

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503432

(P2005-503432A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07C 215/10</b>	C O 7 C 215/10	4 C O 8 6
<b>A61K 31/137</b>	A 6 1 K 31/137	4 C 2 0 6
<b>A61K 31/167</b>	A 6 1 K 31/167	4 H O 0 6
<b>A61K 31/685</b>	A 6 1 K 31/685	4 H O 5 0
<b>A61P 3/06</b>	A 6 1 P 3/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-530649 (P2003-530649)	(71) 出願人	301027100
(86) (22) 出願日	平成13年9月26日 (2001.9.26)		イッサム リサーチ ディベロップメント
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月26日 (2004.3.26)		カンパニー オブ ザ ヘブリュー ユ
(86) 国際出願番号	PCT/IL2001/000909		ニバーシティー オブ エルサレム
(87) 国際公開番号	WO2003/027058		イスラエル, 91390 エルサレム,
(87) 国際公開日	平成15年4月3日 (2003.4.3)		ギヴァット ラム, ザ ヘブリュー ユ
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(74) 代理人	100090251
			弁理士 森田 憲一
		(72) 発明者	ダガン アリエイ
			イスラエル国, エルサレム, 92341,
			ハーラップ ストリート 13
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スフィンゴリピド

## (57) 【要約】

本発明は、定義した意味を有する一般式 (I) で表される化合物、及び前記化合物を含有する医薬組成物に関する。式 (I) で表される化合物は、種々のリピド関連酵素の阻害剤である。前記化合物は、スフィンゴリピドの蓄積を低減するのに用いることができ、そして従って脂質蓄積症の治療に用いることができる。式 (I) で表される化合物は、癌性疾患の治療に対して及び野生型及び薬剤耐性癌細胞の殺傷に対しても用いることができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

一般式(I)：

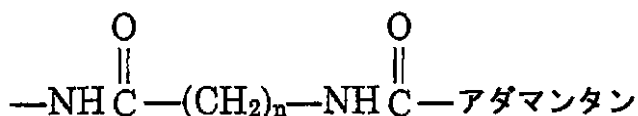
## 【化1】



10

[式中、Rは、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和のアルキル鎖又はアルケニル鎖、 $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2$ ) $_m$   $\text{CH}=\text{CH}$ -基、 $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2$ ) $_m$  基 (mは、0又は1~20の整数である)、場合によりニトロ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アシルアミノ基、 $-\text{NHC}(\text{S})\text{NH}$ -アルキル基、スルホニルアミド-アルキル基、式

## 【化2】



20

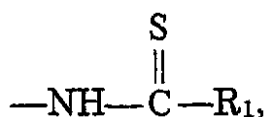
(nは、1~20の整数である)で表される基、又は $-\text{NH}$ -アダマンタン基により置換されているフェニル基、 $-\text{NH}-t\text{-BOC}$ 基、 $-\text{NH}-\text{FMOC}$ 基、又は $\text{NH}-\text{CBZ}$ 基であり；

Xは、水素原子又は $-\text{OR}_4$ 基 ( $\text{R}_4$ は、水素原子、又は、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル鎖又はアルケニル鎖である)であり；

Yは、 $-\text{NH}_2$ 基、 $\text{NHR}^x$ 基 ( $\text{R}^x$ は、水素原子、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状のアルキル鎖又はアルケニル鎖である)、ア

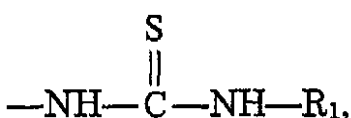
30

## 【化3】



で表される基、式

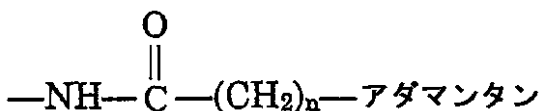
## 【化4】



40

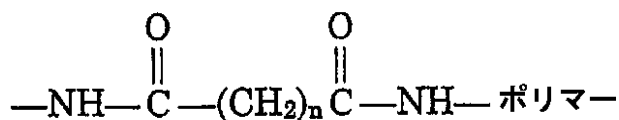
で表される基、 $-\text{NH}(\text{SO}_2)\text{R}_1$ 基、 $-\text{NR}_1\text{R}_2$ 基、 $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ 基 ( $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 及び $\text{R}_3$ は、同一であるか又は異なっていることがあり、それぞれ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルケニル基である)、式

