °C during 15 min in a total volume of 5 mL. The reaction mixture contained sodium phosphate buffer (18 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 45 mM NaCl, pH 7), starch azure (4.5 mL, 1.8% w/v),  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas (0.125 mg, 0.5 mL) and the inhibitor (1 mM, 50  $\mu$ L). After 15 min the suspension was filtered through cellulose filter Whatman 54 and the absorbance of the filtrate was measured spectrophotometrically at 595 nm. The absorbance was proportional to the activity of the enzyme.

**Amyloglucosidase activity.** The activity of amyloglucosidase was assayed on amyloglucosidase from *Aspergillus niger* in a total volume of 100  $\mu$ L, containing acetic buffer (10 mM, pH 5) using *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (5 mM) as the substrate and amyloglucosidase (28.8 U mL<sup>-1</sup>). Each potential inhibitor

was tested at concentrations ranging from 0.2 nM to 2 mM. The enzyme (20  $\mu\text{L}$ ) was pre-incubated in the presence of each product (1  $\mu\text{L}$ ) at 45  $^{\circ}\text{C}$  during 5 min. The reaction starts after the addition of the substrate (20  $\mu\text{L}$ ) at 45  $^{\circ}\text{C}$ . After 20 min the reaction was stopped by the addition of Tris-HCl 1 M (200  $\mu\text{L}$ ). The absorbance of the *p*-nitrophenol released at 405 nm is proportional to the enzyme activity.

**Starch digestion activity.** Starch digestion activity was determined by colorimetric measurement of the glucose release by the action of brush border enzymes on starch, according to the Dahlqvist method. Diluted homogenized mucosa (95  $\mu\text{L}$ ) in phosphate buffer pH 6.8 (300  $\mu\text{L}$ ) was preincubated during 30 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  with the inhibitor (5  $\mu\text{L}$ , to final concentrations ranging from 0.2 nM to 1 mM). Then starch was added (100  $\mu\text{L}$ , 4 g  $\text{L}^{-1}$  substrate), and the mixture was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  during 30 min with gentle shaking (250 rpm). The total volume was 500  $\mu\text{L}$ . The reaction was terminated after 30 min by the addition of Glucostat solution (2 mL, Tris 0.5 M, 4-hydroxybenzoic acid 10 mM, 4-aminoantipyrine 0.4 mM, glucose oxidase 1480  $\text{U L}^{-1}$ , peroxidase 250  $\text{U L}^{-1}$ , pH 7.3). After further incubation (2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ ) the amount of glucose was measured at 505 nm using an ELISA reader and 96-well plates. Activity ( $\mu\text{mol}$  of substrate hydrolyzed per hour) was normalized to protein content evaluated by the Bradford method. Starch digestion activity in the absence of inhibitor was  $20.79 \pm 2.39$   $\mu\text{mol glucose L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein. Each product was tested on the mucosa of five rats and each mucosa was assayed in triplicate.

**Minimum inhibitory concentration (MIC) determination. REMA plate method. Mycobacteria strain (*M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain).** The resazurin microtiter assay (REMA) plate method<sup>29</sup> was performed in Middlebrook 7H9 Broth medium supplemented with 0.2% glycerol, 0.5% albumin-dextrose catalase (Becton Dickinson) and 0.05% Tween 80 (7H9-S). Resazurin sodium salt powder (Sigma-Aldrich 199303-1G) was prepared at 0.01% w/v concentration in distilled water and sterilized by filtration through a 0.2  $\mu\text{m}$  membrane. The inoculum was prepared as follows: *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur was grown in 250 mL PYREX bottles in a shaking incubator at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 120 rpm in 7H9-S, it was left to grow to mid-log phase, and stored at  $-70$   $^{\circ}\text{C}$ . The inoculum was prepared by diluting an aliquot (3 mL) of the previous solution down to  $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  in 7H9-S.

Serial two-fold dilutions of each inhibitor in 7H9-S medium (100  $\mu\text{L}$ ) were prepared directly in 96-well plates at concentrations ranging from 3 mg  $\text{mL}^{-1}$  to 0.094 mg  $\text{mL}^{-1}$  for **3a**, **3b**, **3c**, and **3e** inhibitors and from 0.75 mg  $\text{mL}^{-1}$  to 0.012 mg  $\text{mL}^{-1}$  for **4e**, **4f** and LAB (**9**). Growth controls containing no antibiotic, sterility controls without inoculation and inhibition controls containing isoniazide (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were also included in the assay.

The assay was conducted as follows. The inoculum (100  $\mu\text{L}$ ) was added to the wells containing the inhibitors and to the corresponding control assays, the plates were covered, sealed, and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a standard atmosphere. After 6 days of incubation, resazurin solution (100  $\mu\text{L}$ ) was added to each well, incubated during 2 days at 37  $^{\circ}\text{C}$ , and assessed for color development. A change from blue to pink indicates reduction of resazurin and therefore bacterial growth. The MIC was defined as

the lowest drug concentration that prevented this color change. Experiments were performed in triplicate.

## Computational methods

All calculations were carried out with the package Schrödinger Suite 2011<sup>39</sup> through its graphical interphase Maestro.<sup>40</sup> Compounds **3a–4f**, DOC and DOEC were modeled in their neutral state. Conformational searches were carried out using the mixed MCMM/LMCS method<sup>41</sup> implemented in the program MacroModel,<sup>42</sup> with the default force field OPLS 2005, an enhanced version of the OPLSAA all atom force field<sup>43</sup> developed by Schrödinger to provide a larger coverage of organic functionality. All the minimum energy conformers detected within 5.0 kcal  $\text{mol}^{-1}$  from the lowest energy minimum for each compound were subjected to further minimization through density functional theory calculations at the B3LYP/6-31G\*\* level,<sup>44</sup> under water solvation conditions, with the program Jaguar.<sup>45</sup> Water solvation was implemented by using the standard Poisson–Boltzmann solver<sup>46</sup> included in Jaguar. Further single point calculations were carried out at the B3LYP/cc-pVTZ(-f) level<sup>47</sup> to recalculate the energies in solution and to calculate the vibrational frequencies, the zero-point energies (ZPE) and the thermal and entropic corrections at 298.15  $^{\circ}\text{K}$ . Boltzmann contributions for each conformation were determined from the relative free energies in solution ( $\Delta G^{\text{wat}}$ ). Most of these calculation steps were carried out through a Knime workflow<sup>48,49</sup> that uses Schrödinger Knime extensions to perform (1) the conformational search, (2) the DFT minimization, and (3) the single point DFT calculation automatically over a collection of structures.

## Acknowledgements

This work was supported by the Spanish MICINN CTQ2009–07359 and CTQ2009–08328, Generalitat de Catalunya (2009 SGR 00281), and ESF project COST CM0701. X. Garrabou acknowledges the CSIC for the I3P predoctoral scholarship and L. Gomez acknowledges Generalitat de Catalunya and Bioglane S.L.N.E. for the predoctoral contract.

## References

- 1 A. D. Elbein, R. Solf, P. R. Dorling and K. Vosbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**, 7393–7397; N. Asano, T. Yamashita, K. Yasuda, K. Ikeda, H. Kizu, Y. Kameda, A. Kato, R. J. Nash, H. S. Lee and K. S. Ryu, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4208–4213; N. Asano, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2003, **3**, 471–484; P. Greimel, J. Spreitz, A. E. Stutz and T. M. Wrodnigg, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2003, **3**, 513–523; J. P. Michael, *Nat. Prod. Rep.*, 2008, **25**, 139–165; N. Asano, in *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, ed. E. Fattorusso and O. Tagliatalata-Scafati, Wiley-VCH, Weinheim, 2008, pp. 111–138; N. Asano and H. Hashimoto, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, ed. B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta and J. Thiem, Springer, Berlin, 2nd edn, 2008, vol. 3, pp. 1887–1911; B. G. Winchester, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 645–651; X. G. Hu, B. Bartholomew, R. J. Nash, F. X. Wilson, G. W. J. Fleet, S. Nakagawa, A. Kato, Y. M. Jia, R. van Well and C. Y. Yu, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 2562–2565; G. Gradnig, A. Berger, V. Grassberger, A. E. Stütz and G. Legler, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 4889–4892.
- 2 A. E. Stutz, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- 3 A. Bastida, A. Fernandez-Mayoralas, R. G. Arrayas, F. Iradier, J. C. Carretero and E. Garcia-Junceda, *Chem.–Eur. J.*, 2001, **7**, 2390–2397;

- From *Synthesis Iminosugars to Therapeutic Applications*, ed. P. Compain and O. R. Martin, John Wiley & Sons Ltd, Sussex, England, 2007; W. H. Pearson and E. J. Hembre, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5546–5556.
- 4 W. H. Pearson and E. J. Hembre, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5537–5545.
  - 5 V. Ratovelomanana, L. Vidal, J. Royer and H. P. Husson, *Heterocycles*, 1991, **32**, 879–888; C. R. Johnson and B. A. Johns, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 7977–7980; J. C. Carretero, R. G. Arrayás and I. S. de Gracia, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 8537–8540; J. C. Carretero and R. G. Arrayas, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 2993–3005; G. Rassu, P. Carta, L. Pinna, L. Battistini, F. Zanardi, D. Acquotti and G. Casiraghi, *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, 1395–1400; P. Gebarowski and W. Sas, *Chem. Commun.*, 2001, 915–916; A. T. Carmona, J. Fuentes and I. Robina, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 8543–8546; F. M. Cordero, F. Pisaneschi, M. Gensini, A. Goti and A. Brandi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 1941–1951; S. H. L. Verhelst, B. Paez Martinez, M. S. M. Timmer, G. Lodder, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft and J. H. van Boom, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 9598–9603; D. D. Dhavale, S. M. Jachak, N. P. Karche and C. Trombini, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 3009–3016; D. D. Dhavale, S. M. Jachak, N. P. Karche and C. Trombini, *Synlett*, 2004, 1549–1552; D. Socha, K. Pasniczek, M. Jurczak, J. Solecka and M. Chmielewski, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 2005–2011; L. Song, E. N. Duesler and P. S. Mariano, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 7284–7293; K. Pasniczek, D. Socha, M. Jurczak, J. Solecka and M. Chmielewski, *Can. J. Chem.*, 2006, **84**, 534–539; F. Cardona, A. Goti and A. Brandi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, **2007**, 1551–1565; G. Lesma, A. Colombo, N. Landoni, A. Sacchetti and A. Silvani, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 1948–1954; T. Muramatsu, S. Yamashita, Y. Nakamura, M. Suzuki, N. Mase, H. Yoda and K. Takabe, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 8956–8959; M.-J. Chen and Y.-M. Tsai, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 6271–6274; K. Pasniczek, M. Jurczak, J. Solecka, Z. Urbańczyk-Lipkowska and M. Chmielewski, *J. Carbohydr. Chem.*, 2007, **26**, 195–211; X.-P. Jiang, Y. Cheng, G.-F. Shi and Z.-M. Kang, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2212–2215; G.-F. Shi, J.-Q. Li, X.-P. Jiang and Y. Cheng, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 5005–5012; S. Chandrasekhar, B. V. D. Vijaykumar and T. V. Pratap, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 746–750; R. Azzouz, C. Fruit, L. Bischoff and F. Marsais, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 1154–1157; M. A. Alam and Y. D. Vankar, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5534–5536; J. A. Tamayo, F. Franco, D. Lo Re and F. Sanchez-Cantalejo, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 5679–5682; X. Li, Z. Zhu, K. Duan, H. Chen, Z. Li, Z. Li and P. Zhang, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 2322–2328; B. Macchi, A. Minutolo, S. Grelli, F. Cardona, F. M. Cordero, A. Mastino and A. Brandi, *Glycobiology*, 2010, **20**, 500–506; L. Gang, W. Tian-Jun, R. Yuan-Ping and H. Pei-Qiang, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**, 5755–5768; I. Delso, T. Tejero, A. Goti and P. Merino, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 1220–1227; S. Chooprayoon, C. Kuhakarn, P. Tuchinda, V. Reutrakul and M. Pohmakotr, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 531–537; S. N. Murthy and Y. V. D. Nageswar, *Synthesis*, 2011, **2011**, 755–758; D. J. Wardrop and E. G. Bowen, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 2376–2379.
  - 6 K. S. A. Kumar, V. D. Chaudhari and D. D. Dhavale, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 703–711.
  - 7 P. S. Liu, R. S. Rogers, M. S. Kang and P. S. Sunkara, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 5853–5856.
  - 8 P. Zhou, H. M. Salleh and J. F. Honek, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 264–266.
  - 9 A. Brandi, S. Cicchi, F. M. Cordero, R. Frignoli, A. Goti, S. Picasso and P. Vogel, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 6806–6812.
  - 10 M. S. Kang, P. S. Liu, R. C. Bernotas, B. S. Harry and P. S. Sunkara, *Glycobiology*, 1995, **5**, 147–152; B. Davis, A. A. Bell, R. J. Nash, A. A. Watson, R. C. Griffiths, M. G. Jones, C. Smith and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 8565–8568; A. T. Carmona, J. Fuentes, I. Robina, E. Rodriguez Garcia, R. Demange, P. Vogel and A. L. Winters, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3874–3883; F. Cardona, G. Moreno, F. Guarna, P. Vogel, C. Schuetz, P. Merino and A. Goti, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 6552–6555; N. Langlois, B. K. Le Nguyen, P. Retailleau, C. Tarnus and E. Salomon, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 53–60; T. Ayad, Y. Genisson and M. Baltas, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 2626–2631; D. Baumann, K. Bennis, I. Ripoche, V. Théry and Y. Troin, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, **2008**, 5289–5300; M. A. Alam, A. Kumar and Y. D. Vankar, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, **2008**, 4972–4980; A. E. Hakansson, J. van Ameijde, G. Horne, R. J. Nash, M. R. Wormald, A. Kato, G. S. Besra, S. Gurcha and G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 179–184.
  - 11 C. Schaller and P. Vogel, *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 193–232; N. Kumari and Y. D. Vankar, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2104–2109; G. Pandey, D. Grahacharya, K. S. Shashidhara, M. I. Khan and V. G. Puranik, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 3300–3307.
  - 12 J. Calveras, J. Casas, T. Parella, J. Joglar and P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 1661–1666.
  - 13 X. Garrabou, L. Gomez, J. Joglar, S. Gil, T. Parella, J. Bujons and P. Clapés, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**, 10691–10706.
  - 14 J. Calveras, M. Egido-Gabás, L. Gómez, J. Casas, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons and P. Clapés, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 7310–7328.
  - 15 L. Gómez, E. Molinar-Toribio, M. Á. Calvo-Torras, C. Adelantado, M. E. Juan, J. M. Planas, X. Cañas, C. Lozano, S. Pumarola, P. Clapés and J. L. Torres, *Br. J. Nutr.*, 2012, **107**, 1739–1746.
  - 16 R. Eskandari, K. Jones, K. Ravinder Reddy, K. Jayakanthan, M. Chaudet, D. R. Rose and B. M. Pinto, *Chem.–Eur. J.*, 2011, **17**, 14817–14825.
  - 17 A. Ceriello, *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 2008, **5**, 260–268; R. R. Holman, C. A. Cull and R. C. Turner, *Diabetes Care*, 1999, **22**, 960–964.
  - 18 M. Cho, J. H. Han and S. You, *LWT–Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 1164–1171; J. Singh, A. Dartois and L. Kaur, *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, **21**, 168–180.
  - 19 N. T. Patil, J. N. Tilekar and D. D. Dhavale, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 747–749; N. T. Patil, J. N. Tilekar and D. D. Dhavale, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 1065–1074.
  - 20 E. J. Hembre and W. H. Pearson, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 11021–11032.
  - 21 I. Pastuszak, R. J. Molyneux, L. F. James and A. D. Elbein, *Biochemistry*, 1990, **29**, 1886–1891.
  - 22 *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists*, ed. R. A. Copeland, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2005.
  - 23 S. P. Sanap, S. Ghosh, A. M. Jabgunde, R. V. Pinjari, S. P. Gejji, S. Singh, B. A. Chopade and D. D. Dhavale, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 3307–3315.
  - 24 K. M. Park and N. S. Wang, *Biotechnol. Tech.*, 1991, **5**, 205–208; H. Rinderknecht, P. Wilding and B. J. Haverback, *Experientia*, 1967, **23**, 805.
  - 25 A. Dahlqvist, *Anal. Biochem.*, 1964, **7**, 18–25.
  - 26 J. P. Shilvock, J. R. Wheatley, R. J. Nash, A. A. Watson, R. C. Griffiths, T. D. Butters, M. Muller, D. J. Watkin, D. A. Winkler and G. W. J. Fleet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1999, 2735–2745.
  - 27 R. Lucas, P. Balbuena, J. C. Errey, M. A. Squire, S. S. Gurcha, M. McNeil, G. S. Besra and B. G. Davis, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2197–2199.
  - 28 J. A. Maddry, N. Bansal, L. E. Bermudez, R. N. Comber, I. M. Orme, W. J. Suling, L. N. Wilson and R. C. Reynolds, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 237–242.
  - 29 J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings and F. Portaels, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**, 2720–2722.
  - 30 S.-H. Jung, J.-H. Jeong, P. Miller and C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 7182–7184.
  - 31 L. Vidal, O. Durany, T. Suau, P. Ferrer, M. D. Benaiges and G. Caminal, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2003, **78**, 1171–1179; X. Garrabou, J. Joglar, T. Parella, J. Bujons and P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 89–99.
  - 32 O. Durany, G. Caminal, C. de Mas and J. Lopez-Santin, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1677–1684.
  - 33 J. A. Castillo, J. Calveras, J. Casas, M. Mitjans, M. P. Vinardell, T. Parella, T. Inoue, G. A. Sprenger, J. Joglar and P. Clapés, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 6067–6070; X. Garrabou, J. Calveras, J. Joglar, T. Parella, J. Bujons and P. Clapés, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 8430–8436; M. Gutierrez, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons and P. Clapés, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 5762–5764.
  - 34 J. R. Luly, J. F. Dellaria, J. J. Plattner, J. L. Soderquist and N. Yi, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 1487–1492.
  - 35 M. Oejo, J. L. Vicario, D. Badia, L. Carrillo and E. Reyes, *Synlett*, 2005, 2110–2112.
  - 36 D. Minato, Y. Nagasue, Y. Demizu and O. Onomura, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 9458–9461; T. Gehring, J. Podlech and A. Rothenberger, *Synthesis*, 2008, **2008**, 2476–2487.
  - 37 F. Sánchez-Sancho and B. Herradón, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, **9**, 1951–1965.
  - 38 A. Rouchaud and J.-C. Braekman, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, **2009**, 2666–2674; E. C. Carlson, L. K. Rathbone, H. Yang, N. D. Collett and R. G. Carter, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 5155–5158.
  - 39 Schrödinger, LLC, New York.
  - 40 Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
  - 41 I. Kolossvary and W. C. Guida, *J. Comput. Chem.*, 1999, **20**, 1671–1684.

- 42 MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
- 43 W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell and J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 11225–11236.
- 44 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648–5652; C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 1988, **37**, 785–789.
- 45 Jaguar, version 7.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
- 46 D. J. Tannor, B. Marten, R. Murphy, R. A. Friesner, D. Sitkoff, A. Nicholls, B. Honig, M. Ringnalda and W. A. Goddard III, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 11875–11882; B. Marten, K. Kim, C. Cortis, R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. N. Ringnalda, D. Sitkoff and B. Honig, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 11775–11788.
- 47 T. H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.*, 1989, **90**, 1007–1023; R. A. Kendall, T. H. Dunning Jr. and R. J. Harrison, *J. Chem. Phys.*, 1992, **96**, 6796–6806; D. E. Woon and T. H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 1358–1371; D. E. Woon and T. H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.*, 1994, **100**, 2975–2988.
- 48 Konstanz Information Miner, version 2.3.0.
- 49 M. R. Berthold, N. Cebon, F. Dill, T. R. Gabriel, T. Kötter, T. Meinl, P. Ohl, C. Sieb, K. Thiel and B. Wiswedel, *KNIME: The Konstanz Information Miner*, Springer, 2008.



## D-Fagomine lowers postprandial blood glucose and modulates bacterial adhesion

Livia Gómez<sup>1†</sup>, Eunice Molinar-Toribio<sup>2†</sup>, María Ángeles Calvo-Torras<sup>3</sup>, Carles Adelantado<sup>3</sup>, M. Emília Juan<sup>4</sup>, Joana M. Planas<sup>4</sup>, Xavier Cañas<sup>5</sup>, Carles Lozano<sup>1</sup>, Sergio Pumarola<sup>1</sup>, Pere Clapés<sup>2</sup> and Josep Lluís Torres<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bioglane SLNE, Tavern 17, 08006 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>4</sup>Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Segurat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Avinguda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Barcelona Science Park, Baldori Reixac 4-6, 08028 Barcelona, Spain

(Submitted 14 March 2011 – Final revision received 3 August 2011 – Accepted 8 August 2011 – First published online 3 October 2011)

### Abstract

D-Fagomine is an iminosugar originally isolated from seeds of buckwheat (*Fagopyrum sculentum* Moench), present in the human diet and now available as a pure crystalline product. We tested D-fagomine for activities connected to a reduction in the risk of developing insulin resistance, becoming overweight and suffering from an excess of potentially pathogenic bacteria. The activities were: intestinal sucrose inhibition *in vitro* (rat mucosa and everted intestine sleeves), modulation of postprandial blood glucose in rats, bacterial agglutination and bacterial adhesion to pig intestinal mucosa. When ingested together with sucrose or starch, D-fagomine lowered blood glucose in a dose-dependent manner without stimulating insulin secretion. D-Fagomine reduced the area under the curve (0–120 min) by 20% ( $P < 0.01$ ) and shifted the time to maximum blood glucose concentration ( $T_{max}$ ) by 15 min at doses of 1–2 mg/kg body weight when administered together with 1 g sucrose/kg body weight. Moreover, D-fagomine (0.14 mM) agglutinated 60% of Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) populations ( $P < 0.01$ ), while it did not show this effect on *Bifidobacterium* spp. or *Lactobacillus* spp. At the same concentration, D-fagomine significantly ( $P < 0.001$ ) inhibited the adhesion of Enterobacteriaceae (95–99% cells in the supernatant) and promoted the adhesion of *Lactobacillus acidophilus* (56% cells in the supernatant) to intestinal mucosa. D-Fagomine did not show any effect on bacterial cell viability. Based on all this evidence, D-fagomine may be used as a dietary ingredient or functional food component to reduce the health risks associated with an excessive intake of fast-digestible carbohydrates, or an excess of potentially pathogenic bacteria.

**Key words:** Fagomine: Iminosugars: Insulin resistance: Weight management: Microbiota

D-Fagomine (1,2-dideoxynojirimycin) is a six-membered ring iminocyclitol that was first isolated from seeds of buckwheat (*Fagopyrum sculentum* Moench, Polygonaceae)<sup>(1)</sup> and is also present in other plant sources such as mulberry (*Morus Alba*, Moraceae) leaves<sup>(2)</sup> and gogi (*Lycium chinense*) roots<sup>(3)</sup>. Iminocyclitols, also referred to as iminosugars, are carbohydrate analogues in which the endocyclic oxygen has been replaced by nitrogen (Fig. 1) and the spatial configurations of the hydroxyl groups are coincident with those of sugars (e.g. glucose, galactose, fucose and mannose). D-Fagomine was the first iminosugar found in plants and it

is present in the human diet, since buckwheat flour is used in the elaboration of many traditional foods including Japanese soba noodles, French galletes de Bretagne and Italian polenta. Another common iminocyclitol is 1-deoxynojirimycin (DNJ), which is the most abundant iminosugar found in mulberry<sup>(4)</sup>. D-Fagomine presents the molecular configuration of D-glucose and D-mannose on carbons 3, 4 and 5, while DNJ is a sugar mimetic of D-glucose. D-Fagomine and DNJ are particularly stable compounds, both chemically and metabolically<sup>(5)</sup>.

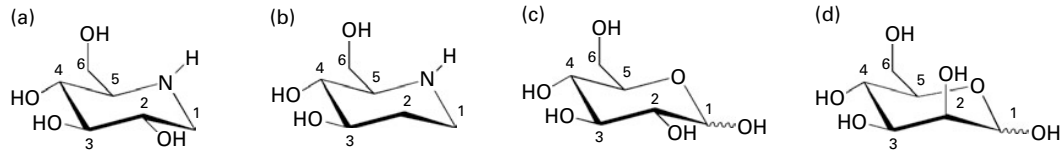
DNJ and other iminosugars are inhibitors of intestinal disaccharidases such as sucrase, lactase and maltase as well as other

**Abbreviations:** DNJ, 1-deoxynojirimycin; GI, glycaemic index; GL, glycaemic load; IR, insulin resistance.

\* **Corresponding author:** J. L. Torres, fax +34 93 204 5904, email josepluis.torres@iqac.csic.es

† L. G. and E. M.-T. contributed equally to this work.





**Fig. 1.** Chemical structures of iminocyclitols (a) 1-deoxynojirimycin and (b) D-fagomine) compared to configurationally similar monosaccharides ((c) D-glucose and (d) D-mannose).

glycosidases (i.e. exo- and endosaccharidases) that break down oligomeric and polymeric saccharides<sup>(2,6)</sup>. This inhibitory effect has the potential to quench and delay the hyperglycaemic response to oral sucrose and starch. This is nutritionally relevant because persistent hyperglycaemia from carbohydrate abuse may lead to insulin resistance (IR), elevated fasting blood glucose and excess weight. IR, elevated fasting blood glucose, increased waist circumference, dyslipidaemia and high blood pressure are factors in the so-called metabolic syndrome<sup>(7)</sup>. IR may develop into type 2 diabetes which carries with it a major risk of CVD which are by far the leading cause of morbidity and mortality in many countries, including the USA<sup>(8)</sup>. Obesity and type 2 diabetes are considered modern epidemics, and their incidence is particularly alarming among children and adolescents<sup>(9)</sup>. The problem is far from being satisfactorily addressed, considering the high availability and low cost of energy-dense foods compared to low-energy-density healthier alternatives<sup>(10,11)</sup>.

As iminocyclitols are sugar mimetics, they may also have the capacity to inhibit the protein–carbohydrate-mediated adhesion of bacteria to epithelial surfaces. This may be an important activity because the virulence of potentially deleterious strains such as *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is associated with their tight adhesion to mucosal surfaces, typically through lectins expressed in the tip of their fimbriae<sup>(12)</sup> while putatively beneficial bacteria, such as probiotic strains of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., are more loosely attached<sup>(13)</sup>. This would again be a particularly important activity of iminosugars, as the composition of the intestinal microbiota is influenced by dietary habits and gut micro-organisms play a role in the regulation of the host's energy homeostasis and fat storage<sup>(14)</sup>. The activity of iminosugars as antiadhesive binding agents and their potential role as modulators of bacterial adhesion have not been extensively researched. A recent paper linked the iminosugar DNJ to the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation<sup>(15)</sup>. Other authors<sup>(16)</sup> reported that the antiadhesive effect of hydrophobic *N*-alkylated-DNJ was due to the hydrophobic moiety, since DNJ itself was inactive.

In the search for new nutritional tools to reduce the risk of developing IR and becoming overweight, we considered D-fagomine (Fig. 1), a mild glycosidase inhibitor<sup>(17)</sup>, as a suitable candidate for a dietary ingredient and functional food component. Nothing has yet been reported concerning the effects of orally administered D-fagomine, possibly because, as a weak inhibitor *in vitro*, it has always been assumed that its *in vivo* efficacy would be limited. The only *in vivo* effect claimed for D-fagomine was the stimulation of insulin release after intraperitoneal administration to streptozotocin-diabetic mice<sup>(18)</sup>. We also considered that, due to its structural

similarity with D-mannose, D-fagomine could have some effects on bacterial adhesion. There are no previous reports of any antiadhesive activity of D-fagomine. The lack of information on the activities of oral D-fagomine may also be due to low availability from both natural and synthetic sources. However, an elegant and expedient chemo-enzymatic method has now been developed which is opening up the possibility of obtaining pure crystalline D-fagomine in g to kg quantities for thorough testing<sup>(19,20)</sup>. Using this preparation, we examine in the present study the modulation of both post-prandial blood glucose concentration and bacterial adhesion by D-fagomine.

## Materials and methods

### Reagents

D-Fagomine, provided by Bioglane (Barcelona, Spain) was manufactured following the patented proprietary enzymatic catalysis procedure described in WO2008025826A1. We used the resulting crystalline pure (assay 98%) preparation of D-fagomine (Fagopure<sup>®</sup>) to evaluate the activity of D-fagomine along the intestinal tract as a modulator of both glycosidase activity and bacterial adhesion. Other reagents and chemicals were: DNJ (Carbosynth Limited, Compton, Berkshire, UK), miglitol (Zhejiang Medicine Company Limited, Xinchang Pharma, Chongguan Town, China), acarbose (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), sucrose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), starch (maize starch C-TEX 06 201; Cargill-Cerestar, Martorell, Spain), phloridzin dihydrate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), ketamine chlorhydrate (Imalgene 1000; Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain), xylacine (Rompun 2%; Química Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain), 4-hydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 4-aminoantipyrine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), Glucose oxidase type II-S from *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Peroxidase Type II from horseradish (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Tris; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Water for the preparation of buffers and other assay solutions was obtained using a water purification Milli-Q system (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

### Rats and diets

A total of seventy-seven adult male Sprague–Dawley rats of 175–250 g body weight (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed in cages (*n* 3–4/cage) under controlled conditions of stable humidity (40–77%), and temperature (23°C) with a 12 h light–12 h dark cycle. The rats were fed *ad libitum*

a standard diet (Panlab A04; Panlab, Barcelona, Spain) and given water. To minimise circadian rhythm effects, rat manipulations were carried out in the morning. Handling and killing of the animals were in full accordance with the European Union guidelines for the care and management of laboratory animals and the pertinent permission was obtained from the CSIC Subcommittee of Bioethical Issues (ref. AGL2009-12374-C03-03). The authors further attest that all efforts were made to minimise the number of animals used and their suffering.

#### Sucrose/starch-loading test

The sucrose/starch-loading test was performed after a 12 h food deprivation period. A solution of sucrose or starch (1 or 2 g/kg body weight) together with the appropriate amount of the compound being tested was administered to the rats. Negative and positive control experiments were performed by administration of only water and carbohydrate solutions, respectively. The appropriate doses of D-fagomine (1, 2, 4 mg/kg body weight), DNJ, miglitol (*N*-hydroxyethyl-DNJ) and acarbose (2 mg/kg body weight) were administered as water solutions (5 ml/kg body weight) using a gastric probe. We used four or five animals for each condition tested. Blood samples were collected from the saphenous vein<sup>(21)</sup> at 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after administration. Blood glucose concentration was measured by the enzyme electrode method using a blood glucose meter Ascensia ELITE XL (Bayer Consumer Care AG, Basel, Switzerland). Insulin concentration was measured using the rat/mouse insulin ELISA kit from Millipore Corporation, in plasma obtained from blood samples (0.1 ml) collected into tubes containing EDTA at 0, 8, 15, 30, 60 and 120 min after administration. The plasma was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### Sucrase activity measurements on tissue homogenates and everted intestine sleeves

The activity of brush-border sucrase (glycosidase EC 3.2.1.48) was assayed on jejunal mucosa and everted intestine sleeves following Dahlqvist<sup>(22)</sup> and Lee *et al.*<sup>(23)</sup>. For the preparation of gut mucosal homogenates, the rats were fasted overnight and then anaesthetised with ketamine chlorhydrate (90 mg/kg body weight intraperitoneally) and xylacine (10 mg/kg body weight intraperitoneally). The anaesthetised rats were killed by cervical dislocation. The small intestine was removed, and carefully divided into duodenum, jejunum and ileum. The jejunum was washed with ice-cold isotonic saline (5 ml), opened lengthwise and the mucosa scraped off with a microscope slide. The samples were added to ice-cold isotonic saline (50 mg mucosa/ml) and homogenised using a T10 basic Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Germany). Sucrase activity was determined by colorimetric measurement of the glucose release by the action of sucrase on sucrose, according to the classic procedure in Dahlqvist<sup>(22)</sup>. Each product (D-fagomine, DNJ, miglitol, acarbose) was tested on the mucosa of five rats at concentrations ranging from 0.2 nM to 1 mM in the presence of 0.1 M-sucrose (substrate). Inhibitors (5  $\mu\text{l}$ ) and suitably diluted

homogenised mucosa (95  $\mu\text{l}$ ) were pre-incubated (30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ ); then the reaction was carried out in phosphate buffer pH 6.8 (300 ml) by the addition of the substrate (0.1 ml). Substrate, inhibitor and homogenised mucosa were incubated together (30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and 250 rpm) in triplicate. The reaction was terminated by the addition of Glucostat solution (2 ml) (Tris 0.5 M; 4-hydroxybenzoic acid 10 mM; 4-aminoantipyrine 0.4 mM; glucose oxidase 1480 IU/l (24.672  $\mu\text{katal/l}$ ), peroxidase 250 IU/l (4.167  $\mu\text{katal/l}$ ), pH 7.3). After further incubation (2.5 h at  $37^{\circ}\text{C}$ ), the amount of glucose was measured at 505 nm using an ELISA reader and ninety-six-well plates. Enzyme activity ( $\mu\text{mol}$  of substrate hydrolysed/h) was normalised to protein content evaluated by the Bradford method<sup>(24)</sup>.

To prepare the everted intestine sleeves, the jejunum was obtained as described previously, flushed with ice-cold isotonic saline (5 ml) and cut into 3-cm-long segments that were weighed. Each segment was everted using a plastic pipette tip (yellow) and both ends were secured by tying knots. The brush-border membrane facing the lumen *in vivo* now faced outwards. Because the glucose released by the action of sucrase would be taken up into the tissue by the GLUT, this was inhibited by pre-incubating the sleeves (30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and 250 rpm) in Ringer's solution containing the GLUT inhibitor phloridzin (0.5 mM)<sup>(23)</sup>. The sleeves then were incubated (16 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 7.3 and 250 rpm) in Ringer's solution (5 ml) containing sucrose (50 mM) as well as phloridzin (0.5 mM) and the appropriate concentration of the inhibitor (0.2 nM to 1 mM). After incubation, the sleeves were removed and aliquots (500  $\mu\text{l}$ ) of the incubation solution were added to tubes containing Glucostat solution (2 ml) in triplicate. These were then incubated (2 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and 250 rpm) and afterwards absorbance at 505 nm was read on a SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Sucrase activity ( $\mu\text{mol}$  of substrate hydrolysed/h) was normalised to mg of wet weight of the intestinal sleeve.

#### Bacterial agglutination

The strains used were obtained from the Bacterial Strain Collection of the Faculty of Veterinary Science at the Universitat Autònoma de Barcelona. Overnight cultures of each bacterial strain were inoculated into 100-ml flasks containing Luria medium to facilitate the production of fimbriae. The strains were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Colonies were grown on Luria medium Agar plates (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) and after 24 h of incubation, several dilutions were prepared in PBS for each strain, down to a concentration of  $10^8$  colony-forming units/ml. Bacterial suspensions in the presence of D-fagomine at final concentrations of 20 and 200 mg/l (0.14 and 1.4 mM) were incubated for 90 min at room temperature. The suspensions were spread onto slides, observed under an optical microscope and compared with negative control cultures and positive control suspensions obtained with mannose 0.05 M. A minimum of twenty fields were evaluated for aggregations. The results were expressed as percentages of aggregation related to the number of aggregations obtained with mannose 0.05 M (100%).

### Bacterial adhesion to intestinal mucosa

The mucosa was obtained from intestinal segments of pigs, just after they were killed at a local slaughterhouse, and kept frozen until use. The mucosa preparation (1 ml) was defrosted, centrifuged and mixed with PBS (99 ml). Before each test, the concentration of mucin in the suspension was calculated by the Bradford method<sup>(24)</sup>. Multiwell plates (Nunc®; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated by incubation with the mucosa suspension (2.5 ml) overnight at 4°C. Then the unbound mucosa was carefully sucked off and the wells gently loaded with bacterial suspensions (10<sup>7</sup> colony-forming units/ml) followed immediately by the addition of the appropriate amount of D-fagomine to reach the desired final concentrations (10 and 20 mg/l, 0.07 and 0.14 mM) in a total volume of 1.5 ml. The mixtures were incubated at 37°C for 90 min. Mannose 0.05 M was used as a positive control and the experiment was performed in triplicate. Finally, the colony-forming units from both the supernatant and mucosa were counted under an optical microscope after cultivating both fractions overnight.

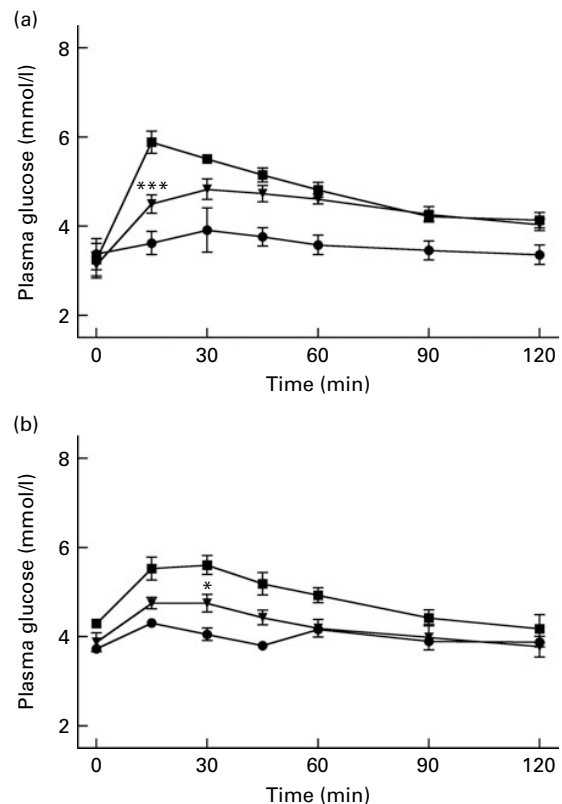
### Statistics

The results from the sucrase inhibition tests are expressed as mean values with their standard errors. Student's *t* test (two-tailed distribution) was carried out to analyse the differences between the two assays. We applied a non-linear sigmoid dose–response inhibition approximation model to derive the IC<sub>50</sub> values for enzyme inhibition. The areas under the curve from the sucrase/starch-loading tests were calculated using the trapezoidal rule. Statistical differences were evaluated by two-way ANOVA and Bonferroni's post test. Results with *P* < 0.05 were taken as significant. All data manipulation and statistical analysis were performed using Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

### Effect of D-fagomine on postprandial blood glucose in vivo

D-Fagomine lowered postprandial glycaemia in Sprague–Dawley rats following the intake of sucrose and starch (Fig. 2). D-Fagomine effectively modulated postprandial glycaemia in a dose-dependent manner (Fig. 3) that resulted in a reduction in area under the curve at 120 min between 17% (1 mg D-fagomine/kg body weight) (*P* < 0.01) and 43% (4 mg D-fagomine/kg body weight) (*P* < 0.001) after the intake of 1 g sucrose/kg body weight. No significant differences (*P* > 0.05) between the doses of 1 and 2 mg D-fagomine/kg body weight were recorded under our experimental conditions. D-Fagomine lowered the maximum blood glucose concentration from 5.8 mM to 5.4, 4.8 and 4.4 mM at doses of 1, 2 and 4 mg/kg body weight, respectively, and shifted the time to maximum blood glucose concentration (*T*<sub>max</sub>) from 15 to 30 min (doses of 1 and 2 mg D-fagomine/kg body weight) and to 45 min (4 mg D-fagomine/kg body weight) (Fig. 3). The efficiencies of D-fagomine, DNJ, miglitol (*N*-hydroxyethyl-DNJ) and acarbose on blood glucose concentration in healthy Sprague–Dawley rats given a single dose of

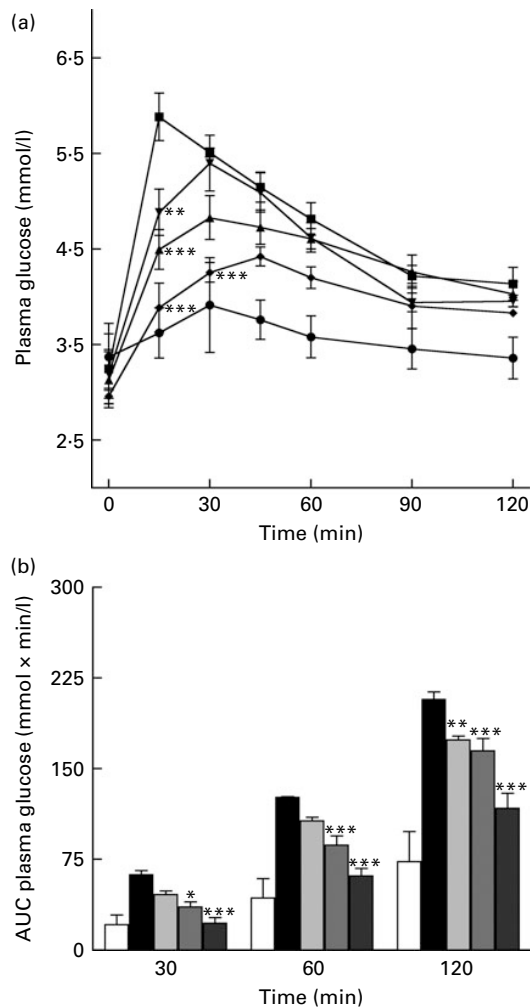


**Fig. 2.** Effect of D-fagomine (2 mg/kg body weight) on the glycaemic response of normal Sprague–Dawley rats after ingestion (1 g/kg body weight) of: (a) sucrose and (b) starch. Normal rats were food-deprived for 12 h and then administered the carbohydrate and D-fagomine together. —■—, Sucrose (1 g/kg); —▼—, sucrose + D-fagomine (2 mg/kg); —●—, vehicle (water). Values are means with their standard errors of mean. Mean values were significantly different from the control: \* *P* < 0.05, \*\*\* *P* < 0.001.

sucrose were of the same order of magnitude. Acarbose, which is not an iminosugar, was the most effective agent tested. These comparative results are included as Supplemental Fig. S1 (available online at <http://www.journals.cambridge.org/bjn>). D-Fagomine did not show any effect on postprandial glycaemia after the intake of glucose (dose–response curves included as Supplemental Fig. S2 available online at <http://www.journals.cambridge.org/bjn>), which suggests that it did not affect glucose transport across the small intestine. In agreement with this, D-fagomine has been observed to have no effect on the transport of D-glucose (5 mM) in cultures of intestinal Caco-2 cells (R Martín-Venegas and R Ferrer, personal communication). Postprandial blood insulin concentration decreased in accordance with the decrease in blood glucose concentration (Fig. 4), which indicates that D-fagomine did not stimulate fast insulin secretion.

### Intestinal disaccharidase inhibitory activity in vitro

The *in vitro* sucrase inhibitory activity of D-fagomine, DNJ, miglitol and acarbose was measured on preparations of homogenised intestinal mucosa and on sections of everted small intestine (Table 1). The outcomes of the two *in vitro* assays



**Fig. 3.** Dose-dependent effect of D-fagomine on the glycaemic response of normal Sprague–Dawley rats after ingestion of sucrose (1 g/kg body weight). Normal rats were food-deprived for 12 h and then administered the carbohydrate and D-fagomine together. AUC, area under the curve. (a) —■—, sucrose (1 g/kg); —▼—, sucrose + D-fagomine (1 mg/kg); —▲—, sucrose + D-fagomine (2 mg/kg); —◆—, sucrose + D-fagomine (4 mg/kg); —●—, vehicle (water). (b) □, vehicle (water); ■, sucrose (1 g/kg); ▤, sucrose + D-fagomine (1 mg/kg); ▥, sucrose + D-fagomine (2 mg/kg); ▦, sucrose + D-fagomine (4 mg/kg). Values are means with their standard errors of mean. Mean values were significantly different from the control: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

were clearly different. Only the D-fagomine results were similar ( $P > 0.05$ ) in both assays. On homogenised mucosa, D-fagomine was a weaker inhibitor than the other compounds between two and three orders of magnitude. In contrast, when everted intestinal membranes were used, the inhibitory potencies of D-fagomine and acarbose were similar, and the differences between D-fagomine and the other two compounds were lower.