## 【化5】



50

(nは、0又は1～20の整数である)で表される基、-NH-アダマンタン基、式【化6】



(式中、「ポリマー」は、 $10^3$ ダルトンから $10^6$ ダルトンの分子量を有する天然又は合成の生体適合性ポリマーである)で表される基であり；

Zは、水素原子、-OH基、モノ-又はジサッカライド、モノサッカライドスルフェート及びコリンホスフェートであるが；

但し、Rが、アルキル基、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}$ -基、フェニル基又はニトロフェニル基である場合に、Yは、 $\text{NH}_2$ 基であることができず；そして $\text{R}_1$ がメチル基であり、Rが $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}$ -基であり、そしてZが-OH基である場合に、Yは、 $-\text{NR}_1\text{R}_2$ 基、 $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ 基又は $\text{NHR}_4$ 基( $\text{R}_4$ は、オクチル基である)であることができない]

で表される化合物、及びその異性体及び薬剤学的に許容することができるその塩。

【請求項2】

Yが $-\text{NH}_2$ 基又は $\text{NHR}^x$ 基である、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

Rがニトロフェニル基である、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項4】

Rがアミノフェニル基又はアルキルアミノフェニル基である、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項5】

Zが-OH基である、請求項1～4のいずれか一項に記載の化合物。

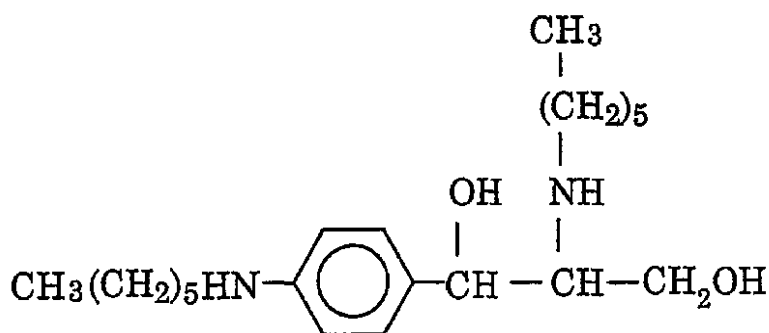
【請求項6】

前記アミノ保護基がtBOC基、FMOC基及びCBZ基から選ばれる、請求項1～5のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項7】