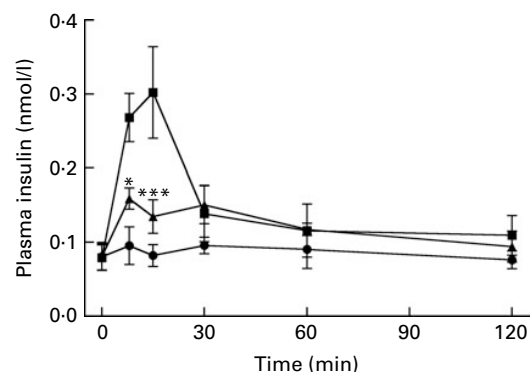
#### Agglutinating and antiadhesive activity of D-fagomine on fimbriated bacteria

D-Fagomine modulated bacterial adhesion without affecting cell viability. At a concentration as high as 2000 mg/l, D-fagomine was virtually inactive as antimicrobial agent against an

array of different strains. The results of the inhibition tests are included in Supplemental Table S2 (available online at <http://www.journals.cambridge.org/bjn>). D-Fagomine agglutinated cells of *E. coli* and *S. enterica* serovar Typhimurium at concentrations of 20 and 200 mg/l with agglutinations of 60 and 70% of the control cultures, respectively ( $P < 0.001$ ). Fig. 5 illustrates this agglutination effect. Moreover, D-fagomine effectively prevented the adhesion of the same fimbriated bacterial strains on pig intestinal mucosa at concentrations of 10 and 20 mg/l ( $P < 0.001$ ) (Table 2). More than 95% of the Enterobacteriaceae were recovered in the supernatant. The effect was equivalent to that of a solution of mannose 0.05 M (i.e. 9000 mg/l). At 20 mg/l, D-fagomine did not affect the adhesion of *Bifidobacterium* sp. to intestinal mucosa and promoted the adhesion of *Lactobacillus acidophilus* ( $P < 0.001$ ) (Table 2).

#### Discussion

Natural iminosugars mimic the structures of sugars and may have the capacity to bind to the same loci within biological systems. Particularly D-fagomine is structurally related to D-glucose and D-mannose (Fig. 1). We first tested D-fagomine for the modulation of postprandial blood glucose with regard to potential applications in the reduction of the risk of developing IR and becoming overweight. D-Fagomine has been described before as a weak inhibitor of  $\alpha$ -glycosidases in *in vitro* assays using purified enzymes<sup>(19)</sup> or homogenates of intestinal mucosa<sup>(25)</sup>. When we tested D-fagomine *in vivo*, we found that it lowered postprandial blood glucose concentration in healthy rats given a single dose of sucrose. D-Fagomine was less efficient in doing so than acarbose, a non-absorbable inhibitor of both  $\alpha$ -glycosidases and  $\alpha$ -amylase, and similar in efficiency to DNJ, a more potent iminosugar *in vitro*<sup>(25)</sup>, and its derivative miglitol (*N*-hydroxyethyl-DNJ). Then we corroborated that D-fagomine was a weaker sucrase inhibitor *in vitro* than DNJ, miglitol and acarbose (Table 1, first column). As the results were different *in vitro* and *in vivo*,



**Fig. 4.** Effect of D-fagomine on the insulinaemic response of normal Sprague–Dawley rats after ingestion of sucrose (1 g/kg body weight). Normal rats were food-deprived for 12 h and then administered the carbohydrate and D-fagomine together. —■—, Sucrose (1 g/kg); —▲—, sucrose + D-fagomine (2 mg/kg); —●—, vehicle (water). Values are means with their standard errors of mean. Mean values were significantly different from the control: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Table 1.** Inhibitory activity† of sugar mimetics on rat intestinal sucrase *in vitro*

 (IC<sub>50</sub> values with their standard errors of mean)

Compound	Assay			
	Intestinal mucosa homogenate		Everted intestine sleeves‡	
	IC <sub>50</sub> (μM)	SEM	IC <sub>50</sub> (μM)	SEM
D-Fagomine	42.0	5.9	59.0	8.1
Acarbose	1.10*	0.13	53.0	8.9
Miglitol	0.150*	0.017	5.20*	0.80
DNJ	0.0270*	0.0030	0.77*	0.10

DNJ, 1-deoxynojirimycin.

 \* Mean values were significantly different from those of D-fagomine within each assay ( $P < 0.001$ ).

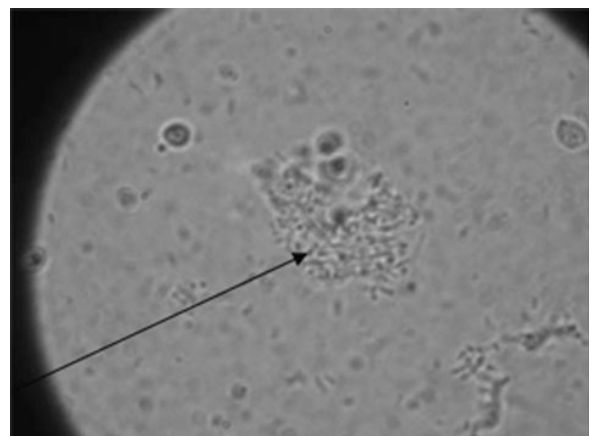
† Activity is given as μmol of sucrose hydrolysed/h.

‡ Activity is normalised to mg of wet weight of the intestinal sleeve.

we tested the same compounds as sucrase inhibitors on everted intestine sleeves, an experimental set-up that is closer to the situation *in vivo*. This method is not commonly used because it is more experimentally complex than the method of homogenised mucosa and it has been shown that both preparations give similar sucrase activity<sup>(23)</sup>. While D-fagomine was still a mild inhibitor in the everted sleeve test, the differences in the absolute values of sucrase inhibition by DNJ, miglitol and acarbose between the two *in vitro* assays were of more than one order of magnitude (Table 1). The sucrase inhibitory potencies of D-fagomine and acarbose in the everted sleeve test were similar, while those of DNJ and miglitol were approximately 10-fold and 70-fold higher. These results indicate that experimental departure from the *in vivo* situation may result in large differences in the outcome of brush-border sucrase inhibition assays and that potent inhibitors *in vitro* may not be as effective *in vivo*. The *in vitro* assays may provide information about comparative efficiencies and the everted sleeves, a set-up closer to the *in vivo* situation, may be a better option than working with purified enzymes or homogenates. Whatever the choice is, special attention must be paid when extrapolating the results to postprandial blood glucose modulation. To make sure that putatively useful compounds are not overlooked, direct testing *in vivo* appears to be the best option.

As intraperitoneally administered D-fagomine induced insulin release and consequently lowered glycaemia in diabetic mice<sup>(18)</sup>, stimulation of insulin secretion may be thought to account for the *in vivo* activity disclosed here. However, in our *in vivo* experiments, orally administered D-fagomine did not raise the blood insulin level (Fig. 3); on the contrary, as it lowered blood glucose, it also lowered the insulin response over the 2-h postprandial period. Moreover, D-fagomine did not show any effect on postprandial glycaemia after intake of glucose (Supplemental Fig. S2 available online at <http://www.journals.cambridge.org/bjn>). These results imply that D-fagomine neither stimulated fast insulin secretion nor significantly affected glucose transport across the small intestine. Over the postprandial period, the action of D-fagomine appears to be that of slowing down the glucose release from oligomeric and polymeric carbohydrates by inhibition of

brush-border glycosidases. So D-fagomine lowers the so-called glycaemic load (GL) of a meal. The GL corresponding to a given foodstuff is calculated as the amount of carbohydrates in it multiplied by its glycaemic index (GI), the area under the curve of blood glucose from 0 to 2 h after ingestion of 50 g of carbohydrate<sup>(26,27)</sup>. The GL is thereby a measure of how much carbohydrates are incorporated systemically as glucose and how fast this occurs<sup>(26,27)</sup>. Low GI and GL diets have been associated with a reduced risk of becoming overweight by delaying the onset of hunger and limiting the storage of nutrients as fat<sup>(28)</sup>. While it is accepted that lowering the glycaemic response by glycosidase inhibitors and low GI foods both delay the onset of IR<sup>(29,30)</sup>, the question of whether diets with low GI and GL are effective at controlling excess weight is controversial<sup>(31)</sup>. A recent meta-analysis of randomised controlled trials and a more recent trial published later suggested that low-carbohydrate diets may only be associated with modest short-term weight loss<sup>(32,33)</sup>. It should be noted though that these trials were conducted on large genotypically and phenotypically heterogeneous populations. Clearer effects may well be evident from studies with subpopulations that are sensitive to carbohydrate-related weight gain. Supporting this view is the observation that early (30 min) postprandial insulinaemia predicted weight gain in humans and that there exists a subpopulation characterised by early high-insulin secretion that gains weight while consuming a low-fat diet<sup>(34)</sup>. Randomised controlled trials with D-fagomine and appropriate subpopulations may help to clarify the role of low-GL diets in weight gain and to confirm the reduction in the risk of developing type 2 diabetes associated with lowering postprandial glycaemia. Another controversial point involving lowering GL is that low-GI foods include ingredients that are poorly defined chemically (e.g. complex mixtures with unidentified minor components) and their mode of action is unclear. Moreover, most of these ingredients may alter the organoleptic and rheologic properties of the original foodstuff. As pure D-fagomine is effective at a concentration of 0.1% in the matrix, the ingredient may allow the design of foodstuffs with controlled GI resulting in only minimal modification of the composition and the other properties.


**Fig. 5.** Aggregation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in a solution of D-fagomine in PBS (200 mg/l).

**Table 2.** Influence of D-fagomine on the adhesion of bacteria to intestinal pig mucosa\*  
(Mean values of the logarithms of colony-forming units (CFU; total and supernatant) and percentage CFU in the supernatant)

	Total		Supernatant		Supernatant	
	Log CFU/ml	SEM	Log CFU/ml	SEM	% CFU	SEM
<b>Control (PBS)</b>						
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium FVB7654	8.59	0.01	6.07	0.00	0.30	0.01
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FVB5643	8.60	0.00	6.14	0.00	0.35	0.01
<i>Escherichia coli</i> FVB2453	8.60	0.00	6.16	0.00	0.36	0.01
<i>E. coli</i> FVB3478	8.60	0.00	6.18	0.00	0.38	0.02
<i>Lactobacillus acidophilus</i> FVB1467	6.69	0.00	6.65	0.00	91.84	0.01
<i>Bifidobacterium</i> sp. FVB4278	7.08	0.00	7.08	0.00	99.15	0.01
<b>D-Fagomine 10 mg/l (0.07 mM)</b>						
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FVB7654	8.56	0.01	8.53	0.00	91.80	0.06
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FVB5643	8.32	0.00	8.22	0.00	78.40	0.12
<i>E. coli</i> FVB2453	8.09	0.00	8.07	0.00	94.50	0.01
<i>E. coli</i> FVB3478	8.27	0.00	8.24	0.00	95.10	0.01
<i>L. acidophilus</i> FVB1467	6.69	0.00	6.43	0.00	54.60	0.06
<i>Bifidobacterium</i> sp. FVB4278	7.08	0.00	7.08	0.00	99.17	0.00
<b>D-Fagomine 20 mg/l (0.14 mM)</b>						
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FVB7654	8.07	0.01	8.04	0.00	98.20	0.00
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FVB5643	8.47	0.00	8.45	0.00	95.50	0.00
<i>E. coli</i> FVB2453	8.04	0.00	8.02	0.01	96.30	0.06
<i>E. coli</i> FVB3478	8.00	0.00	8.00	0.00	99.00	0.00
<i>L. acidophilus</i> FVB1467	6.71	0.01	6.46	0.00	56.27	0.01
<i>Bifidobacterium</i> sp. FVB4278	8.08	0.00	8.08	0.00	99.17	0.01

FVB, Facultat Veterinària Barcelona.

\* Wells coated with pig mucosa overnight at 4°C, loaded with the bacterial suspensions in the presence of D-fagomine and incubated at 37°C for 90 min. Both the attached material and the supernatant were counted for CFU.

We also disclose here an activity of D-fagomine that had never been suggested before: the modulation of bacterial adhesion. We observed that D-fagomine selectively agglutinated potentially deleterious Enterobacteriaceae and prevented their adhesion to pig intestinal mucosa. The adhesion of *Lactobacillus* spp. was promoted by D-fagomine while that of *Bifidobacterium* spp. was not affected (Table 2). Fimbriated strains such as *E. coli* and *S. enterica* serovar Typhimurium express mannose-specific lectins on the tip of their fimbriae that bind to membrane carbohydrates as a first step in the colonisation of other organisms<sup>(35)</sup>. As D-fagomine is structurally similar to lectin-binding sugars such as mannose (Fig. 1), the observed agglutinating effect is most probably due to the affinity of the iminocyclitol for lectins. Non-fimbriated probiotic strains express other surface adhesins of glycoprotein nature (glycoprotein adhesins) that keep bacteria loosely attached to the intestinal wall<sup>(13)</sup>. These interactions do not appear to be affected by D-fagomine. Notably, D-fagomine did not show any antibiotic effect on any of the strains tested. This is important because other putatively beneficial strains will keep their full viability in the presence of D-fagomine. Thus, the agglutination of Enterobacteriaceae will most probably favour intestinal colonisation by loosely bound non-pathogenic strains such as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. and might help to avoid the complications associated with intestinal conditions such as inflammatory bowel disease. As the intestinal microbiota clearly influences the physiological status of the gut and even the health of the whole organism<sup>(36)</sup>, further studies will determine whether this activity of D-fagomine results in long-term effects related to the reduction of health risk factors.

In conclusion, here we report the short-term activity of D-fagomine along the intestinal tract, consisting of effectively lowering the postprandial blood glucose concentration and selectively agglutinating enterobacteria. D-Fagomine effectively modulates the blood glucose response in a dose-dependent manner after the ingestion of sucrose or starch, probably by delaying saccharide hydrolysis by brush-border glycosidases. We also show that the results of sucrose inhibition *in vitro* very much depend on the experimental set-up and cannot account for the activity of inhibitors *in vivo*. D-Fagomine also inhibits the adhesion of potentially deleterious bacteria to the intestinal mucosa. Based on all this evidence, D-fagomine may be used as a dietary ingredient or functional food component to reduce the health risks associated with an excessive intake of fast-digestible carbohydrates, or an excess of potentially pathogenic bacteria.

#### Acknowledgements

The present work was funded by Bioglane SLNE. Support is appreciated from: the Spanish Ministry of Science and Innovation (CDTI-NEOTEC 20080474, AGL2009-12374-C03-03/ALI; CTQ2009-07359); the Catalan regional government (Generalitat de Catalunya, 2009 SGR 00281 and pre-doctoral fellowship to L. G.); and the Panamanian government (SENACYT/IFARHU, pre-doctoral fellowship to E. M.-T.). Possible conflicts of interest: S. P., P. C. and J. L. T. are stockholders of Bioglane SLNE. J. M. P., X. C., M. A. C.-T., S. P., P. C. and J. L. T. designed the research; L. G., E. M.-T., M. E. J. and X. C. conducted the research into blood glucose and sucrose inhibition; M. A. C.-T and C. A.



conducted the microbiology research; C. L. and S. P. provided essential materials; L. G., E. M.-T., J. M. P. and M. E. J. analysed the data; J. L. T. wrote the paper and had primary responsibility for the final content. All the authors reviewed the paper, and read and approved the final manuscript. Language assistance by Christopher Evans is appreciated.

## References

1. Koyama M & Sakamura S (1974) Structure of a new piperidine derivative from buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum*). *Agric Biol Chem* **38**, 1111–1112.
2. Asano N, Yamashita T, Yasuda K, *et al.* (2001) Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem* **49**, 4208–4213.
3. Asano N, Kato A, Miyauchi M, *et al.* (1997) Specific  $\alpha$ -galactosidase inhibitors, N-methylcalystegines. Structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*. *Eur J Biochem* **248**, 296–303.
4. Asano N, Tomioka E, Kizu H, *et al.* (1994) Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr Res* **253**, 235–245.
5. Winchester B & Fleet GWJ (1992) Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology* **2**, 199–210.
6. Asano N, Oseki K, Tomioka E, *et al.* (1994) N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res* **259**, 243–255.
7. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, *et al.* (2004) Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation* **109**, 433–438.
8. Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, *et al.* (2010) Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic impact goal through 2020 and beyond. *Circulation* **121**, 586–613.
9. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, *et al.* (2009) Heart disease and stroke statistics – 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**, e21–e181.
10. Monsivais P & Drewnowski A (2007) The rising cost of low-energy-density foods. *J Am Diet Assoc* **107**, 2071–2076.
11. Drewnowski A & Specter SE (2004) Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *Am J Clin Nutr* **79**, 6–16.
12. Sharon N (2006) Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 527–537.
13. Lakhtin VM, Lakhtin MV, Pospelova VV, *et al.* (2006) Lactobacilli and bifidobacteria lectins as possible signal molecules regulating intra- and inter-population bacteria–bacteria and host–bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physico-chemical characterization and some biological activity investigation. *Microb Ecol Health Dis* **18**, 55–60.
14. Musso G, Gambino R & Cassader M (2010) Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* **33**, 2277–2284.
15. Islam B, Khan SN, Haque I, *et al.* (2008) Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *J Antimicrob Chemother* **62**, 751–757.
16. Majlis S, Björn F, Terry B, *et al.* (2003) Glycolipid depletion in antimicrobial therapy. *Mol Microbiol* **47**, 453–461.
17. Kato A, Asano N, Kizu H, *et al.* (1997) Fagomine isomers and glycosides from *Xanthocercis zambesiaca*. *J Nat Prod* **60**, 312–314.
18. Nojima H, Kimura I, Chen F-J, *et al.* (1998) Antihyperglycaemic effects of N-containing sugars from *Xanthocercis zambesiaca*, *Morus bombycis*, *Aglaonema treubii*, and *Castanospermum australe* in streptozotocin-diabetic mice. *J Nat Prod* **61**, 397–400.
19. Castillo JA, Calveras J, Casas J, *et al.* (2006) Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays. *Org Lett* **8**, 6067–6070.
20. Clapés P, Joglar J & Castillo JA, *et al.* (2006) Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Bioglane, S.L.N.E. Chemoenzymatic process for the preparation of iminocyclitols WO2008025826 (A1), EP2007059062, US2010009417 (A1).
21. Hem A & Smith AJ (1998) Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim* **32**, 364–368.
22. Dahlqvist A (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* **7**, 18–25.
23. Lee EA, Weiss SL, Lam M, *et al.* (1998) A method for assaying intestinal brush-border sucrose in an intact intestinal preparation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2111–2116.
24. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
25. Scofield AM, Fellows LE, Nash RJ, *et al.* (1986) Inhibition of mammalian digestive disaccharidases by polyhydroxy alkaloids. *Life Sci* **39**, 645–650.
26. FAO/WHO (1998) Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. *FAO Food Nutr Pap* **66**, 1–140.
27. Salmeron J, Ascherio A, Rimm EB, *et al.* (1997) Dietary fiber, glycaemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* **20**, 545–550.
28. Ludwig DS (2000) Dietary glycaemic index and obesity. *J Nutr* **130**, 280S–283S.
29. Bischoff H (1994) Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur J Clin Invest* **24**, 3–10.
30. Solomon TPJ, Haus JM, Kelly KR, *et al.* (2011) A low-glycaemic index diet combined with exercise reduces insulin resistance, postprandial hyperinsulinemia, and glucose-dependent insulinotropic polypeptide responses in obese, prediabetic humans. *Am J Clin Nutr* **92**, 1359–1368.
31. van Baak MA & Astrup A (2009) Consumption of sugars and body weight. *Obes Rev* **10**, Suppl. 1, 9–23.
32. Nordmann AJ, Nordmann A, Matthias B, *et al.* (2006) Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* **166**, 285–293.
33. Dyson PA, Beatty S & Matthews DR (2007) A low-carbohydrate diet is more effective in reducing body weight than healthy eating in both diabetic and non-diabetic subjects. *Diabet Med* **24**, 1430–1435.
34. Chaput J-P, Tremblay A, Rimm EB, *et al.* (2008) A novel interaction between dietary composition and insulin secretion: effects on weight gain in the Quebec Family Study. *Am J Clin Nutr* **87**, 303–309.
35. Tiralongo J & Moran AP (2009) Bacterial lectin-like interactions in cell recognition and adhesion. In *Microbial Glycobiology*, pp. 551–565 [AP Moran, O Holst, PJ Brennan and M von Itzstein, editors]. San Diego, CA: Academic Press.
36. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, *et al.* (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 859–904.

# Structure-Guided Minimalist Redesign of the L-Fucose-1-Phosphate Aldolase Active Site: Expedient Synthesis of Novel Polyhydroxylated Pyrrolizidines and their Inhibitory Properties Against Glycosidases and Intestinal Disaccharidases

Xavier Garrabou,<sup>[a]</sup> Livia Gómez,<sup>[a]</sup> Jesús Joglar,<sup>[a]</sup> Sergi Gil,<sup>[b]</sup> Teodor Parella,<sup>[b]</sup> Jordi Bujons,<sup>\*[a]</sup> and Pere Clapés<sup>\*[a]</sup>

In memoriam to José Manuel Concellón (Universidad de Oviedo)

**Abstract:** A minimalist active site redesign of the L-fucose-1-phosphate aldolase from *E. coli* FucA was envisaged, to extend its tolerance towards bulky and conformationally restricted *N*-Cbz-amino aldehyde acceptor substrates (Cbz = benzyloxycarbonyl). Various mutants at the active site of the FucA wild type were obtained and screened with seven sterically demanding *N*-Cbz-amino aldehydes including *N*-Cbz-prolinal derivatives. FucA F131A showed an aldol activity of 62  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  with (*R*)-*N*-Cbz-prolinal, whereas no detectable activity was observed with the FucA wild type. For the other substrates, the F131A mutant gave aldol activities from 4 to about 25 times higher than those observed with the FucA wild type. With regard to the

stereochemistry of the reactions, the (*R*)-amino aldehydes gave exclusively the *anti* configured aldol adducts whereas their *S* counterparts gave variable ratios of *anti/syn* diastereoisomers. Interestingly, the F131A mutant was highly stereoselective both with (*R*)- and with (*S*)-*N*-Cbz-prolinal, exclusively producing the *anti* and *syn* aldol adducts, respectively. Molecular models suggest that this improved activity towards bulky and more rigid substrates, such as *N*-Cbz-prolinal, could arise from a better fit of the substrate into the hydrophobic pocket created by the

F131A mutation, due to an additional  $\pi$ -cation interaction with the residue K205' and to efficient contact between the substrate and the mechanistically important Y113' and Y209' residues. An expedient synthesis of novel polyhydroxylated pyrrolizidines related to the hyacinthacine and alexine types was accomplished through aldol additions of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to hydroxyprolinal derivatives with the hyperactive FucA F131A as catalyst. The iminocyclitols obtained were fully characterised and found to be moderate to weak inhibitors (relative to 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol (LAB) and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB)) against glycosidases and rat intestinal saccharidases.

**Keywords:** aldol reaction • enzyme catalysis • inhibitors • mutagenesis • pyrrolizidines

## Introduction

Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent aldolases are increasingly interesting biocatalysts because they catalyse stereoselective aldol additions, which are reactions of paramount importance for the synthesis of chiral polyhydroxylated structures (carbohydrates and analogues).<sup>[1]</sup> DHAP aldolases are strictly specific for the donor substrate (DHAP) and a few isosteric analogues,<sup>[2]</sup> whereas the aldehyde acceptors that they tolerate are structurally diverse.<sup>[3–5]</sup> In spite of their wide acceptor tolerance, some limitations arising from sterically demanding structures are commonly encountered. In this regard, during our ongoing research project on the aldolase-catalysed synthesis of iminocyclitols

[a] X. Garrabou, L. Gómez, Dr. J. Joglar, Dr. J. Bujons, Dr. P. Clapés  
Biotransformation and Bioactive Molecules Group  
Instituto de Química Avanzada de Cataluña-CSIC  
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona (Spain)  
Fax: (+34) 932045904  
E-mail: pere.clapes@iqac.csic.es

[b] S. Gil, Dr. T. Parella  
Servei de Resonància Magnètica Nuclear  
Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201000714>.



from *N*-Cbz-amino aldehydes (Cbz=benzyloxycarbonyl), we have observed that those with  $\alpha$ -branched substituents (i.e., isopropyl, isobutyl and *sec*-butyl), including conformationally restricted *N*-Cbz-prolinal derivatives, are poor acceptors for the FucA catalyst.<sup>[6,7]</sup> *N*-Cbz-prolinal derivatives are of particular interest for the straightforward two-step synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidines.<sup>[7]</sup>

In spite of the significant advances in the alteration of the stereospecificities of aldolases, studies focusing on modification of their acceptor substrate tolerance in the literature of chemical synthesis are rather meagre.<sup>[8]</sup> It was therefore regarded as both promising and significant to undertake a minimalist redesign of the FucA active site to extend its tolerance towards bulky and conformationally restricted acceptor substrates, while keeping the *anti* configured stereochemistry of the resulting aldol adduct.

According to the crystallographic structure of FucA reported by Schulz and co-workers,<sup>[9]</sup> it appears that the F131 and its closest residues (F206 and Y113) make up a hydrophobic wall at the binding site for the natural acceptor substrate, L-lactaldehyde. We envisaged that those residues might sterically hinder the productive binding of branched  $\alpha$ -substituted *N*-Cbz-amino aldehydes. Moreover, the motion of the mobile C-terminal tail might also block the binding and/or prevent suitable positioning of sterically demanding aldehydes. Mutations at these positions produced relatively active catalysts towards non-natural aldehydes, although they also changed the stereochemical course of the enzymatic aldol addition reaction.<sup>[9]</sup> Strikingly, the single mutant F131A showed complete inversion of configuration for non-polar aldehydes such as propionaldehyde or isobutyraldehyde, suggesting that the side chain of F131 prevents the rotation of the aldehyde, which gives rise to the rhamnULOSE-like epimer. However, as has been demonstrated in previous work,<sup>[4,5]</sup> the binding modes of bulky substrates are rather unpredictable and strongly depend on the aldehyde structures, and thus their precise functional orientations in the active site during the attack of the donor. In this work we therefore pursued the investigation of two new FucA mutants, Y113A and F206A, together with the known FucA mutants F131A, Del(211–215) and Del(207–215), as well as the combination mutants F131A/F206A, Y113A/F131A and F131A/Del(207–215), as catalysts for the aldol addition reactions of DHAP to *N*-Cbz-amino aldehyde derivatives C- $\alpha$  substituted with isopropyl, isobutyl and *sec*-butyl groups, as well as both enantiomers of *N*-Cbz-prolinal. The F131A single mutant was then used for the straightforward stereoselective synthesis of different pyrrolizidines, which were assayed as glycosidase inhibitors.

## Results and Discussion

**Activity of the FucA mutants on L-fucose-1-phosphate (Fuc1P):** The FucA mutants Y113A, F206A, F131A, Del(211–215) and Del(207–215) were obtained and tested for their retroaldol activity on L-fucose-1-phosphate (Fuc1P,

Table 1). Overall, their activities were lower than that of the wild-type enzyme.<sup>[9]</sup>

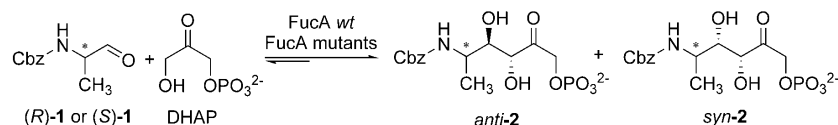
Table 1. Relative retroaldol activities of FucA mutants with L-fucose-1-phosphate.

Aldolase	Relative specific activity <sup>[a]</sup> [%]
wild type	100
F131A	1
F206A	22
Y113A	0.5
Del(211–215)	11
Del(207–215)	2

[a] The activity of the FucA wild type was 9.8 U mg<sup>-1</sup> protein (1 U cleaves 1  $\mu$ mol of Fuc1P per minute at 25 °C and pH 7.5 (Tris-HCl (100 mM) + KCl (150 mM)). Experiments were carried out in triplicate with a 5–10% estimated standard error. Mutant Y113A suffered a slow inactivation and its activity vanished during the experiment, in good agreement with the measurements on Y113F conducted by Schulz et al.<sup>[9]</sup> The rest of the mutants, F131A, Del(207–215) and Del(211–215), gave activities similar to those already reported.

**Synthetic capabilities of FucA mutants:** Aldol addition reactions of DHAP to *N*-Cbz-amino aldehydes, catalysed by the obtained FucA mutants, were conducted at 4 °C in DMF/buffer (1:4) with vortex mixing agitation to ensure that the aldehydes (partly soluble in water) were well dispersed in the medium.<sup>[10]</sup> The stereochemical outcomes of the enzymatic aldol addition reactions were inferred from the iminocyclitols generated after reductive amination of the corresponding aldol adducts. These iminocyclitols were structurally characterised by high-field NMR spectroscopy and by comparison of these data with those obtained for similar or identical compounds in previous work (see the Supporting Information).<sup>[4–6]</sup> In some instances the diastereomeric mixtures of non-phosphorylated aldol adducts could be directly baseline-separated by analytical reversed-phase HPLC and quantified (see the Supporting Information).

The synthetic capabilities of the FucA mutants towards (*R*)- and (*S*)-*N*-Cbz-alaninal ((*R*)-**1** and (*S*)-**1**, respectively) were first evaluated as positive blank experiments (Scheme 1). Both aldehydes were tolerated well by the FucA wild type, so their interaction with the enzyme would appear not to be subjected to any steric hindrance.<sup>[4]</sup> The F131A and F206A mutants gave comparable percentages of aldol adduct (Table 2). FucA Y113A and FucA Del(211–215) gave 24% conversions or less to aldol adducts, whereas no product was detected with Del(207–215). Importantly, the stereochemical outcome of the catalysis by the mutants was identical to that by the FucA wild type—that is, *anti*-configured products—circumstantially supporting the hypothesis that the reactive conformation of these aldehydes at the active site may differ significantly from that of the small aldehydes.<sup>[9]</sup> The initial velocities ( $v_0$ ) of the FucA wild type and the F131A mutant towards (*R*)-**1** and (*S*)-**1** were measured at 25 °C. Remarkably, the  $v_0$  values of FucA F131A for (*R*)-**1** and (*S*)-**1** were between 1.5 and 3.0 times higher than those of the FucA wild type (Table 2). The change from a non-polar wall to a non-polar pocket in the



Scheme 1. FucA-catalysed aldol addition reactions of DHAP to (*R*)- and (*S*)-*N*-Cbz-alaninal (**1**); *wt* = wild type.

Table 2. FucA-catalysed aldol addition reactions of DHAP to (*R*)- and (*S*)-*N*-Cbz-alaninal ((*R*)-**1** and (*S*)-**1**, respectively).<sup>[a]</sup>

Biocatalyst	( <i>R</i> )- <b>1</b>		( <i>S</i> )- <b>1</b>		<i>v</i> <sub>0</sub> <sup>[d]</sup>
	% <sup>[b]</sup>	<i>anti/syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti/syn</i> <sup>[c]</sup>	
wild type	72	100:0	12	68	23
F131A	76	98:2	37	64	36
F206A	54	99:1	n.d.	64	n.d.
Y113A	<5	n.d. <sup>[f]</sup>	n.d.	10	n.d.
Del(211–215)	24	98:2	n.d.	12	n.d.
Del(207–215)	n.p. <sup>[e]</sup>	n.d.	n.d.	n.p.	n.d.

[a] Experiments were carried out in triplicate with an estimated standard error between 10–12%. [b] Percentage of aldol adduct **2** formed with respect to the starting DHAP (i.e., limiting substrate) after 24 h of incubation at 4°C, as determined by HPLC with use of external standards. After 24 h, no significant evolution in the product formation was detected. [c] *anti/syn* ratio of the biocatalytic aldol addition; *syn* is the (3*R*,4*S*) typical configuration obtained through catalysis by L-rhamnulose-1-phosphate aldolase from *E. coli* (RhuA), and *anti* is the (3*R*,4*R*) typical configuration obtained by FucA catalysis. [d] Initial velocities (*v*<sub>0</sub>), expressed as μmol of products formed per hour and per mg of protein, were determined at 25°C. [e] No product was detected. [f] Not determined.

F131A mutant therefore created a biocatalyst with enhanced activity towards these substrates, whereas this change has a dramatic effect in the activity towards Fuc1P cleavage.<sup>[11]</sup>

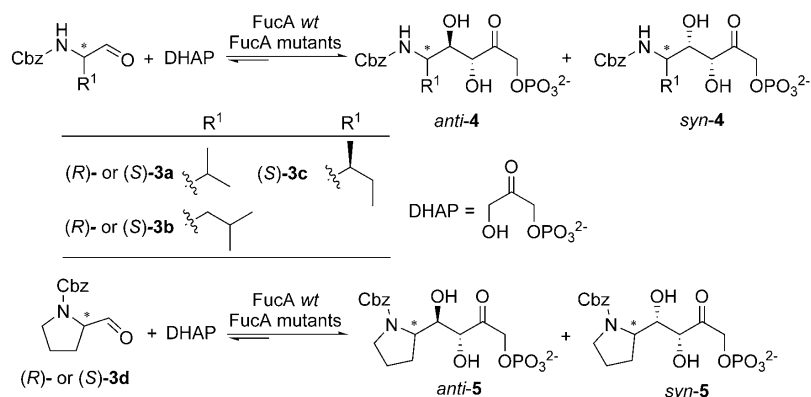
The next step was to evaluate the acceptor tolerance of the FucA mutants towards the selected *N*-Cbz-amino aldehydes with the sterically demanding α-branched isopropyl ((*R*)- and (*S*)-**3a**), isobutyl ((*R*)- and (*S*)-**3b**) and *sec*-butyl ((*S*)-**3c**) substituents, as well as those ((*R*)- and (*S*)-**3d**) derived from (*S*)- and (*R*)-proline (Scheme 2 and Table 3).

As observed in the case of *N*-Cbz-alaninal, the mutants F131A and F206A gave the best levels of conversion (Table 3). In particular, F131A provided the best results for all aldehydes tested, with adduct formation twice that achieved with the FucA wild type. The most striking result was obtained with (*R*)-**3d**: F131A gave a significant percentage of aldol adduct (60%), useful at preparative scale. The results obtained with (*R*)- and (*S*)-**3d** prompted us to use this mutant (see below) in the preparation of novel pyrrolizidine-type iminocyclitols starting with various

*N*-Cbz-hydroxyprolinal acceptors.<sup>[7]</sup> The F206A mutant did not give any significant improvements in the amounts of aldol adducts formed relative to the FucA wild type except in the case of the aldehyde (*R*)-**3d**. The mutants Y113A and Del(211–215) in most cases

gave <5% aldol adduct, whereas no reaction was observed with Del(207–215), consistent with the results obtained with *N*-Cbz-alaninal. In previous work, no aldol adduct formation had been detected (<2%) with the FucA wild type and the same aldehydes at 25°C.<sup>[6]</sup> It is noteworthy that, under the reaction conditions used in this work, the percentage of aldol adducts formed with the FucA wild type improved considerably. This difference can be accounted for, amongst other things, by two factors: firstly, by the enhanced stability of DHAP at 4°C<sup>[12]</sup> (consequently, the lower the rate of DHAP degradation the larger the conversion of acceptor that can be achieved for slow aldol addition reactions), and secondly, by the use of a vortex mixer instead of a shaker, which improved the dispersion of the aldehyde in the medium, favouring its enzymatic conversion into product. This appears to be of special relevance in reactions conducted at analytical scales.

The stereochemical outcomes of the reactions catalysed by the FucA mutants (Table 3) were governed by the structural features of the aldehydes. Within the limits of high-field NMR spectroscopy (see the Supporting Information), the *R* aldehydes yielded the highest *anti/syn* ratios (97:3 to 100:0), whereas for their *S* counterparts the result was dependent on the aldehyde. An interesting example that illustrates this situation was the aldolisation of (*R*)- and (*S*)-**3d**: with (*R*)-**3d** the reaction gave exclusively *anti*-**5** whereas (*S*)-**3d** gave *syn*-**5**, as determined from the coupling constants and NOESY experiments performed on the unphosphorylated aldol adducts **6a** and **6b**, derived from (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d**, respectively. This was also observed with the FucA wild type, however, suggesting that these mutants pre-



Scheme 2. FucA-catalysed aldol addition reactions of DHAP to the *N*-Cbz-amino aldehyde derivatives **3**.

Table 3. Aldol addition reactions of DHAP to *N*-Cbz-amino aldehyde derivatives catalysed by the FucA wild type and the mutants.<sup>[a]</sup>

Biocatalyst	<i>(R)</i> - <b>3a</b>		<i>(S)</i> - <b>3a</b>		<i>(R)</i> - <b>3b</b>		<i>(S)</i> - <b>3b</b>		<i>(S)</i> - <b>3c</b>		<i>(R)</i> - <b>3d</b>		<i>(S)</i> - <b>3d</b>	
	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>	% <sup>[b]</sup>	<i>anti</i> / <i>syn</i> <sup>[c]</sup>
wild type	16	100:0	16	70:30	29	100:0	27	100:0	22	78:22	2	100:0	20	0:100
F131A	56	100:0	38	45:55	68	100:0	50	85:15	36	68:32	60	97:3	39	0:100
F206A	19	100:0	12	65:35	40	100:0	24	100:0	17	74:26	10	100:0	16	0:100
Y113A	6	n.d. <sup>[d]</sup>	<5	n.d.	<5	n.d.	<5	n.d.	<5	n.d.	n.p. <sup>[e]</sup>	n.d.	n.p.	n.d.
Del(211–215)	4	n.d.	5	n.d.	8	n.d.	<5	n.d.	<5	n.d.	n.p.	n.d.	n.p.	n.d.
F131A/ F206A	21	100:0	17	65:35	34	100:0	24	85:15	24	73:27	21	100:0	14	0:100

[a] Experiments were carried out in triplicate with an estimated standard error between 10–12%. [b] Molar percentage of aldol adducts **4** and **5** formed with respect to the starting DHAP (i.e., limiting substrate) after 24 h of incubation at 4°C, as determined by HPLC with the use of external standards. No significant variation in the percentage of aldol adduct formed was detected after 24 h. [c] *anti*/*syn* ratio of the biocatalytic aldol addition: *syn* is the (3*R*,4*S*) typical configuration obtained by RhuA catalysis, and *anti* is the (3*R*,4*R*) typical configuration obtained by FucA catalysis. [d] n.d.=not determined. [e] n.p.=no product was detected.

served the facial orientations of these aldehydes in the active site.

The initial velocities ( $v_0$ ) of the FucA wild type and of FucA F131A towards (*R*)- and (*S*)-**3a**, **3b** and **3d** were also measured at 25°C (Table 4). Remarkably, the  $v_0$  values

Table 4. Initial reaction rates  $v_0$  ( $\mu\text{mol h}^{-1}$  per mg of protein) of the aldol additions of DHAP to (*R*)- and (*S*)-**3a**, **3b** and **3d** catalysed by the FucA wild type and by FucA F131A at 25°C.

Aldehyde	$v_0$ [ $\mu\text{mol h}^{-1}$ per mg protein] <sup>[a]</sup>	
	FucA wild type	FucA F131A
<i>(R)</i> - <b>3a</b>	1.3	16
<i>(S)</i> - <b>3a</b>	3.7	14
<i>(R)</i> - <b>3b</b>	1.5	16
<i>(S)</i> - <b>3b</b>	1.8	10
<i>(R)</i> - <b>3d</b>	n.d.	62
<i>(S)</i> - <b>3d</b>	<1	25

[a] Experiments were carried out in triplicate with an estimated standard error between 10–12%. n.d.=not detected within the limits of detection by HPLC at 215 nm.

of the aldol addition reactions catalysed by FucA F131A were around 4 to 25 times higher than those of the FucA wild type. The most striking result was that obtained with (*R*)-**3d**: the  $v_0$  value of FucA F131A was  $62 \mu\text{mol h}^{-1}$  per mg of protein, whereas the FucA wild type did not show any detectable aldol activity. Remarkably, the *anti* diastereoisomer (i.e., typically obtained with FucA catalysis) was the kinetically favoured product for both catalysts with all the aldehydes except for (*S*)-**3d**, for which the *syn* product (i.e., typically obtained with RhuA catalysis) was the preferred one. The stereoselectivity therefore tended to decrease as the degree of conversion or incubation time increased. This is because, under equilibrium control, more of the kinetically unfavourable product may be formed, decreasing the practical stereoselectivity of the reaction. In this context, previous molecular modelling calculations showed that the *syn* aldol adducts derived from (*R*)-**3a** and (*S*)-**3a** should be thermo-

dynamically preferred over the corresponding *anti* aldol adducts.<sup>[6]</sup> Similar calculations carried out on all the possible aldol adducts derived from (*R*)-**3b**, (*S*)-**3b**, (*S*)-**3c**, (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d** confirm this trend, suggesting that the *syn* adducts are thermodynamically preferred by  $4.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  on average (see the Supporting Information).

*Double mutant—seeking for synergies*: The results obtained thus far with the most successful single mutants prompted us to investigate the potential synergistic effects on the catalytic

properties of combining the hyperactive F131A mutation with other modifications that would decrease the steric hindrance, thus facilitating the access of conformationally restricted aldehydes to the FucA active site. To this end, the FucA catalysts F131A/F206A, F131A/Y113A and F131A/Del(207–215) were constructed. The relative activity of F131A/F206A towards Fuc1P was approximately <0.5%, whereas no activity was displayed by the mutants FucA F131A/Y113A and F131A/Del(207–215). In aldol addition reactions (Table 3), the double mutant F131A/F206A gave percentages of aldol adduct and stereoselectivities comparable to those obtained with the FucA wild type and with F206A but lower than those with the F131A mutant. No synergistic effect was therefore obtained with this FucA mutant. Furthermore, no product was detected either with the FucA F131A/Y113A or with the F131A/Del(207–215) mutants, both Y113 and the C-terminal tail residues being essential for the enzymatic aldol and retroaldol catalysis.

**Retroaldol activity**: The initial retroaldol rates ( $v_0^{\text{retro}}$ ) of the FucA F131A, F206A and F131A/F206A mutants, as well as of the FucA wild type, were measured for the selected purified aldol adducts *anti*-(5*R*)-**4a**, (*5S*)-**4a**, *anti*-(5*R*)-**4b**, *anti*-(5*S*)-**4b** and *anti*-(5*R*)-**5**.<sup>[13]</sup> The purpose was to ascertain putative correlations between  $v_0^{\text{retro}}$ , the initial aldol rate ( $v_0$ ) and the yields of aldol adducts achieved with the FucA mutants, particularly with F131A, relative to the FucA wild type. The initial retroaldol rates ( $v_0^{\text{retro}}$ ) were assessed by continuous monitoring of the DHAP released by a multi-enzymatic test.

A cursory inspection of Table 5 reveals that, under the assay conditions, the best initial retroaldol velocities ( $v_0^{\text{retro}}$ ) towards the selected substrates were achieved with the FucA F131A catalyst, in good agreement with the initial aldol rates ( $v_0$ ; Tables 3 and 4), except in the case of (*5S*)-**4a**, for which F131A showed a slightly lower  $v_0^{\text{retro}}$  value than the wild type, probably because it was an approximately 1:1 mixture of *syn* and *anti* diastereoisomers. The most

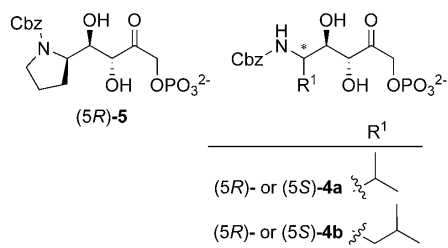


Table 5. Initial retroaldol velocities ( $v_o^{\text{retro}}$ ) of the FucA wild type and of mutants towards selected aldol adducts.

Aldol adduct	$v_o^{\text{retro}}$ [U per mg protein] <sup>[a,b]</sup>			
	FucA wild type	FucA F131A	FucA F206A	FucAF131A/F206A
(5R)- <b>4a</b>	7.9	17	1.9	1.1
(5S)- <b>4a</b> <sup>[c]</sup>	22	17	4.3	6.2
(5R)- <b>4b</b>	12	20	6.0	1.7
(5S)- <b>4b</b>	101	244	78	40
(5R)- <b>5</b>	1.2	571	3.8	49

[a] Unit definition: 1 U will generate 1  $\mu\text{mol}$  of DHAP per h at 25°C and pH 7.5 (Tris-HCl (100 mM) + KCl (150 mM)). [b] Experiments were carried out in triplicate with an estimated standard error from 5–10%. [c] An approximately 1:1 mixture of *syn* and *anti* diastereoisomers.

striking result was the  $v_o^{\text{retro}}$  value for the FucA F131A mutant with (5R)-**5**, which was about 500 times higher than that of the FucA wild type, showing a good correlation with the  $v_o$  values determined for the aldol addition of DHAP to (5R)-**3d**. Furthermore, the  $v_o^{\text{retro}}$  values for (5R)-**4a**, (5R)-**4b** and (5S)-**4b** were about twice as high for FucA F131A as for the FucA wild type, thus confirming the hyperactivity of this mutant towards these bulky substrates. The mutants F206A and F131A/F206A also showed higher retroaldol initial rates than the wild type towards compound (5R)-**5**, in good agreement with the higher conversions observed for the aldol additions with the aldehyde (5R)-**3d**. The retroaldol activities of the F206A and F131A/F206A mutants towards the other tested compounds were lower than those of the FucA wild type, however, whereas the levels of conversion were similar to or even higher than those achieved by the FucA wild type, indicating that there is no clear correlation between  $v_o^{\text{retro}}$  and the percentage of aldol adduct formed. This is because the aldol adducts obtained with the selected *N*-Cbz-amino aldehydes cannot form stable cyclic compounds (such as the hemiketals formed from hydroxyaldehyde acceptors), so the aldol adduct formed is always limited by reaction equilibrium. Investigations into how to overcome the thermodynamic limitation of these reactions are currently in progress in our lab.