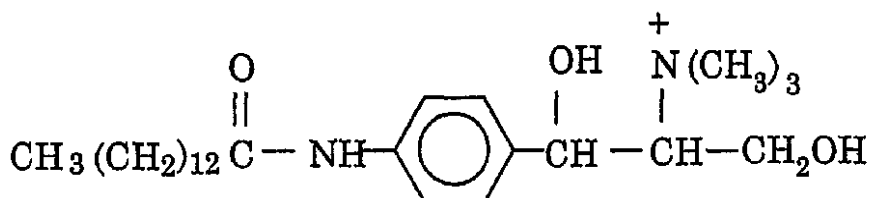
式

【化7】



(AD-2665と称する)、式

【化8】



(AD-2687と称する)、式

10

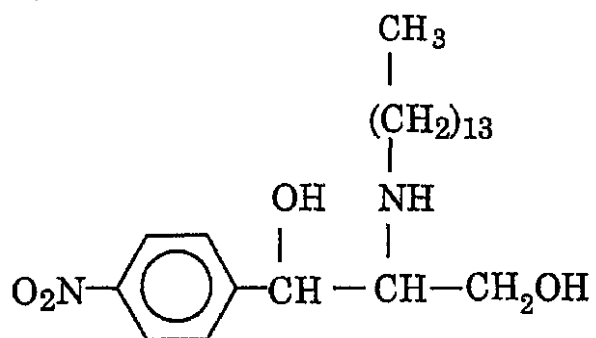
20

30

40

50

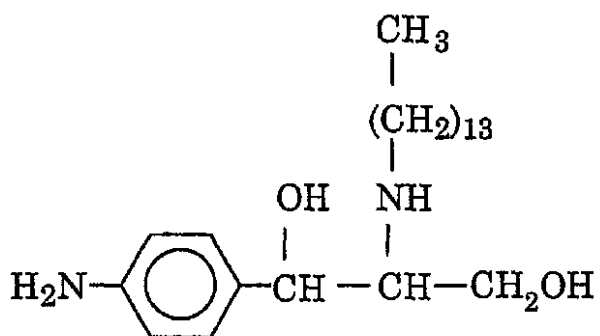
【化 9】



10

(AD-2646 と称する)、式

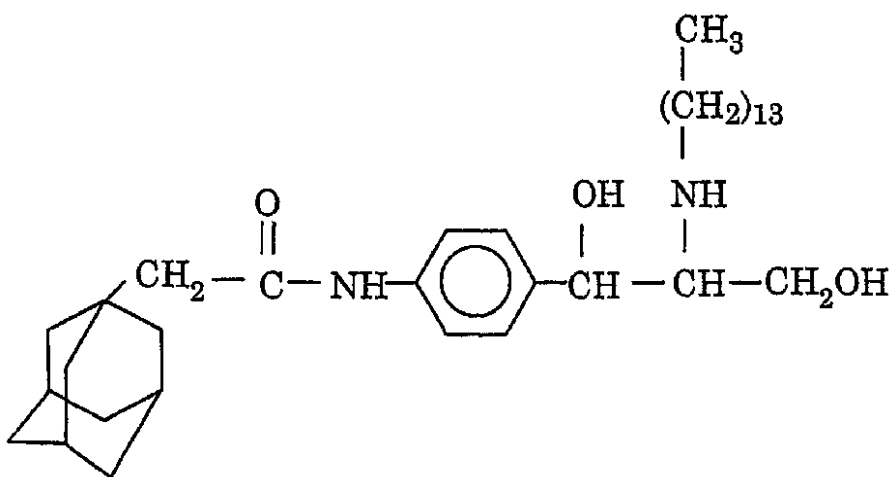
【化 10】



20

(AD-2672 と称する)、式

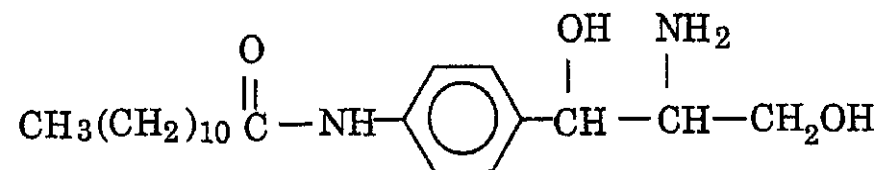
【化 11】



30

(AD-2754 と称する)、式

【化 12】



40

(AD-2673 と称する)、式



## 【請求項 20】

前記脂質蓄積症が、ゴーシェ病、テイ - サックス病、ニーマン - ピック病、クラッペ病、異染性ロイコジストロフィー、ファブリー病及びファーバー病から選ばれる、請求項 19 に記載の治療方法。

## 【請求項 21】

癌性疾病の治療が必要な患者において前記癌性疾病を治療する方法であって、式中の置換基が請求項 1 に定義した意味を有する式 ( I ) で表される化合物又は前記化合物を含む医薬組成物の治療上の有効量を前記患者に投与することを含む前記治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の背景】