**Computational binding models:** Computational modelling studies were carried out to shed light on the effects that the differential structural features of the mutant proteins obtained in this work—in particular those of the most active mutants F131A and F206A—could have on the binding

mode of the substrates, allowing for their modified catalytic properties.

To date there are a number of described FucA crystallographic structures variously of the wild-type protein or of different mutants.<sup>[9,14,15]</sup> Although the residues of the active centre are affected in many of the mutations described, the crystallographic structures show a high degree of similarity to those involving the wild type and little variation in the conformations of the other residues of this region. In all these structures there is a lack of definition of the last six to nine residues of the flexible C-terminal tail: that is, beyond residues F206–Y209 and up to residue E215. Because of the tetrameric nature of FucA, the active centre of the enzyme is made up of residues of two adjacent monomers (Figure 1), some of them belonging to the mentioned C-terminal tail of a neighbouring FucA subunit. It was therefore proposed that this flexible tail undergoes an induced fit immediately after the substrate binding at the active centre, placing residues Y209' and E214' within contact distance of the substrates. E73 has been suggested as the essential acid–base catalytic residue, whereas the hydroxy groups of residues Y209' and Y113' should be capable of establishing hydrogen bonds with the substrates (Figure 1 panel O), participating in the enzymatic mechanism by polarising the carbonyl group of the aldehyde (or the hydroxy group of the adduct) and stabilising the transition states along the aldol reaction coordinate.<sup>[9]</sup> Consistent with this role is the fact that the described Y209F and Y113F mutants show about 20-fold decreases in activity towards Fuc1P cleavage, whereas the double mutant Y113F/Y209F shows a 500-fold decrease.<sup>[9]</sup> The results obtained in this work for the Y113A mutant (Table 3) also agree with the previous observations.

Figure 1 (panel O) shows the FucA wild type active site with the modelled Y209' and E214' residues, together with a bound molecule of Fuc1P in which the *L*-lactaldehyde moiety is positioned above the DHAP portion. This illustrates the putative hydrogen-bonding interactions between the 4-OH group of Fuc1P and the phenol groups of both Y113' and Y209'. These two residues, together with F131 and F206', constitute a hydrophobic subsite from which a hydrophobic pocket would arise on mutation of any of them to Ala. This has been confirmed in the structure of FucA F131A,<sup>[9]</sup> which also shows that the positions of the neighbouring side chains (i.e., Y113', K205' and F206') were not affected, although a higher mobility (higher B-factors) of the residues at the C-terminal end was apparent. It is therefore plausible that the hydrophobic phenyl group from the Cbz moiety of aldol adducts could be located in the pocket generated by the F131A or F206A mutations.

Accordingly, the structures for the complexes of FucA F131A, FucA F206A and FucA wild type with the *anti* aldol adduct from (R)-**3d** (that is, (3R,4R,5R)-**5**) and the *syn* adduct from (S)-**3d** (that is, (3R,4S,5S)-**5**) were modelled as shown in Figure 1 (Panels A to F). The stability of the binding modes shown in Figure 1 was further assessed by running short restrained molecular dynamics (MD) under implicit solvent conditions (see the Supporting Information).

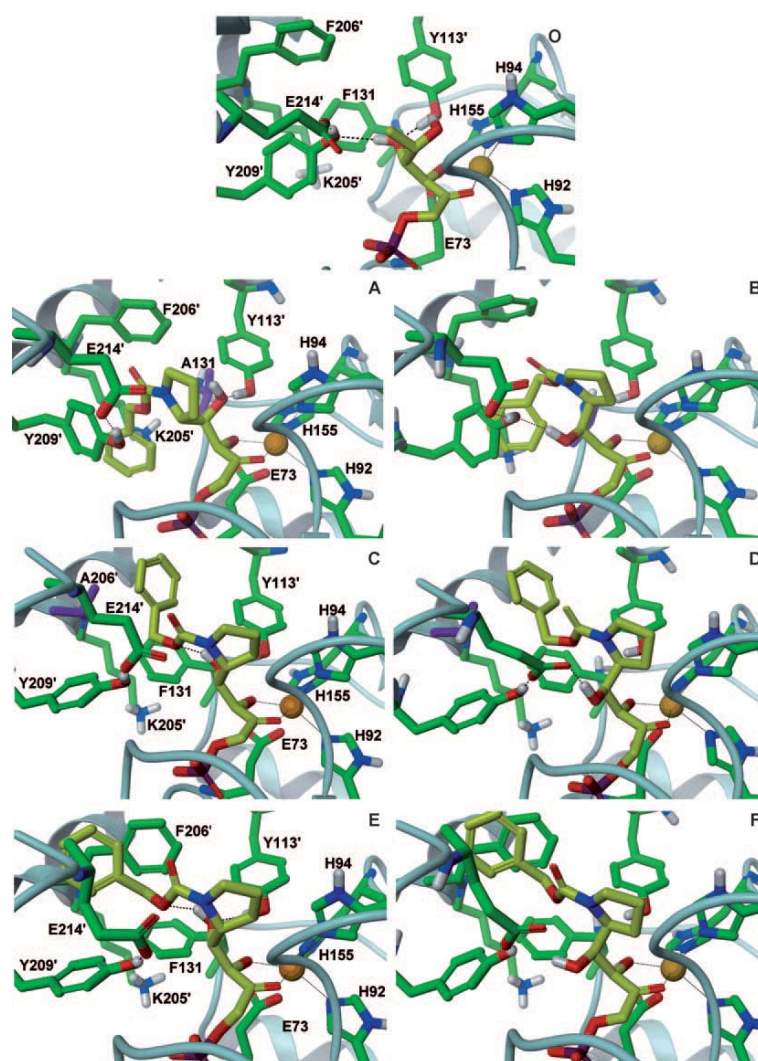


Figure 1. Modelled FucIIP bound to the active centre of the FucA wild type (panel O). A prime in the numbering (Y113', for example) denotes a residue from a neighbouring FucA subunit. The model includes a possible 3D arrangement for the residues of the C-terminal tail, based on a previous model by Joerger et al.<sup>[9]</sup> Energy-minimised models of the *anti*-aldol adduct from (*R*)-**3d** (panels A, C and E) and the *syn*-aldol adduct from (*S*)-**3d** (panels B, D and F) bound into the active sites of FucA F131A (panels A and B), FucA F206A (panels C and D) and FucA wild type (panels E and F). The mutated residues are highlighted in violet.

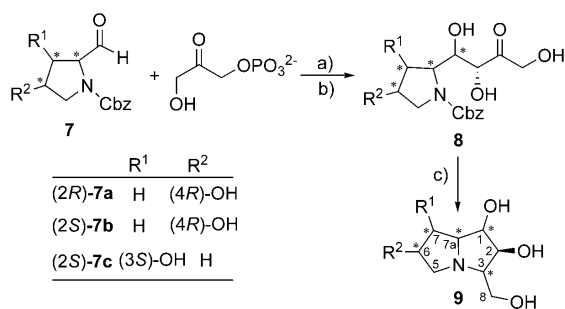
From these structures, it is noteworthy that the *anti* adduct can establish a hydrogen bond interaction between its reactive 4-OH group and the phenol group of residue Y113' in all complexes, whereas the *syn* adduct can do the same with residues Y209' or E214'. These interactions are mostly maintained during the MD trajectory, suggesting that they could efficiently participate in the enzyme mechanism as previously described. Moreover, it appears that the phenyl group from Cbz can occupy the pockets generated by the F131A and F206A mutations, as would be expected (Figure 1, A/B and C/D, respectively), with the proline ring occupying a position above the DHAP moiety similar to the arrangement of the *L*-lactaldehyde moiety on bound FucIIP (Figure 1 panel O). Furthermore, for the F131A complexes the loca-

tion of the Cbz-phenyl group is apparently stabilised by a  $\pi$ -cation interaction with the charged  $\epsilon$ -amine group of the K205' residue (i.e., shortest distance between the nitrogen of the  $\epsilon$ -amine of K205' and the carbon atoms of the Cbz-phenyl ring in any of the complexes is 3.0–3.2 Å), which is maintained after the MD runs (see the Supporting Information). This interaction would increase the binding affinity of these substrates for the active site of the F131A mutant relative to the FucA wild type and FucA F206A, because such interaction would be precluded as a result of the presence of the F131 residue in those proteins. Indeed, whereas in the F206A mutant the Cbz-phenyl ring may be efficiently accommodated in the cavity left by the mutation, the models for the FucA wild type complexes (Figure 1, E and F) suggest that to occupy an analogous position parallel to the aromatic side chain of F206', the phenyl group of Cbz would have to force the side chain of Y209' to shift away from the position that it occupies in the structure of the unbound protein. Further relocation of the aromatic rings of Cbz and Y209' is observed during the MD runs, indicating that the smaller volume of the active site cavity on FucA wild type would give rise to steric clashes with the substrate.

Therefore, although alternative binding modes could be suggested, these models appear to correlate well with the observed hyperactivity shown by the F131A mutant towards the aldehydes (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d** (Table 4) or the (*5R*)-**5 anti** adduct (Table 5). Moreover, similar binding modes could also be expected for the substrates **3a**, **3b**, **4a** and **4b**, which would yield higher affinities of these substrates relative to the FucA wild type, due to the stabilisation arising from the  $\pi$ -cation interaction with the K205' residue. Consequently, this could also translate into the generally higher activities towards those substrates shown in Tables 4 and 5 for the F131A mutant. Mutant F206A had less sharply differentiated activities relative to the wild-type enzyme (Tables 3 and 5), which would appear consistent with the fact that the

models did not show a significantly improved binding mode for the mutant other than the better accommodation of the bulky Cbz moiety in the pocket generated by the mutation. This probably explains the slightly better activity observed towards the (5*R*)-**5** *anti* adduct, whereas for the rest of the substrates this effect might be compensated by their lower conformational restriction, which could favour better accommodation of the substrates in the active site of the FucA wild type.

**Synthetic application—a concise synthesis of pyrrolizidine-type iminocyclitols:** The high activity of FucA F131A towards *N*-Cbz-proline aldehyde derivatives prompted us to explore its ability to catalyse aldol additions of DHAP to hydroxyproline derivatives as acceptors for the preparation of various polyhydroxylated pyrrolizidine iminocyclitols related to the hyacinthacine and alexine families (for papers on polyhydroxylated pyrrolizidine synthesis see<sup>[16–23]</sup>). Interestingly, some of these bicyclic iminocyclitols are inhibitors of intestinal saccharidases,<sup>[24–27]</sup> with potential applications as adjuvants for the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus and for the prevention and control of obesity.<sup>[28]</sup> To this end, *cis*-4-hydroxy-(*R*)-Cbz-proline ((2*R*)-**7a**), *trans*-4-hydroxy-(*S*)-Cbz-proline ((2*S*)-**7b**) and *trans*-3-hydroxy-(*S*)-Cbz-proline ((2*S*)-**7c**) were assayed as acceptors for the FucA F131A aldolisation with DHAP (Scheme 3) to produce the aldol adducts **8** in good yields (Table 6).



Scheme 3. FucA F131A-catalysed aldol additions of DHAP to *N*-Cbz-proline derivatives for the synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidine derivatives. a) FucA F131A, b) acid phosphatase, c) H<sub>2</sub> (50 psi), Pd/C.

Within the limits of high-field NMR spectroscopy (see below and in the Supporting Information), the aldol additions catalysed by FucA F131A were fully stereoselective. Analogously with the aldehydes (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d**, (2*R*)-**7a** provided the corresponding *anti* (3*R*,4*R*) adduct, whereas with (2*S*)-**7b** and (2*S*)-**7c** both aldolases gave *syn* (that is, (3*R*,4*S*) RhuA stereochemistry) adducts.

The aldol adducts **6a** and **8a–8c** were subjected to reductive amination (Scheme 4) by the procedure already described by us.<sup>[7]</sup> The crude materials obtained were purified by cation exchange chromatography<sup>[7]</sup> and the products were structurally characterised by NMR spectroscopy (Table 7, see below and the Supporting Information). From

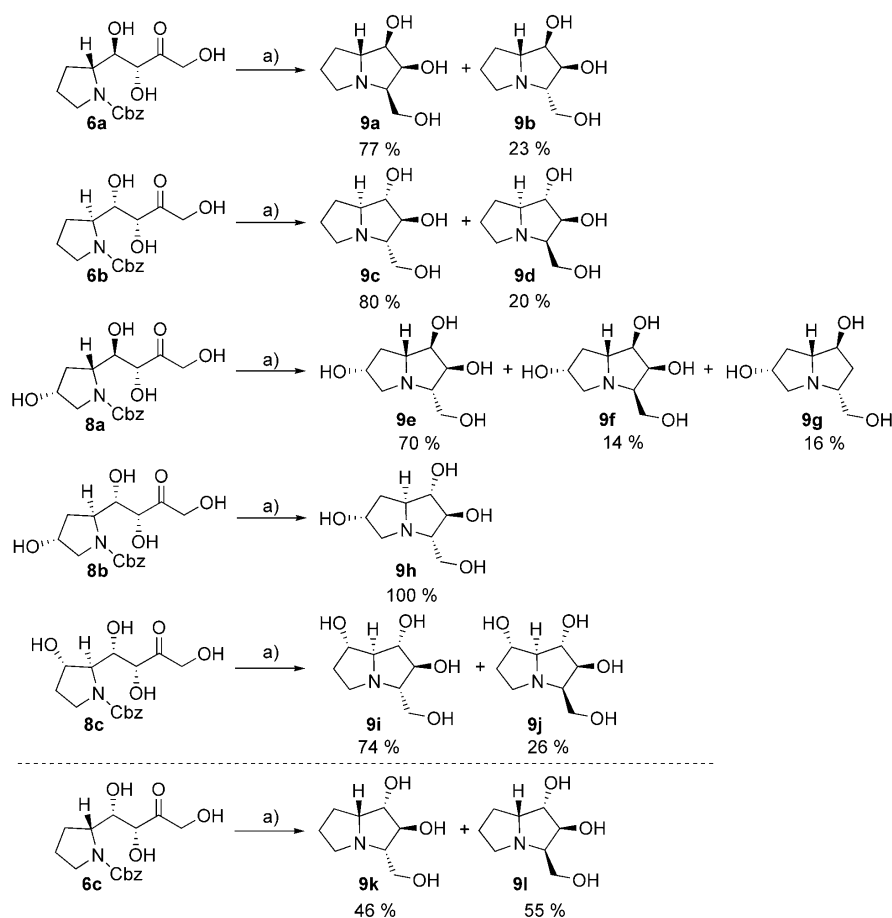
Table 6. FucA F131A-catalysed aldol additions of DHAP to *N*-Cbz-proline derivatives. Reaction productivity and isolated yields of the corresponding synthesised aldol adducts

Aldehyde	% <sup>[a]</sup> /t [h]	Yield <sup>[b]</sup> [%]	Product
( <i>R</i> )- <b>3d</b>	71/24	33	<b>6a</b>
( <i>S</i> )- <b>3d</b>	68/24	52	<b>6b</b> <sup>[c]</sup>
(2 <i>R</i> )- <b>7a</b>	95/24	60	<b>8a</b>
(2 <i>S</i> )- <b>7b</b>	87/48	49	<b>8b</b>
(2 <i>S</i> )- <b>7c</b>	76/48	44	<b>8c</b>

[a] Molar percentages of phosphorylated aldol adducts **6a–8c** formed, based on the starting DHAP (i.e., limiting substrate) as determined by HPLC with external standards. Reaction conditions described in the Experimental Section. [b] Yield of the isolated product, purification procedures were not optimised. [c] Product identical to the one obtained by RhuA catalyst and isolated in a previous study.<sup>[7]</sup>

the stereochemistry at C3, it can be concluded that the reductive amination with Pd was fully stereoselective for **8b** and moderately so ( $\approx 3:1$ ) for the rest of the compounds. For the aldol adducts **6a**, **6b**, **8b** and **8c** the major diastereomers formed were those with *syn* 1-OH/3-CH<sub>2</sub>OH configurations, as observed in other reductive aminations,<sup>[4–6]</sup> whereas for **8a** the contrary was true. Interestingly, the unexpected pyrrolizidine **9g** was isolated; it was probably formed catalytically (i.e., formal H<sub>2</sub>O elimination/hydrogenation) during the Cbz removal/reductive amination step. Compounds **9a** and **9d–g** were obtained and characterised for the first time in this work. The syntheses of compound **9h** and its enantiomer have been reported by Koch et al.<sup>[21]</sup> and Behr et al.,<sup>[22]</sup> respectively. The chemical synthesis of **9b**, that is, 7*a*-*epi*-hyacinthacine A1, has recently been reported.<sup>[29]</sup> Compound **9i** was isolated from the seeds of *Castanospermum australe* with  $[\alpha]_D^{22} = +11.6$  ( $c = 0.37$  in H<sub>2</sub>O),<sup>[25]</sup> but the absolute stereochemistry could not be determined. Compound **9i** synthesised in this work had  $[\alpha]_D^{22} = +17.9$  ( $c = 1.7$  in H<sub>2</sub>O). Due to the internal reference of the specific absolute configuration introduced by the two chiral centres of aldehyde (*S*)-**7c**, compound **9i** as described here corresponds with compound number **10** reported by Nash et al.<sup>[25]</sup>

**NMR spectroscopy analysis of proline derivatives:** The unphosphorylated aldol adducts **6a**, **6b** and **8a–8c**, as well as **6c** from a previous study involving RhuA,<sup>[7]</sup> were structurally characterised by NMR spectroscopy (see the Supporting Information). Room-temperature <sup>1</sup>H NMR spectra of all these compounds show broad signals, so low-temperature NMR spectroscopy experiments (250 K) were required for full characterisation. Each spectrum corresponds to two



Scheme 4. Reductive amination of the aldol adducts **6a–6b** and **8a–8d** and the products identified after purification. a)  $\text{H}_2$ , Pd/C). Aldol adduct **6b** and pyrrolizidines **9c** and **9d** were also obtained with use of the RhuA catalyst.<sup>[7]</sup> For purposes of comparison, the aldol adduct **6c** and the pyrrolizidines **9k** and **9l** were taken from a previous study with RhuA catalyst.<sup>[7]</sup> Compounds **9d** and **9l** are the correctly assigned products from the previous study (see compounds **7** and **9**, respectively, from the paper of Calveras et al.<sup>[7]</sup>).

main conformations, which was also corroborated by computational calculations (see the Supporting Information). From the NMR spectroscopy data, within the limits of detection, the enzymic aldol addition reactions of DHAP to (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d** were fully stereoselective and single *anti* or *syn* diastereoisomers were obtained (see the Supporting Information).

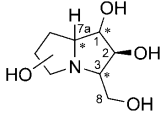
The hyacinthacine and alexine analogues were also structurally characterised and their relative stereochemistries were unequivocally assigned by NMR spectroscopy. Basically, the relative configurations of the different C1, C2, C3 and C7a stereocentres can be determined by the concerted use of NOE enhancements and *J*(H,H) coupling constants (see Table 7 and the Supporting Information). As a general trend, all pyrrolizidine derivatives show a *cis* conformation between the nitrogen lone pair and H7a, in close agreement with theoretical calculations.

In a previous study, we demonstrated that RhuA was able to accommodate (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d** to give four stereoisomers of hyacinthacines A1 and A2 (compounds **6–9** in

Ref. [7]). Two of them were stereochemically assigned by NMR spectroscopy as 1*S*,2*S*,3*S*,7*aS* (**6**) and 1*S*,2*S*,3*S*,7*aR* (**8**), as typically generated from RhuA catalysis, and two more to 1*R*,2*S*,3*R*,7*aS* (**7**) and 1*R*,2*S*,3*R*,7*aR* (**9**), epimeric at C1 and C3, typically from FucA catalysis. In the light of those results, it was concluded that RhuA aldolase was not stereoselective. Through assessment of the NMR spectra data for the pyrrolizidine iminocyclitols derived from the (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d** aldehydes reported in our previous study<sup>[7]</sup> and comparison with those obtained in this work, it can be confirmed unequivocally that the aldol additions of DHAP to proline derivatives catalysed by RhuA and FucA aldolases were fully stereoselective (see the Supporting Information). The pyrrolizidine iminocyclitol structures, that is, the products numbered **7** and **9** in the previous study,<sup>[7]</sup> were hence incorrectly assigned at their C1 stereocentres: as 1*R*,2*S*,3*R*,7*aS* and 1*R*,2*S*,3*R*,7*aR* instead of the correct 1*S*,2*S*,3*R*,7*aS* and 1*S*,2*S*,3*R*,7*aR*, respectively. Therefore, the pertinent conclusion, consistent with the results

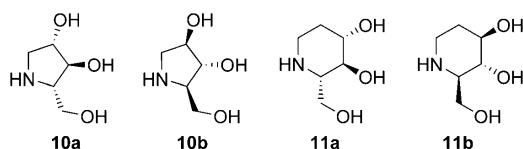
of this paper, is that for most of the proline-derived adducts the reductive amination by Pd was not stereoselective and gave mixtures of two diastereoisomers epimeric at C3.

**Inhibitory activity against glycosidases:** The polyhydroxylated pyrrolizidines generated were screened as inhibitors against a panel of commercially available glycosidases (Table 8) and rat intestinal disaccharidases (sucrase, lactase, threhalase and maltase, Table 9). For purposes of comparison, the inhibitory activities of the previously synthesised iminocyclitols 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol (LAB, **10a**), 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB, **10b**), D-fagomine (**11a**) and L-fagomine (**11b**) and of the pyrrolizidines **9k** and **9l** were also evaluated.<sup>[4,5,7]</sup> Both **10a** and **10b** had inhibitory properties consistent with those previously published.<sup>[32]</sup> Interestingly, LAB showed moderate inhibitory activity towards  $\alpha$ -L-rhamnosidase and no inhibition towards  $\alpha$ -D-mannosidase and  $\alpha$ -L-fucosidase, whereas the contrary was true for DAB. Compound **11a** was found to be a weak inhibitor of  $\alpha$ -D-glucosidase from rice,<sup>[33]</sup> whereas its enan-

Table 7.  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  chemical shifts (ppm) and  $^3J(\text{H,H})$  coupling constants for compounds **9a–9i** (in  $\text{D}_2\text{O}$ )


Compound <sup>[a]</sup>	H1 (C1)	H2 (C2)	H3 (C3)	H7a (C7a)	$^3J(7a,1)$	$^3J(1,2)$	$^3J(2,3)$
<b>9a</b>	3.89 (79.3)	4.23 (75.7)	2.93 (71.1)	3.37 (69.3)	8.5	3.8	3.5
<b>9b</b>	4.00 (76.9)	4.09 (72.6)	3.42 (66.6)	3.63 (73.0)	2.3	5.1	10.2
<b>9c</b> <sup>[b]</sup>	3.74 (79.0)	3.78 (82.1)	2.75 (71.4)	3.20 (68.3)	8.0	8.0	9.5
<b>9d</b> <sup>[b,c]</sup>	3.96 (83.7)	4.10 (81.8)	3.38 (67.1)	3.37 (74.8)	2.2	1.6	3.8
<b>9e</b>	4.01 (77.9)	4.14 (72.8)	3.19 (67.1)	3.40 (70.1)	2.9	5.4	9.1
<b>9f</b>	4.39 (79.6)	4.31 (75.3)	3.56 (73.4)	3.74 (69.8)	8.9	3.4	3.4
<b>9g</b>	4.30 (78.3)	1.86–2.12 (35.6)	3.71 (65.2)	3.63 (75.1)	≈0	5.5; ≈0	4.7; 12.5
<b>9h</b>	3.87 (82.7)	3.85 (80.0)	2.82 (72.5)	3.45 (67.8)	7.3	7.0	8.5
<b>9i</b>	3.71 (80.1)	3.76 (78.6)	2.69 (70.8)	3.04 (76.4)	8.2	8.2	8.8
<b>9j</b>	4.17 (81.2)	4.17 (81.2)	3.44 (67.4)	3.23 (80.4)	2.0	2.0	6.8
<b>9k</b> <sup>[b]</sup>	4.15 (78.3)	3.92 (77.6)	3.20 (66.6)	3.82 (66.9)	7.8	6.4	9.3
<b>9l</b> <sup>[b,c]</sup>	4.05 (77.5)	4.31 (80.8)	3.04 (70.8)	3.83 (69.5)	4.4	1.5	3.6

[a] Compounds of this work and references to others with identical relative stereochemistry at C1, C2, C3, and C7a: **9a** and **9f**,<sup>[19,27]</sup> **9b** and **9c**,<sup>[29,30]</sup> **9e**, **9h** and **9i**,<sup>[20,22,26,27,31]</sup> **9d** and **9j**,<sup>[17]</sup> **9k**,<sup>[18,22]</sup> **9l**.<sup>[27]</sup> [b] Data from a previous study.<sup>[7]</sup> [c] **9d** and **9l** are the correctly assigned products from the previous study (see compounds **7** and **9**, respectively, from the paper of Calveras et al.<sup>[7]</sup>).



tiomer **11b** had poorer inhibitory properties against  $\alpha$ -D-glucosidase from rice but elicited some activity against  $\beta$ -D-galactosidase from bovine liver. A cursory inspection of Table 8 reveals that, of the glycosidases tested, the polyhydroxylated pyrrolizidines were active and selective against  $\alpha$ -D-glucosidase from rice, with the most potent being **9c**,<sup>[7]</sup> with a configuration at C1, C2, C3 and C7a identical to that of LAB. The presence of hydroxy groups at C6 (**9h**) or C7 (**9i**) or inversion of the C7a stereocentre (**12**) decreased  $K_i$  values and produced weaker inhibitors. Remarkably, **9a** was a potent inhibitor of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *P. decumbens* with a  $K_i$  value about 10 times lower than that of **12** with inverted C1 and C3 stereocentres, and much lower than those of **13** and **9b**, with inversion only at C1 or C3. Compound **9a** was also a moderate inhibitor of  $\alpha$ -L-fucosidase and the most potent of those synthesised in this work towards this glycosidase. Interestingly, the presence of a hydroxy group at C6 (**9f**) and the lack of the hydroxy at C2 (**9g**) dramati-

cally decreased the inhibitory activity towards  $\alpha$ -L-fucosidase.

**Inhibitory activity against rat intestinal disaccharidases:** It has been reported that polyhydroxylated pyrrolizidines are inhibitors of rat intestinal disaccharidases,<sup>[24–27]</sup> so we also screened the synthesised pyrrolizidines **9a–9j** as inhibitors of these. For purposes of comparison, LAB (**10a**), DAB (**10b**), D-fagomine (**11a**) and L-fagomine (**11b**) were also included. The two compounds **10a** and **10b** were the most active against the rat intestinal saccharidases, consistently with the reported literature values (Table 9),<sup>[32]</sup> whereas **11a** and **11b** were poor inhibitors of sucrase and maltase. Of the polyhydroxylated pyrrolizidines of this work, **9h** was the most active against sucrase, lactase and, particularly, maltase. Compound **9h** has the same configuration as **10a** at C1, C2 and C3. Changing the hydroxy group from the C6 to the C7 position (compound **9i**) completely removed its inhibi-

tory properties against disaccharidases. Moreover, inversion of the stereochemistry of C3 in **9i** (compound **9j**) resulted in recovery of some activity. The introduction of a hydroxy group at C6 and/or elimination of the hydroxy group at C2 in **9a** (compounds **9f** and **9g**, respectively, for example) also abolished the inhibitory properties. Changing the C3 configuration in **9f** (compound **9e**, for example) did not have any effect on the inhibitory properties. Overall, none of the pyrrolizidines synthesised showed any remarkable inhibition of the disaccharidases assayed.

## Conclusion

Minimal changes in the FucA active site, for example FucA F131A and FucA F206A, lead to new aldolase mutants with improved tolerance towards sterically demanding C- $\alpha$  substituted *N*-Cbz-amino aldehydes. FucA F131A was a hyperactive mutant that showed the best synthetic capabilities with regard to the conformationally restricted *N*-Cbz-proline derivatives. The double mutant FucA F131A/F206A did not improve on the results achieved with one single mutation, so there was no synergism of these two mutations. Measurements of retroaldol activities towards the *anti* (3*R*,4*R*) adducts showed that FucA F131A was the most



Table 8. Activities ( $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) and  $K_i$  ( $\mu\text{M}$ ) values (in parentheses)) of the synthesised compounds against commercially available glycosidases.<sup>[a]</sup>

Compound	$\alpha$ -D-Glucosidase <sup>[f]</sup>	$\alpha$ -D-Glucosidase <sup>[j]</sup>	$\beta$ -D-Glucosidase <sup>[k]</sup>	$\beta$ -D-Galactosidase <sup>[l]</sup>	$\alpha$ -L-Rhamnosidase <sup>[m]</sup>	$\alpha$ -D-Mannosidase <sup>[n]</sup>	$\alpha$ -L-Fucosidase <sup>[o]</sup>
<b>10a</b> <sup>[b]</sup>	1.8 ± 0.1 (0.8 ± 0.1) <sup>[g]</sup>	0.05 ± 0.01 (0.04 ± 0.01) <sup>[j]</sup>	685 ± 112 (1014 ± 81) <sup>[k]</sup>	n.i.	56 ± 5 (98 ± 5) <sup>[g]</sup>	n.i.	n.i.
<b>10b</b> <sup>[c]</sup>	0.33 ± 0.02 (0.17 ± 0.01) <sup>[h]</sup>	61 ± 7 (104 ± 75) <sup>[h]</sup>	276 ± 25 (100 ± 64) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	286 ± 27 (111 ± 60) <sup>[j]</sup>	20 ± 1 (5 ± 1) <sup>[h]</sup>
<b>11a</b> <sup>[d]</sup>	n.i. <sup>[q]</sup>	61 ± 7 (18 ± 8) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>11b</b> <sup>[c]</sup>	n.i.	126 ± 7 (236 ± 61) <sup>[h]</sup>	n.i.	154 ± 22 (76 ± 21) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9a</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	2.0 ± 0.2 (2.1 ± 0.8) <sup>[j]</sup>	n.i.	185 ± 9 (18 ± 6) <sup>[j]</sup>
<b>9b</b>	n.i.	804 ± 7	n.i.	n.i.	422 ± 12 (340 ± 35) <sup>[g]</sup>	n.i.	264 ± 18 (143 ± 33) <sup>[h]</sup>
<b>9c</b> <sup>[e]</sup>	n.d. <sup>[r]</sup>	30 (4.7 ± 0.5) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	115 (57.0 ± 0.9) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.
<b>9d</b> <sup>[e,p]</sup>	n.d.	700	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9e</b>	n.i.	271 ± 138 (357 ± 110) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9f</b>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	598 ± 78 (478 ± 80) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.
<b>9g</b>	n.i.	690 ± 287 (411 ± 16) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	620 ± 45
<b>9h</b>	n.i.	44 ± 9 (25 ± 3) <sup>[h]</sup>	448 ± 60 (555 ± 202) <sup>[k]</sup>	447 ± 22 (688 ± 200) <sup>[g]</sup>	n.i.	174 ± 97 (149 ± 19) <sup>[h]</sup>	n.i.
<b>9i</b>	n.i.	72 ± 22 (311 ± 23) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	196 ± 31 (221 ± 9) <sup>[h]</sup>	95 ± 41 (600 ± 8) <sup>[h]</sup>	327 ± 7 (100 ± 4) <sup>[h]</sup>
<b>9j</b>	n.i.	31 ± 11 (477 ± 91) <sup>[h]</sup>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9k</b> <sup>[d]</sup>	n.d.	800	n.i.	n.i.	90 (33 ± 1) <sup>[g]</sup>	n.i.	n.i.
<b>9l</b> <sup>[d,p]</sup>	n.d.	n.i.	n.i.	n.i.	300	n.i.	n.i.

[a] Data are the mean values of triplicate experiments ± standard error of the mean (SE). [b] Synthesised in a previous work.<sup>[5]</sup> [c] Synthesised in a previous work.<sup>[34]</sup> [d] Synthesised in a previous work.<sup>[35]</sup> [e] Inhibitory data taken from ref. [7]. [f] From baker's yeast. [g] Noncompetitive inhibition ( $\alpha = 1$ ). [h] Competitive inhibition. [i] Noncompetitive inhibition ( $\alpha \neq 1$ ).<sup>[36]</sup> [j] From rice. [k] From sweet almonds. [l] From bovine liver. [m] From *Penicillium decumbens*. [n] From jack beans, *Genus Canavalia*. [o] From bovine kidney. [p] Structures assigned incorrectly at C1 stereocentre in our previous study.<sup>[7]</sup> [q] n.i. = no inhibition: that is,  $IC_{50} \geq 1$  mM. [r] n.d. = not determined.

Table 9. Activities ( $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )) of the synthesised compounds against rat intestinal saccharidases.<sup>[a]</sup>

Compound	Sucrase	Lactase	Trehalase	Maltase
<b>10a</b>	0.29 ± 0.02	50 ± 36	74 ± 34	0.2 ± 0.1
<b>10b</b>	22 ± 12	140 ± 84	67 ± 19	50 ± 36
<b>11a</b>	484 ± 4	n.i. <sup>[b]</sup>	n.i.	209 ± 92
<b>11b</b>	144 ± 26	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9a</b>	179 ± 56	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9b</b>	463 ± 202	n.i.	n.i.	n.i.
<b>9h</b>	138 ± 12	196 ± 12	n.i.	88 ± 8
<b>9j</b>	142 ± 55	n.i.	224 ± 54	n.i.
activity (UI) <sup>[c]</sup>	4.01 ± 0.48	0.75 ± 0.07	2.44 ± 0.41	27.50 ± 3.55

[a] The experiments were performed in triplicate for each set of saccharidases obtained from one rat. Two different rats ( $n = 2$ ) were used. Activities are expressed as  $\mu\text{M}$  ± standard error of the mean (SE). [b] n.i. = no inhibition, that is,  $IC_{50} \geq 1$  mM. [c] Activity of each intestinal saccharidase towards their natural substrate, that is, sucrose, lactose, trehalose and maltose, respectively.

active, in good agreement with its initial velocity ( $v_0$ ) values for the aldol addition reactions. Remarkably, the mutant F131A and the double mutant F131A/F206A gave initial retroaldol rates with the aldol adduct from (*R*)-prolinal around 500- and 40-times higher, respectively, than that of

the FucA wild type. In addition, FucA F131A showed activity improvements, relative to the rest of the substrates, of around 4- to >25-fold in the aldol addition and up to 2.4-fold in the retroaldol reactions. On the other hand, it was observed that the initial retroaldol velocities of the F206A and F131A/F206A mutants were lower than those of the FucA wild type, whereas the contrary was true for the percentages of aldol adducts formed. However, it must be taken into account that the aldol adducts obtained with the selected *N*-Cbz-amino aldehydes cannot form stable cyclic compounds, so the amount of aldol adduct formed is always limited by the reaction equilibrium. The reaction yield may therefore not be directly predicted from the retroaldol activities and other factors, including those relating to the precise mechanisms for the aldol and retroaldol reactions and how they affect the kinetics and the reaction equilibrium, must be considered.

Molecular models suggest that the improved activity of FucA F131A towards bulky and more rigid substrates, such as *N*-Cbz-prolinal, could be the result of improved affinity of the substrate for the active centre of the enzyme due to an additional  $\pi$ -cation interaction with the K205' residue

and of the efficient contact between the substrate and the mechanistically important Y113' and Y209' residues.

FucA F131A was used as a catalyst for the aldol addition reactions of DHAP to *N*-Cbz-hydroxyprolinal derivatives, allowing a concise synthesis of novel polyhydroxylated pyrrolizidines of the hyacinthacine and alexine types. These new iminocyclitol derivatives showed moderate activities against  $\alpha$ -D-glucosidase from rice and low activities against rat intestinal sucrase. Among them, compound **9a** was a potent inhibitor of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *P. decumbens* and a moderate inhibitor of  $\alpha$ -L-fucosidase from bovine kidney and **9h** was moderately active against sucrase, lactase and maltase rat intestinal disaccharidases.

## Experimental Section

**Materials:** Synthetic oligonucleotides were purchased from MWG-Bio-*tech*. Acid phosphatase (PA, EC 3.1.3.2, 5.3 U mg<sup>-1</sup>) was from Sigma–Aldrich. The precursor of dihydroxyacetone phosphate (DHAP), dihydroxyacetone phosphate dimer bis(ethyl ketal), was synthesised in our lab by a procedure described by Jung et al.<sup>[37]</sup> with slight modifications. Deionised water was used for preparative HPLC and Milli-Q-grade water for analytical HPLC. All other solvents used were of analytical grade. Individual enantiomerically pure *N*-Cbz-amino aldehydes used in this study were synthesised in our lab by previously published procedures.<sup>[6]</sup> The dicyclohexylamine salt of L-fucose-1-phosphate (Fuc1P) was synthesised with the use of FucA aldolase as described in reported procedures.<sup>[38]</sup> Glycerol 3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle (GDH) and NADH were from Sigma–Aldrich. The plasmid pQE-FucA containing the gene for expression of His-tagged L-fucose-1-phosphate aldolase was a generous gift from the Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.<sup>[39]</sup> High density IDA agarose 6BCL (nickel charged) was from Hispanagar.

**HPLC analyses:** HPLC analyses were performed with a RP-HPLC cartridge (250×4 mm) filled with Lichrosphere 100 (RP-18, 5  $\mu$ m) from Merck (Darmstadt, Germany). Samples (25  $\mu$ L) were withdrawn from the aldol reactions, dissolved in MeOH (1 mL) to stop the reaction and analysed by HPLC. The solvent system used was: solvent A (aqueous trifluoroacetic acid (TFA) (0.1%, v/v)) and solvent B (TFA (0.095%, v/v) in acetonitrile/H<sub>2</sub>O 4:1), gradient elution from 10 to 70% B (reactions with aldehydes (*R*)-**1** and (*S*)-**1**) or 30 to 90% B (reactions with aldehydes (*R*)- and (*S*)-**3a**, **-3b**, **-3c** and **-3d**) over 30 min, flow rate 1 mL min<sup>-1</sup>, detection 215 nm, column temperature 30°C. The amounts of aldol adduct produced were quantified from the peak areas by use of an external standard methodology. The external standards consisted of solutions of purified aldol adducts of known concentration.

**Electrospray mass spectrometry of proteins:** *Sample preparation:* Each protein (1 mL of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suspension) was centrifuged and resuspended in water (1 mL). Samples were dialysed against water (5 L, 0.1% formic acid) to remove the salts. Samples (10  $\mu$ L) were analysed by HPLC-ESI-MS with use of an Acquity UPLC BEH300 C18 column (1.7  $\mu$ m, 2.1×100 mm) and an ESI-TOF mass spectrometer (LCT PremierWaters, Milford, MA, USA) fitted with a 4 GHz time-to-digital converter (TDC) with a dual ESI source (LockSpray). The second sprayer provided the lock mass calibration with leucine enkephalin (*m/z* 556.2771). The ESI-TOF was operated in the W-optics mode, thus providing a mass resolution of at least 10000 full-width at half maximum (FWHM). The acquisition time per spectrum was set to 0.2 s, and the mass range was from 500 to 1800 Da. Data were acquired with use of a cone voltage of 50 V, a capillary voltage of 3000 V, a desolvation temperature of 350°C, and a source temperature of 100°C. The desolvation gas flow was set at 400 L h<sup>-1</sup> and the cone gas flow was set at 30 L h<sup>-1</sup>. The solvent system used for the elution was: solvent A (aqueous formic acid (0.1%, v/v)) and solvent B (formic acid (0.1%, v/v) in acetonitrile), gradi-

ent elution 0% B for 5 min, from 5 to 70% B over 12 min, from 70 to 100% B over 1 min, flow rate 0.3 mL min<sup>-1</sup>. MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) was used for data acquisition and processing. Magtran software,<sup>[40]</sup> kindly provided by Dr. Zhongqi Zhang (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA), was used for molecular weight deconvolution from ESI-MS spectra of proteins.

**Mutagenesis:** FucA gene mutations were introduced with the aid of the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), with the oligonucleotides listed in the Supporting Information and the plasmid pQE-FucA as template. DNA sequencing and mass spectra analysis of the expressed proteins (see the Supporting Information) confirmed the expected mutations in the gene sequence.

**Gene expression and protein purification:** For protein production, the plasmids were transformed into *E. coli* strain M-15 [pREP-4] (QIAGEN). Cells were grown at 37°C in 2 L flasks containing defined medium (1 L) with ampicillin (100 mg L<sup>-1</sup>) and kanamycin (25 mg L<sup>-1</sup>), up to an optical density of 0.6 at 600 nm.<sup>[41]</sup> At that point, protein expression was induced by addition of isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) to a final concentration of 50  $\mu$ M and the temperature was lowered to 30°C to avoid formation of inclusion bodies. After an additional 4 h of incubation, cells were harvested, suspended in starting buffer (disodium hydrogen phosphate (50 mM), NaCl (300 mM), imidazole (20 mM), pH 8.0) and lysed by use of a Cell Disrupter (TS 0.75 kW 40 K, Constant Systems). Cellular debris was removed by centrifugation at 12000 *g* for 10 min. The clear supernatant was collected and purified by affinity chromatography in a FPLC system (Amersham Biosciences). The crude supernatant was applied to a cooled HR 16/40 column (GE Healthcare) containing affinity beads (50 mL) and was washed with start buffer (150 mL). The protein was eluted with disodium hydrogen phosphate buffer (pH 8.0, 50 mM) containing NaCl (300 mM) and imidazole (300 mM) at a flow rate of 3 mL min<sup>-1</sup>. ZnSO<sub>4</sub> (up to 1 mM) was added to the eluted protein and the mixture was incubated for 15 min. Addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.4 g mL<sup>-1</sup> of liquid) caused protein precipitation. The resulting pellet was centrifuged at 12000 *g* for 10 min, suspended in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 mL, 0.4 g mL<sup>-1</sup>) and centrifuged again. The pellet was finally suspended in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 mL, 0.4 g mL<sup>-1</sup>) and stored at 4°C.

**Analytical methods:** Protein concentration was calculated by colour densitometry in SDS-PAGE with use of Image J 1.37 v. Activity assays with the natural substrate L-fucose-1-phosphate were carried out as described by Durany et al.<sup>[42]</sup>

**Initial aldol velocity:** The initial aldol velocities (*v*<sub>0</sub>) were determined by measuring the amount of aldol adduct produced by HPLC at the initial reaction times. The *N*-Cbz-amino aldehyde (24.5  $\mu$ mol) was dissolved in dimethylformamide (72  $\mu$ L) and mixed with freshly neutralised (pH 6.9) DHAP solution (141  $\mu$ L, 14.4  $\mu$ mol). The aldolase solution (100  $\mu$ L, 0.29 mg, amount corresponding to 8 U mL<sup>-1</sup> reaction for the FucA wild type) was added to this mixture, which was placed in a vortex mixer (1000 rpm) at 25°C. Samples (25  $\mu$ L) were withdrawn at different times (7, 15, 30 and 60 min) and diluted with MeOH (500  $\mu$ L), and the amount of aldol adduct produced was analysed and quantified by HPLC as described above. Linear correlations were found for levels of conversion lower than 15%. The estimated standard error for three determinations was between 10–12%.

**Initial retroaldol velocity:** Retroaldol assays with the aldol adducts (*R*)-**5** and (*R*)- and (*S*)-**4a** and **-4b** were carried out by the previous assay method with some modifications. A solution of NADH (2 mM) in Tris-HCl buffer (pH 7.5, 100 mM, 0.9 mL) containing KCl (150 mM), the aldolase (variable amount depending on the activity) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (1.7 U mL<sup>-1</sup>) was incubated at 25°C for 5 min. The corresponding aldol adduct (100  $\mu$ L, 100 mM) in Tris-HCl buffer (pH 7.5, 100 mM) containing KCl (150 mM) was added to this solution up to a total final volume of 1 mL. The decrease in the absorbance of NADH at 340 nm was measured.

**Enzymatic aldol reactions:** Analytical scale reactions (360  $\mu$ L total volume) were conducted in 2 mL test tubes stirred with a vortex mixer (VIBRAX VXR basic, Ika) at 1500 rpm and 4°C. The *N*-Cbz-amino aldehyde (24.5  $\mu$ mol) dissolved in dimethylformamide (72  $\mu$ L) was mixed with freshly neutralised (pH 6.9) DHAP solution (141  $\mu$ L, 14.4  $\mu$ mol).

The mixture was cooled on ice, the aldolase solution (100  $\mu\text{L}$ , 0.29 mg, amount corresponding to 8  $\text{U mL}^{-1}$  reaction for the FucA wild type) was added to start the aldol reaction, and the reactor was placed in a vortex mixer (1000 rpm) at 4°C. At 24 h samples (25  $\mu\text{L}$ ) were withdrawn, diluted with MeOH (1.0 mL) and analysed by HPLC under the conditions described above.

Preparative enzymatic aldol addition reactions (15–20 mL total volume) were conducted to obtain the corresponding iminocyclitols and thus to infer the stereoselectivity of the enzymatic aldol addition reaction. The procedures utilised were similar to those described by us in previously reported work.<sup>[6,43]</sup> The stereochemistry of the resulting iminocyclitols was unequivocally assessed by comparison of their high-field NMR spectroscopy data with compounds previously obtained and fully characterised in our lab (see the Supporting Information).<sup>[4,6,43]</sup>

The aldol adducts **6a** and **6b** were also directly characterised by NMR spectroscopy (see below and the Supporting Information) to determine the relative configurations of the two newly formed stereogenic centres. For purposes of comparison the unphosphorylated aldol adducts with *syn* configurations of the vicinal diols, obtained from the aldol additions of DHAP to (*R*)-**3d** and (*S*)-**3d** catalysed by *L*-rhamnulose-1-phosphate aldolase from *E. coli*,<sup>[7]</sup> were also characterised in this work by NMR spectroscopy (see the Supporting Information).

**Preparative synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidine derivatives from proline analogues:** The syntheses of the *N*-Cbz-hydroxy proline derivatives (*R*)-**7a**, (*S*)-**7b** and (*S*)-**7c** were easily achievable from the corresponding commercial *cis*-4-hydroxy-(*R*)-proline, *trans*-4-hydroxy-(*S*)-proline, and *trans*-3-hydroxy-(*S*)-proline. As an example the procedure for the synthesis of *trans*-*N*-Cbz-3-hydroxy-(*S*)-proline ((*S*)-**7c**) is described.

**a) *trans*-3-Hydroxy-(*S*)-proline methyl ester hydrochloride:** *trans*-3-Hydroxy-(*S*)-proline (5.0 g, 38.1 mmol) was dissolved in MeOH (20 mL) and the mixture was cooled to 0°C with an ice bath.  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (76.3 mmol, 5.56 mL) was added to this solution dropwise at such a rate as to maintain the reaction mixture below 4°C. Stirring of the reaction mixture was continued at room temperature overnight. The solvent was then removed under reduced pressure and the obtained solid was washed with ethyl ether (6.8 g, 98%).

**b) *trans*-3-*N*-Cbz-Hydroxy-(*S*)-proline methyl ester:** The methyl ester hydrochloride derivative (6.8 g, 37.5 mmol) and bicarbonate (119 mmol, 10 g) were dissolved in dioxane/water 1:1 (50 mL). *N*-(Benzyloxycarbonyl)succinimide (37.5 mmol, 9.3 g) dissolved in dioxane was then added dropwise over 1 hour. After 24 h the solvent was removed under vacuum, and the crude product was dissolved with ethyl acetate and washed with citric acid (10%, 3  $\times$  200 mL), bicarbonate (3  $\times$  200 mL) and brine (2  $\times$  200 mL). The organic layer was dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and dried to obtain an oil (10.3 g, 98%).

**c) *trans*-3-*N*-Cbz-Hydroxy-(*S*)-prolinol:** The *N*-Cbz-hydroxy proline methyl ester derivative (10.3 g, 36.9 mmol) was reduced by treatment with  $\text{NaBH}_4$  (147.5 mmol, 5.6 g) by the same procedure as described by Luly et al. (Method B) with a slight modification.<sup>[44]</sup> After the addition of  $\text{NaBH}_4$  the reaction was allowed to warm up slowly to room temperature.

**d) *trans*-3-*N*-Cbz-Hydroxy-(*S*)-proline ((*S*)-**7c**):** The *N*-Cbz-hydroxy prolinol (1.0 g, 4.0 mmol) was oxidised by treatment with 2-iodoxybenzoic acid (IBX) by the procedures already described by us.<sup>[6,7]</sup> Complex NMR spectra due to the presence of multiple rotamers were recorded.

***cis*-4-Hydroxy-(*R*)-Cbz-proline ((*R*)-**7a**):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (0.83 g, 84%).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19.5$  ( $c = 1.9$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.74$  (s, 0.5H), 9.66 (s, 0.5H), 7.40 (m, 5H), 5.31–5.00 (m, 2H), 4.50–4.00 (m, 2H), 3.81–3.38 (m, 2H), 2.94–2.13 ppm (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 199.7, 199.5, 155.8, 155.0, 136.4, 136.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 70.3, 69.4, 67.9, 67.8, 63.8, 63.7, 56.0, 55.2, 36.3, 35.5$  ppm.

***trans*-4-Hydroxy-(*S*)-Cbz-proline ((*S*)-**7b**):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (0.88 g, 89%).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -38.5$  ( $c = 2.5$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.61$  (d,  $^3J = 1.9$  Hz, 0.5H), 9.48 (d,  $^3J = 3.1$  Hz, 0.5H), 7.53–7.24 (m, 5H), 5.34–5.05

(m, 2H), 4.64–4.18 (m, 1H), 4.01–3.19 (m, 3H), 3.11–1.62 ppm (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 199.7, 199.5, 155.8, 155.0, 136.4, 136.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 70.3, 69.4, 67.8, 67.8, 63.8, 63.7, 56.0, 55.2, 36.3, 35.5$  ppm.

***trans*-3-Hydroxy-(*S*)-Cbz-proline ((*S*)-**7c**):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (0.81 g, 82%).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -58.6$  ( $c = 3.2$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$ );  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9.63$  (s, 0.5H), 9.55 (d,  $^3J = 1.2$  Hz, 0.5H), 7.46–7.30 (m, 5H), 5.39–4.99 (m, 2H), 4.61–4.19 (m, 1H), 4.11–2.94 (m, 3H), 2.67–1.54 ppm (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 199.2, 155.8, 154.9, 136.4, 136.3, 128.8, 128.4, 128.2, 74.0, 73.5, 72.8, 71.5, 67.7, 45.2, 44.9, 33.2, 32.6$  ppm.

**Enzymatic aldol condensations (General Procedure):** Reactions at preparative scale (20–40 mL total volume) were performed in 50 mL Erlenmeyer flasks with screw caps. The *N*-Cbz-proline derivative (1.7–3.4 mmol, 1.7 equiv per mol DHAP) was dissolved in DMF (the amount corresponding to 20%, v/v of the total). The DHAP solution (volume corresponding to 80%, v/v of the total, 1–2 mmol) at pH 6.9, freshly prepared as described above, was then added dropwise with stirring at 4°C, with a vortex mixer. Finally, FucA F131A (0.8–1.3 mg per mL reaction mixture) was added and mixed again. The Erlenmeyer was placed on a horizontal shaking bath (200 rpm) at 4°C. The reactions were monitored by HPLC. When the amount of aldol adduct was constant with the time (24 h) the reaction was stopped by addition of MeOH (1.5 times the reaction volume). The methanol was then evaporated off and the aqueous solution was washed with ethyl acetate to remove the unreacted *N*-protected amino aldehyde. The aqueous layer was collected, the remaining ethyl acetate was removed under reduced pressure, and the product was lyophilised. The solid obtained was dissolved in plain water (ca 10–20 mL) and the pH was adjusted to 5.5 with TFA. Acid phosphatase (5.3 U per mmol phosphorylated adduct) was added to this solution. The reaction was followed by HPLC until no starting material was detected. Further phosphatase units were added, if necessary, to direct the reaction to completion. The reaction mixture was then filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose membrane filter. The filtrate was loaded onto a XTerra (19  $\times$  250 mm) column, and eluted with a gradient of  $\text{CH}_3\text{CN}$  (8 to 56% over 30 min) in plain water. Pure fractions were pooled and lyophilised.

These products were structurally characterised by NMR spectroscopy with special attention to the elucidation of the relative configurations of the newly formed stereogenic centres. The specific chiral centres of the starting *N*-Cbz-proline derivatives served as internal references for the assignment of the absolute stereochemistry for the new formed ones. Because these were intermediates no further physical data were determined.

**(*R*)-Benzyloxycarbonyl-2-((1*R*,2*R*)-1,2,4-trihydroxy-3-oxobutyl)pyrrolizidine (**6a**):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (194 mg, 33%). Major conformation  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 7.33$ –7.46 (m, 5H), 5.15–5.10 (m, 2H), 4.58 (A of AB system,  $^3J = 19.0$  Hz, 1H), 4.43 (B of AB system,  $^3J = 19.1$  Hz, 1H), 4.24 (dd,  $^3J = 7.8, 3.3$  Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 4.08 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H), 3.55 (m, 2H), 2.12 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.82 ppm (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 212.2, 156.8, 138.0$ –129.6, 76.9, 71.9, 68.0, 67.7, 60.8, 48.3, 25.8, 25.5 ppm. Minor conformation  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 7.33$ –7.46 (m, 5H), 5.21–5.15 (m, 2H), 4.55 (A of AB system,  $^3J = 19.1$  Hz, 1H), 4.35 (B of AB system,  $^3J = 19.2$  Hz, 1H), 4.08 (dd,  $^3J = 8.8, 1.9$  Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.01 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1H), 3.55 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.82 ppm (m, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 212.2, 156.6, 138.0$ –129.6, 76.2, 72.8, 67.9, 67.7, 60.3, 48.4, 26.0, 25.1 ppm.

**(*S*)-Benzyloxycarbonyl-2-((1*S*,2*R*)-1,2,4-trihydroxy-3-oxobutyl)pyrrolizidine (**6b**):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (167 mg, 52%). Major conformation  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 7.34$ –7.48 (m, 5H), 5.18–5.18 (m, 2H), 4.61 (A of AB system,  $^3J = 20.0$  Hz, 1H), 4.51 (B of AB system,  $^3J = 19.9$  Hz, 1H), 4.18 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.81 (dd,  $^3J = 1.6, 8.7$  Hz, 1H), 3.47 (m, 2H), 2.17–1.95 (m, 2H), 1.95 ppm (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 213.7, 158.6, 138.2$ –129.2, 77.8, 73.5, 68.4, 68.2, 60.4, 47.7, 27.9, 24.3 ppm. Minor conformation  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 250 K):  $\delta = 7.48$ –7.34 (m, 5H), 5.21–5.13 (m, 2H), 4.53 (A of AB system,

$^3J=19.8$  Hz, 1 H), 4.40 (B of AB system,  $J=19.7$  Hz, 1 H), 4.23 (dd,  $^3J=2.4$ , 3.3 Hz, 1 H), 4.15 (d,  $^3J=2.4$  Hz, 1 H), 4.03 (m, 1 H), 3.54–3.43 (m, 2 H), 2.35–2.01 (m, 2 H), 1.98–1.82 ppm (m, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=213.7$ , 158.6, 138.2–129.5, 78.7, 73.6, 68.4, 68.2, 61.4, 47.7, 27.5, 24.8 ppm.

**(R)-Benzyloxycarbonyl-2-((1R,2R)-1,2,4-trihydroxy-3-oxobutyl)-4-(R)-hydroxypyrrolidine (8a):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (204 mg, 60%). Major conformation  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=7.39$  (m, 5 H), 5.15–5.12 (m, 2 H), 4.59 (A of AB system,  $^3J=19.3$  Hz, 1 H), 4.45 (B of AB system,  $^3J=19.3$  Hz, 1 H), 4.33 (d,  $^3J=2.3$  Hz, 1 H), 4.30 (m, 1 H), 4.26 (brs, 1 H), 4.10 (d,  $^3J=8.1$  Hz, 1 H), 3.70 (m, 1 H), 3.33 (m, 1 H), 2.17 ppm (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=210.6$ , 155.4, 129.2–138.2, 75.4, 69.2, 68.3, 66.7, 66.5, 58.9, 55.2, 32.5 ppm. Minor conformation  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=7.39$  (m, 5 H), 5.22–5.17 (m, 2 H), 4.54 (A of AB system,  $^3J=19.3$ , 95.7 Hz, 1 H), 4.38 (B of AB system,  $^3J=19.4$ , 95.6 Hz, 1 H), 4.32 (m, 1 H), 4.33 (m, 1 H), 4.32 (m, 1 H), 4.22 (d,  $^3J=1.4$  Hz, 1 H), 4.05 (d,  $J=8.4$  Hz, 1 H), 3.70 (m, 1 H), 3.29 (m, 1 H), 2.26 ppm (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=210.7$ , 155.3, 129.5–138.2, 75.0, 70.4, 69.5, 66.7, 66.5, 58.5, 55.4, 33.1 ppm.

**(S)-Benzyloxycarbonyl-2-((1S,2R)-1,2,4-trihydroxy-3-oxobutyl)-4-(R)-hydroxypyrrolidine (8b):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (251 mg, 49%). Major conformation  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=7.39$  (m, 5 H), 5.17–5.17 (m, 2 H), 4.59 (A of AB system,  $^3J=19.7$ , 1 H), 4.51 (B of AB system,  $^3J=19.6$  Hz, 1 H), 4.39 (s, 1 H), 4.39 (m, 1 H), 4.23 (d,  $^3J=4.9$  Hz, 1 H), 4.19 (m, 1 H), 4.14 (m, 1 H), 3.63 (d,  $^3J=11.9$  Hz, 1 H), 3.42 (dd,  $^3J=11.6$ , 4.2 Hz, 1 H), 2.32 (m, 1 H), 2.03 ppm (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=213.7$ , 129.2–138.2, 158.6, 77.0, 71.8, 69.3, 67.0, 66.4, 59.1, 54.3, 34.8 ppm. Minor conformation  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=7.39$  (m, 5 H), 5.24–5.11 (m, 2 H), 4.48 (A of AB system,  $^3J=19.5$  Hz, 1 H), 4.34 (B of AB system,  $^3J=19.6$  Hz, 1 H), 4.46 (m, 1 H), 4.39 (brs, 1 H), 4.14 (m, 1 H), 4.11 (d,  $^3J=2.5$  Hz, 1 H), 3.62 (d,  $^3J=11.9$  Hz, 1 H), 3.48 (dd,  $^3J=11.9$ , 3.8 Hz, 1 H), 3.36 (m, 1 H), 2.47 (m, 1 H), 1.99 ppm (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=213.7$ , 158.6, 129.5–138.2, 77.3, 71.0, 69.3, 67.0, 66.0, 59.1, 54.9, 34.0 ppm.

**(S)-Benzyloxycarbonyl-2-((1S,2R)-1,2,4-trihydroxy-3-oxobutyl)-3-(S)-hydroxypyrrolidine (8c):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (149 mg, 44%).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=7.41$  (m, 5 H), 5.19 (m, 2 H), 4.62 (A of AB system,  $^3J=20.0$  Hz, 1 H), 4.52 (B of AB system,  $^3J=19.8$  Hz, 1 H), 4.48 (brs, 1 H), 4.17 (s, 1 H), 3.85 (d,  $^3J=9.5$  Hz, 1 H), 3.66 (d,  $^3J=9.3$  Hz, 1 H), 3.64 (m, 1 H), 3.52 (t,  $^3J=9.9$  Hz, 1 H), 2.18 (t,  $^3J=13.5$ , 6.6 Hz, 1 H), 1.94 ppm (dd,  $^3J=13.7$ , 7.0 Hz, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta=211.9$ , 157.7, 129.2–138.2, 76.2, 71.5, 72.0, 67.5, 67.3, 67.0, 44.9, 31.0 ppm.

**Removal of Cbz group and reductive amination:** The aldol adducts obtained (0.40–0.74 mmol) were dissolved in ethanol (5–10 mL), followed by the addition of plain water (20–45 mL). Pd/C (200 mg) was added. The reaction mixture was shaken under hydrogen (50 psi) overnight at room temperature. After removal of the catalyst by filtration through deactivated aluminium oxide, the pH of the filtrate was adjusted to pH 5.5 with formic acid (1 M), the solvent was removed under reduced pressure, and the product was lyophilised.

**Purification by ion exchange chromatography:** The polyhydroxylated pyrrolizidine derivatives **9a**, **9b** and **9e–9j** were separated by ion exchange chromatography with a FPLC system by a procedure described by us.<sup>[6,7]</sup> CM-Sephacrose CL-6B (Amersham Pharmacia) in  $\text{NH}_4^+$  form stationary phase was packed into a glass column (450 × 25 mm) to provide a final bed volume of 220 mL. The flow rate was 4 mL min<sup>-1</sup>. The CM-Sephacrose- $\text{NH}_4^+$  was washed initially with  $\text{H}_2\text{O}$ . An aqueous solution of the crude material at pH 7 was then loaded onto the column. Minor coloured impurities were washed away with  $\text{H}_2\text{O}$  (150 mL, 3 bed volumes). The retained compounds were eluted with aqueous  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0.01 M): compounds **9a** and **9b** (load 150 mg), **9a** (elution volume, 584 mL, 51 mg), **9b** (elution volume, 992 mL, 15 mg); compounds **9e–9g**: **9e** (elution volume 260 mL, 17 mg), **9f** (elution volume 376 mL, 3 mg), **9f** (elution volume 512 mL, 4 mg); compound **9c** (elution volume 376 mL, 49 mg); compounds **9g** and **9h**: **9g** (elution volume 416 mL, 10 mg), **9h** (elution

volume 48 mL, 26 mg). In each case, when necessary the operation was repeated until the whole of the crude sample was consumed. Pure fractions were pooled and lyophilised. Physical and NMR spectroscopy data are listed below.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra assignments are given in the Supporting Information.

**(1R,2S,3R,7aR)-1,2-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizidine (2-epihyacinthacine A2, 9a):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (51 mg, 49% from the aldol adduct).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-26.5$  ( $c=2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.23$  (t,  $^3J=3.6$  Hz, 1 H), 3.89 (dd,  $^3J=8.7$ , 3.9 Hz, 1 H), 3.83 (dd,  $^3J=11.0$ , 7.7 Hz, 1 H), 3.64 (dt,  $^3J=12.4$ , 6.2 Hz, 1 H), 3.37 (td,  $^3J=8.3$ , 3.6 Hz, 1 H), 2.93 (ddd,  $^3J=7.9$ , 6.2, 3.3 Hz, 1 H), 2.84 (m, 1 H), 2.70 (dt,  $^3J=11.0$ , 5.6 Hz, 1 H), 1.92 (m, 1 H), 1.83 (m, 1 H), 1.76 ppm (m, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=79.4$ , 75.9, 71.3, 66.2, 62.6, 56.7, 31.7, 26.9 ppm. ESI-TOF:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_3$  [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>: 174.1130; found 174.1131.

**(1R,2S,3S,7aR)-1,2-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizidine (9b):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (15 mg, 14% from the aldol adduct).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-45.3$  ( $c=1.5$  in  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.08$  (dd,  $^3J=4.9$ , 10.0 Hz, 1 H), 4.00 (dd,  $^3J=5.0$ , 1.8 Hz, 1 H), 3.91 (m, 2 H), 3.63 (td,  $^3J=8.5$ , 1.7 Hz, 1 H), 3.41 (ddd,  $^3J=10.0$ , 8.5, 4.5 Hz, 1 H), 3.13 (m, 1 H), 2.91 (td,  $^3J=10.7$ , 5.7 Hz, 1 H), 2.25 (m, 1 H), 1.99 (m, 1 H), 1.73 (m, 1 H), 1.58 ppm (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=77.3$ , 72.8, 72.7, 66.7, 61.3, 50.0, 31.6, 28.0 ppm. ESI-TOF:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_3$  [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>: 174.1130; found 174.1132.

**(1R,2S,3S,6R,7aR)-1,2,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizidine (9e):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (17 mg, 15% from the aldol adduct).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-39.6$  ( $c=1.3$  in  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.32$  (m, 1 H), 4.13 (dd,  $^3J=9.3$ , 5.4 Hz, 1 H), 4.01 (dd,  $^3J=5.3$ , 2.7 Hz, 1 H), 3.86 (m, 2 H), 3.41 (td,  $^3J=8.0$ , 2.5 Hz, 1 H), 3.18 (m, 1 H), 3.07 (A of AB system,  $^3J=9.6$ , 5.8 Hz, 1 H), 2.70 (B of AB system,  $^3J=9.4$ , 8.0 Hz, 1 H), 2.44 (m, 1 H), 1.58 ppm (dt,  $^3J=12.9$ , 7.8 Hz, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=77.9$ , 73.0, 72.8, 70.7, 67.2, 61.8, 55.2, 39.2 ppm; ESI-TOF:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_4$  [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>: 190.1079; found 190.1077.

**(1S,2S,3S,7S,7aS)-1,2,7-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizidine (9f):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (3 mg, 3% from the aldol adduct).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.57$  (s, 1 H), 4.39 (dd,  $^3J=8.7$ , 3.8 Hz, 1 H), 4.31 (t,  $^3J=3.3$  Hz, 1 H), 3.91 (A of AB system,  $^3J=11.6$ , 6.2 Hz, 2 H), 3.81 (B of AB system,  $^3J=11.7$ , 7.2 Hz, 1 H), 3.75 (m, 1 H), 3.57 (m, 1 H), 3.25 (A of AB system,  $^3J=12.5$ , 3.1 Hz, 1 H), 3.12 (B of AB system,  $^3J=12.1$  Hz, 1 H), 2.26 (m, 1 H), 2.04 ppm (d,  $^3J=13.6$  Hz, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=79.6$ , 75.3, 75.2, 73.3, 69.8, 62.9, 61.7, 38.5 ppm; ESI-TOF:  $m/z$  calcd for [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_4$ : 190.1079; found 190.1076.

**(1S,3R,6R,7aR)-1,6-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizidine (9g):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (4 mg, 4% from the aldol adduct).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-22.2$  ( $c=0.09$  in  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.37$  (m, 1 H), 4.30 (d,  $^3J=5.4$  Hz, 1 H), 3.85 (A of AB system,  $^3J=12.3$ , 5.2, 1 H), 3.80 (B of AB system,  $^3J=12.3$ , 8.1 Hz, 1 H), 3.71 (s, 1 H), 3.64 (m, 1 H), 3.20 (d,  $^3J=8.2$  Hz, 1 H), 2.79 (t,  $^3J=9.1$  Hz, 1 H), 2.52 (m, 1 H), 2.13 (td,  $^3J=13.1$ , 5.4, 1 H), 1.87 (m, 1 H), 1.59 ppm (dt,  $^3J=13.3$ , 8.1 Hz, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=77.7$ , 75.6, 71.9, 65.8, 61.7, 53.9, 38.6, 35.4 ppm; ESI-TOF:  $m/z$  calcd for [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_3$ : 174.1130; found 174.1126.

**(1S,2S,3S,6R,7aS)-1,2,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizidine (9h):** The title compound was prepared by the General Procedure described above (49 mg, 35% from the aldol adduct).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-21.0$  ( $c=1.4$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) [lit. (enantiomer)<sup>[22]</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}=+16.0$  ( $c=0.2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ); lit.<sup>[21]</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}=-5.8$  ( $c=0.18$  in  $\text{H}_2\text{O}$ )];  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=4.59$  (m, 1 H), 3.87 (t,  $^3J=7.3$  Hz, 1 H), 3.84 (t,  $^3J=8.5$  Hz, 1 H), 3.79 (A of AB system,  $^3J=11.7$ , 3.7 Hz, 1 H), 3.64 (B of AB system,  $J=11.8$ , 6.7 Hz, 1 H), 3.45 (q,  $^3J=7.3$ , 7.2 Hz, 1 H), 3.05 (A of AB system,  $^3J=11.7$ , 3.0 Hz, 1 H), 2.97 (B of AB system,  $^3J=11.8$ , 4.5 Hz, 1 H), 2.82 (m, 1 H), 2.09 (m, 1 H), 2.00 ppm (m, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=82.6$ , 79.9, 74.6, 72.7, 68.2, 64.4, 64.2, 40.1 ppm; ESI-TOF:  $m/z$  calcd for [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_4$ : 190.1079; found 190.1079.

**(1S,2S,3S,7S,7aS)-1,2,7-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizine (9i):**

The title compound was prepared by the General Procedure described above (26 mg, 35% from the aldol adduct).  $[\alpha]_D^{25} = +17.9$  ( $c = 1.7$  in  $H_2O$ ) (the specific rotation found for this compound or its enantiomer was  $[\alpha]_D^{25} = +11.6$  ( $c = 0.37$  in  $H_2O$ )<sup>[25]</sup>);  $^1H$  NMR (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 4.35$  (dt,  $^3J = 4.9, 2.6$  Hz, 1H), 3.78 (A of AB system,  $^3J = 11.8, 3.8$ , 1H), 3.76 (t,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H), 3.72 (t,  $^3J = 8.2$  Hz, 1H), 3.64 (B of AB system,  $^3J = 11.7, 6.2$  Hz, 1H), 3.10 (m, 1H), 3.04 (dd,  $^3J = 7.9, 1.9$  Hz, 1H), 2.90 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 1.78 ppm (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 80.3, 78.7, 77.6, 76.5, 70.8, 65.0, 54.4, 34.1$  ppm; ESI-TOF:  $m/z$  calcd for  $[M+H]^+$   $C_8H_{16}NO_4$ : 190.1079; found 190.1078.

**(1S,2S,3R,7S,7aS)-1,2,7-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)pyrrolizine (9j):**

The title compound was prepared by the General Procedure described above (10 mg, 14% from the aldol adduct).  $[\alpha]_D^{25} = +14.2$  ( $c = 0.8$  in  $H_2O$ ) (lit.<sup>[23]</sup>  $[\alpha]_D = +33.0$  ( $c = 0.1$  in  $H_2O$ ), hydrochloride salt);  $^1H$  NMR (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 4.35$  (m, 1H), 4.17 (m, 2H), 3.95 (m, 2H), 3.44 (brs, 1H), 3.23 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.80 ppm (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 81.3$  (2C), 80.6, 76.2, 67.6, 58.7, 48.9, 35.8. ESI-TOF:  $m/z$  calcd for  $C_8H_{16}NO_4$   $[M+H]^+$ : 190.1079; found 190.1077.

**Enzymatic inhibition assays:** Commercial glycosidase solutions were prepared with the appropriate buffer and incubated in 96-well plates at 37°C without (control) or with inhibitor (1.6 mM to 4.2 mM) for 3 min for  $\alpha$ -D-glucosidase,  $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -D-mannosidase,  $\alpha$ -L-rhamnosidase and  $\alpha$ -L-fucosidase and for 5 min for  $\beta$ -D-galactosidase. After addition of the corresponding substrate solution, incubations were continued for different time periods—10 min for  $\alpha$ -D-glucosidase, 3 min for  $\beta$ -D-glucosidase, 6 min for  $\alpha$ -D-mannosidase, 5 min for  $\alpha$ -L-rhamnosidase, 7 min for  $\alpha$ -L-fucosidase and 16 min for  $\beta$ -D-galactosidase—and were stopped by addition either of Tris solution (50  $\mu$ L, 1 M) or of glycine buffer (180  $\mu$ L, 100 mM, pH 10), depending on the enzymatic inhibition assay. The amount of *p*-nitrophenol formed was determined at 405 nm with the aid of a UV/VIS Spectramax Plus (Molecular Devices Corporation) spectrophotometer. The activity of  $\alpha$ -D-glucosidase from rice was determined with *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (1 mM) in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0). The activity of  $\beta$ -D-glucosidase was determined with *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (1 mM) in sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0). The activity of  $\beta$ -D-galactosidase was determined with *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (1 mM) in sodium phosphate buffer (100 mM,  $MgCl_2$  (0.1 mM), pH 7.2). The activity of  $\alpha$ -D-mannosidase was determined with *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside (1 mM) in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0). The activity of  $\alpha$ -L-rhamnosidase was determined with *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-rhamnopyranoside (1 mM) in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0). The activity of  $\alpha$ -L-fucosidase was determined with *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-fucopyranoside (0.15 mM) in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0). The commercial glycosidase solutions were prepared as follows:  $\alpha$ -D-glucosidase ( $(NH_4)_2SO_4$  suspension (100  $\mu$ L) in buffer (5 mL);  $\beta$ -D-glucosidase (0.1 mg mL<sup>-1</sup> buffer);  $\beta$ -D-galactosidase from *Aspergillus oryzae* (0.5 mg mL<sup>-1</sup> buffer);  $\alpha$ -L-rhamnosidase (naringinase, 0.3 mg mL<sup>-1</sup> buffer);  $\alpha$ -D-mannosidase ( $(NH_4)_2SO_4$  suspension (25  $\mu$ L) in buffer (10 mL);  $\beta$ -D-galactosidase from bovine liver (0.1 mg mL<sup>-1</sup> buffer);  $\alpha$ -L-fucosidase ( $(NH_4)_2SO_4$  suspension (33  $\mu$ L) in buffer (10 mL).

**Kinetics of inhibition:** The nature of the inhibition against enzymes and the  $K_i$  values were determined from Lineweaver–Burk plots.

**Rat intestinal disaccharidases**

**Animals:** Adult male Sprague–Dawley rats weighing 200 g ( $n = 2$ , Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were housed in cages ( $n = 2$ /cage) under controlled conditions of a 12 h light/dark cycle, with a temperature of  $22 \pm 3^\circ C$  and a relative humidity of 40–70%. Rats were fed on a standard diet (Panlab A04, Panlab, Barcelona, Spain) and water ad libitum. Handling and sacrificing of the animals were in full accordance with the European Community guidelines for the care and management of laboratory animals and the pertinent permission was obtained from the CSIC Subcommittee of Bioethical issues (permit number: CTQ2009–07359). Rats were fasted overnight and then anaesthetised by intramuscular injection of ketamine hydrochloride (0.1%, v/weight of rat, Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (0.01%, v/weight of rat, Rompun 2%, Química Farmacéutica S.A., Barcelona, Spain)

**Preparation of gut mucosal suspension:** The small intestine was removed, and carefully divided into duodenum, jejunum and ileum. The jejunum was washed with ice-cold isotonic saline and opened lengthwise, and the mucosa was scraped off with a microscope slide. The jejunum mucosa was stored at  $-80^\circ C$ . The samples were diluted with ice-cold isotonic saline (50 mg mucosa mL<sup>-1</sup>) and homogenised with a 2 mL glass homogeniser.

**Assay of disaccharidase activity:** Disaccharidase, that is, sucrase, lactase, maltase and trehalase, activities in the homogenised jejunum mucosa were determined by the method of Dalqvist.<sup>[45]</sup> Enzyme activity ( $\mu$ mol of substrate hydrolysed per hour) were normalised to protein content as evaluated by Bradford's method.<sup>[46]</sup> The disaccharide substrates, sucrose, lactose, maltose and trehalose, were purchased at the highest purity available (Sigma Chemical Co.). Substrates and inhibitors were prepared in distilled water. The concentrations used in the assay were 0.02 M for the disaccharides and a range from 2 mM down for the inhibitors. The homogenised mucosa was diluted four times for the sucrose and trehalase assays, once for the lactase assay and 25 times for the maltase activity and protein determination assays. Inhibitors and suitably diluted homogenised mucosa were preincubated for 30 min at 37°C. The reaction was then carried out by the addition of the substrate in phosphate buffer (pH 6.8). Substrate, inhibitor and homogenised mucosa were incubated together for 30 min at 37°C and under agitation (250 rpm). The reaction was terminated by the addition of Tris-glucose oxidase-peroxidase reagent (Tris (0.5 M), 4-hydroxybenzoic acid (10 mM), 4-aminoantipyrine (0.4 mM), glucose oxidase (1480 U IL<sup>-1</sup>), peroxidase (250 U IL<sup>-1</sup>), pH 7.3). Glucose is transformed into gluconic acid and hydrogen peroxide by glucose oxidase. Peroxidase catalyses the combination of hydrogen peroxide with 4-aminoantipyrine, generating a stable and coloured compound. After a further incubation of 2 h this product was measured spectrophotometrically at 505 nm.

**Computational methods:** Conformational searches on aldol adduct derivatives were conducted as previously described<sup>[4,6,47]</sup> with use of the program MOE (v. 2008.10, Chemical Computing Group, Montreal). The implemented MMFF94x force field, a modified version of the MMFF94s force field,<sup>[48]</sup> was used for energy calculations. Electrostatic interactions were approximated by Generalised Born/Volume Integral (GB/VI) methodology<sup>[49]</sup> without cutoffs. A systematic conformational search in which every non-terminal single bond from a starting initially optimised structure was rotated in 60–120° steps was run. The conformations generated for each compound were then minimised and ranked by energy. To confirm the natures of the lowest-energy conformers determined, a subsequent stochastic conformational search in which the conformational space of the molecules was explored by random rotation of bonds and simultaneous Cartesian perturbation was run. The conformations thus generated were minimised and checked to determine whether or not they were duplicates, within a RMS tolerance (0.1 Å), of previously generated conformations. The process was finished when the number of failures to find new conformations exceeded a large enough number (1000) of attempts.

Protein–substrate simulations were conducted with the Schrödinger Suite 2009 package (Schrödinger, LLC, New York) through its graphical interphase Maestro (Maestro, version 9.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009). The program Impact (Impact, version 5.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005) with its default OPLS 2005 force field, a modified version of the OPLS-AA force field,<sup>[50]</sup> and GB/SA water solvation conditions<sup>[51]</sup> were used for all energy calculations. Coordinates of *E. coli* fucose-1-phosphate aldolase in complexation with phosphoglycolohydroamate (PGH) and of the F131A mutant<sup>[9,14]</sup> were obtained from the Protein Data Bank<sup>[52]</sup> at Brookhaven National Laboratory (entries 4FUA and 1DZW). The C-terminal tail (residues 206–215), which is absent in these structures, was modelled as previously described<sup>[4]</sup> and included in all subsequent simulations. The structure of FucA F206 A was generated by mutating the wild type protein in silico. Prior to any simulation, protein structures were prepared with the aid of the Protein Preparation Wizard included in Maestro to remove solvent molecules and ions, with addition of hydrogens, setting of protonation states and minimisation of the energy through the use of the OPLS force field. The structure of fu-

culose-1-phosphate bound into the active centre of the FucA wild type was modelled on the basis of the coordinates of PGH and a model of bound l-lactaldehyde.<sup>[15]</sup> Aldol adducts derived from N-Cbz-prolinal were modelled by starting from the coordinates of PGH and by manual placing of the Cbz phenyl group in the cavities generated by the F131A or F206A mutations. The structures of the protein–substrate complexes were minimised by first applying constraints to the protein (force constant = 100.00 kcal Å<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>) to avoid large changes in its structure and afterwards allowing free movement of the whole system either until a gradient < 0.01 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> was reached or for a maximum of 2000 cycles. The structures were then subjected to 200 ps of molecular dynamics (1 fs step) under the NVT ensemble at 298.16 K, with use of implicit solvent conditions (GBSA) and a force constant of 100 kcal Å<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup> to restrain the protein residues more than 15 Å away from the ligand, and were finally minimised again without constraints.

### Acknowledgements

This work was supported by the Spanish MICINN (CTQ2006-01345, CTQ2009-08328 and CTQ2009-07359), La Marató de TV3 foundation (Ref: 050931), the Generalitat de Catalunya (2005-SGR-00698), and ESF project COST CM0701. X. Garrabou acknowledges the CSIC for the I3P predoctoral scholarship and L. Gomez the Generalitat de Catalunya and Bioglane S.L.N.E for the predoctoral contract.

- [1] a) R. Mahrwald, *Modern Aldol Reactions, Vol. 1: Enolates, Organocatalysis, Biocatalysis and Natural Product Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004, p. 335; b) R. Mahrwald, *Modern Aldol Reactions, Vol. 2: Metal Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004, p. 335; c) S. M. Dean, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1308–1320; d) W.-D. Fessner in *Biocatalytic C–C Bond Formation in Asymmetric Synthesis* (Eds.: D. Enders, K.-E. Jaeger), Wiley-VCH, Weinheim, 2007, pp. 351–375.
- [2] W. D. Fessner, G. Sinerius, *Angew. Chem.* 1994, 106, 217–220; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 209–212.
- [3] W.-D. Fessner, C. Walter, *Top. Curr. Chem.* 1997, 186–193, 97–194.
- [4] L. Espelt, J. Bujons, T. Parella, J. Calveras, J. Joglar, A. Delgado, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* 2005, 11, 1392–1401.
- [5] L. Espelt, T. Parella, J. Bujons, C. Solans, J. Joglar, A. Delgado, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* 2003, 9, 4887–4899.
- [6] J. Calveras, M. Egado-Gabás, L. Gómez, J. Casas, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 7310–7328.
- [7] J. Calveras, J. Casas, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1661–1666.
- [8] A. Bolt, A. Berry, A. Nelson, *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 474, 318–330.
- [9] A. C. Joerger, C. Gosse, W.-D. Fessner, G. E. Schulz, *Biochemistry* 2000, 39, 6033–6041.
- [10] At 4°C the rate of DHAP degradation was minimised and sometimes the conversions to aldol adducts were highly enhanced; see reference [12].
- [11] In all experiments conducted thus far the amount of biocatalyst employed in synthetic experiments with N-Cbz-amino aldehydes was adjusted to the amount (i.e., mg) of FucA wild type used rather than to the activities on Fuc1P, due to the disparate values of activity observed with this substrate.
- [12] T. Suau, G. Alvaro, M. D. Benaiges, J. Lopez-Santín, *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 93, 48–55.
- [13] We were not able to separate the *antisyn* diastereomers of the aldol adduct (5S)-4a on the preparative HPLC. Therefore this compound was assayed as a diastereomeric mixture 1:1 *antisyn*.
- [14] M. K. Dreyer, G. E. Schulz, *Acta Crystallogr. Sect. D* 1996, 52, 1082–1091.
- [15] A. C. Joerger, C. Mueller-Dieckmann, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* 2000, 303, 531–543.
- [16] a) J. R. Liddell, *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18, 441–447; b) L. Rambaud, P. Compain, O. R. Martin, *Tetrahedron: Asymmetry* 2001, 12, 1807–1809; c) I. Izquierdo, M. T. Plaza, F. Franco, *Tetrahedron: Asymmetry* 2002, 13, 1581–1585; d) I. Izquierdo, M. T. Plaza, F. Franco, *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, 14, 3933–3935; e) I. Izquierdo, M. T. Plaza, R. Robles, C. Rodriguez, A. Ramirez, A. J. Mota, *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 1269–2174; f) I. Izquierdo, M. T. Plaza, J. A. Tamayo, *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15, 3635–3642; g) I. Izquierdo, M. T. Plaza, J. A. Tamayo, D. L. Re, F. Sánchez-Cantalejo, *Synthesis* 2008, 1373–1378; h) I. Izquierdo, M. T. Plaza, V. Yanez, *Tetrahedron* 2007, 63, 1440–1447; i) F. Cardona, E. Faggi, F. Liguori, M. Cacciarini, A. Goti, *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 2315–2318; j) T. J. Donohoe, M. D. Cheeseman, T. J. C. O'Riordan, J. A. Kershaw, *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 3896–3898; k) L. Chabaud, Y. Landais, P. Renaud, *Org. Lett.* 2005, 7, 2587–2590; l) J. A. Tamayo, F. Franco, D. Lo Re, F. Sanchez-Cantalejo, *J. Org. Chem.* 2009, 74, 5679–5682.
- [17] I. Izquierdo, M. T. Plaza, F. Franco, *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15, 1465–1469.
- [18] I. Izquierdo, M. T. Plaza, R. Robles, F. Franco, *Tetrahedron: Asymmetry* 2001, 12, 2481–2487.
- [19] I. Izquierdo, M. T. Plaza, J. A. Tamayo, F. Sanchez-Cantalejo, *Tetrahedron: Asymmetry* 2007, 18, 2211–2217.
- [20] I. Izquierdo, M. T. Plaza, J. A. Tamayo, V. Yanez, D. Lo Re, F. Sanchez-Cantalejo, *Tetrahedron* 2008, 64, 4613–4618.
- [21] D. Koch, S. Maechling, S. Blechert, *Tetrahedron* 2007, 63, 7112–7119.
- [22] J.-B. Behr, A. Erard, G. Guillerme, *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 1256–1262.
- [23] D. Chikkanna, O. V. Singh, S. B. Kong, H. Han, *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 8865–8868.
- [24] a) R. J. Nash, L. E. Fellows, J. V. Dring, G. W. J. Fleet, A. E. Derome, T. A. Hamor, A. M. Scofield, D. J. Watkin, *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 2487–2490; b) A. Kato, I. Adachi, M. Miyauchi, K. Ikeda, T. Komae, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash, M. R. Wormald, *Carbohydr. Res.* 1999, 316, 95–103.
- [25] R. J. Nash, L. E. Fellows, J. V. Dring, G. W. J. Fleet, A. Girdhar, N. G. Ramsden, J. M. Peach, M. P. Hegarty, A. M. Scofield, *Phytochemistry* 1990, 29, 111–114.
- [26] N. Asano, H. Kuroi, K. Ikeda, H. Kizu, Y. Kameda, A. Kato, I. Adachi, A. A. Watson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry* 2000, 11, 1–8.
- [27] T. Yamashita, K. Yasuda, H. Kizu, Y. Kameda, A. A. Watson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, N. Asano, *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1875–1881.
- [28] a) *From Synthesis Iminosugars to Therapeutic Applications* (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley, New York, 2007, p. 467; c) J. Churrua, L. Vigil, E. Luna, J. Ruiz-Galiana, M. Varela, *Diabete Metab.* 2008, 1, 3–11; d) A. Esteghamati, O. Khalilzadeh, M. Anvari, M. S. Ahadi, M. Abbasi, A. Rashidi, *Arch. Med. Res.* 2008, 39, 803–808; e) K. Kim, S. H. Yun, B. Y. Choi, M. K. Kim, *Br. J. Nutr.* 2008, 100, 576–584; f) L. R. Reynolds, *Nutraceuticals, Glycemic Health Type 2 Diabetes*, Wiley-Blackwell, New York, 2008, pp. 65–86.
- [29] O. Affolter, A. Baro, W. Frey, S. Laschat, *Tetrahedron* 2009, 65, 6626–6634.
- [30] a) A. Kato, E. Kano, I. Adachi, R. J. Molyneux, A. A. Watson, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, M. R. Wormald, H. Kizu, K. Ikeda, N. Asano, *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, 14, 325–331; b) T. J. Donohoe, R. E. Thomas, M. D. Cheeseman, C. L. Rigby, G. Bhalay, I. D. Linney, *Org. Lett.* 2008, 10, 3615–3618.
- [31] S. Desvergnès, S. Py, Y. Vallee, *J. Org. Chem.* 2005, 70, 1459–1462.
- [32] N. Asano, K. Ikeda, L. Yu, A. Kato, K. Takebayashi, I. Adachi, I. Kato, H. Ouchi, H. Takahata, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry* 2005, 16, 223–229.
- [33] A. E. Stutz, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, p. 397.
- [34] A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 3808–3816.
- [35] J. A. Castillo, J. Calveras, J. Casas, M. Mitjans, M. P. Vinardell, T. Parella, T. Inoue, G. A. Sprenger, J. Joglar, P. Clapés, *Org. Lett.* 2006, 8, 6067–6070.

- [36] *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists* (Ed.: R. A. Copeland), Wiley-Interscience, New York, **2005**, p. 296.
- [37] S.-H. Jung, J.-H. Jeong, P. Miller, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7182–7184.
- [38] W. D. Fessner, A. Schneider, O. Eyrisch, G. Sinerius, J. Badia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1183–1192.
- [39] L. Vida, PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona (Spain), **2006**.
- [40] Z. Q. Zhang, A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 225–233.
- [41] L. Vidal, O. Durany, T. Suau, P. Ferrer, M. D. Benaiges, G. Caminal, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**, *78*, 1171–1179.
- [42] O. Durany, G. Caminal, C. de Mas, J. Lopez-Santin, *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1677–1684.
- [43] L. Espelt, P. Clapés, J. Esquena, A. Manich, C. Solans, *Langmuir* **2003**, *19*, 1337–1346.
- [44] J. R. Luly, J. F. Dellaria, J. J. Plattner, J. L. Soderquist, N. Yi, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1487–1492.
- [45] A. Dahlqvist, *Anal. Biochem.* **1964**, *7*, 18–25.
- [46] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [47] J. Calveras, J. Bujons, T. Parella, R. Crehuet, L. Espelt, J. Joglar, P. Clapés, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2648–2656.
- [48] a) T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 730–748; b) T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720–729.
- [49] P. Labute, *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1693–1698.
- [50] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. TiradoRives, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
- [51] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127–6129.
- [52] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.

Received: March 22, 2010  
Published online: July 26, 2010