10

## 【0001】

スフィンゴリピド ( S L ) は、塩基性基として、セラミド、すなわち、N - アシルスフィンゴシンを有する一群のリピドからなる。S L には、2つの主要なタイプ、すなわち、ホスホ S L 及びグリコ S L が存在する。前者は、一つの主要成分、すなわち、スフィンゴミエリン (セラミド - ホスホリルコリン) を有しているのに対して、グリコスフィンゴリピドは、広い群を含んでいる。それらは、モノヘキソシルセラミド (セラミド - グルコース及びセラミド - ガラクトース) から、オリゴヘキソシルセラミド (すなわち、ジ - 及びトリヘキソシルセラミド) だけではなく、シアル酸も結合しているオリゴヘキソシルセラミドから構成される多数のガングリオシドに及んでいる。S L は、実際には、全ての細胞型及び組織中に存在しており、そしてとりわけ神経系に豊富に存在している。S L の相対的組成は、年齢に伴って変化することがあり；このようにして、レクチンに対するスフィンゴミエリンの比が年齢に伴って増加することが示されている。

20

## 【0002】

グリコスフィンゴリピドは、高い結合能力を有しており、そして多数の外部因子、例えば、レクチン、毒素、ホルモン及びウイルスに対する特異的なレセプターとして作用する。例示すると、ビブリオ・コレラエ ( *Vibrio cholerae* ) 毒素は G M 1 - ガングリオシドに結合し、そしてシゲラ・ダイセンテリアエ ( *Shigella dysenteriae* ) ペロ毒素はグロボトリアオシル ( *globotriaosyl* ) セラミドに結合する。

## 【0003】

30

過去 10 年の間に、シグナル伝達プロセスにおいてスフィンゴリピド群のメンバーが関与しているという発見により、スフィンゴリピドに関する研究は著しく増加してきている [最近では、Levadeら, *Biochim. Biophys. Acta*, 1438, 1 - 17 (1999); Mathiasら, *Biochem. J.* 335, 465 - 480 (1998); Perryら, *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 233 - 243 (1998); Riboniら, *Prog. Lipid Res.* 36, 153 - 195 (1997) に検討されている]。最も研究された化合物は、キーとなるプロセス、例えば、成長抑制、分化及びアポトーシスの調節に役割を果たすことが示されたセラミドである [Hannunら, *Biochim. Biophys. Acta*, 1154, 223 - 236; Hannunら, *Trends Cell Biol.* 10, 73 - 80 (2001); Higginsら, *Trends Biochem. Sci.* 17, 18 - 21 (1992)]。S P M は、一般には、セラミドの一次代謝供給源と考えられている。なお、細胞中の特定の場所 (例えば、膜) におけるセラミドの生成は、細胞のシグナル伝達 ( *signaling* ) プロセスの媒介に対して細胞を適切にする。セラミドの増加したデノボ合成もシグナル伝達に対する潜在的な供給源として記載されてきた [Boseら, *Cell*, 82, 405 - 414, (1995)]。従って、主要な努力は、大部分が中性の膜結合酵素であるスフィンゴミエリナーゼによる細胞内セラミドの生成を調節することに向けられてきたが、酸性の酵素も関与していた。それにもかかわらず、生合成メカニズムの調節、例えば、セラミドの S P M 又はグリコリピドへの変換の低減、及び、平行して、セラミダーゼによるセラミドの加水分解の低減も細胞中のセラミドの

40

50

濃度を高めるであろうことが強調されるべきである。

【0004】

シグナル伝達におけるスフィンゴリピドの役割 [L. Riboniら, *Prog. Lipid Res.* 36, 153-195 (1997) 及び A. Gomez-Munoz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1391, 32-109 (1998) に検討されている] が広く研究されてきており、そして「スフィンゴミエリン・サイクル」を介して作用することが提唱された。この仮説によれば、特定の細胞外リガンドをそのレセプターに結合することは、血漿の膜結合スフィンゴミエリナーゼを活性化し、リガンドの細胞内効果のメディエーターとして働くセラミドを生成する。多数の刊行物が、アポトーシスによる細胞殺傷 (kill) におけるセラミドの役割並びに重要な細胞事象、例えば、増殖、分化及びストレス状態に対する反応へのセラミドの効果を記載し強調している。短鎖の、細胞透過性 (例えば、C<sub>2</sub> 又は C<sub>6</sub>) セラミドが細胞殺傷に至る生物学的応答を引き起こすという報告もとりわけ興味深い。セラミドの前駆体、すなわち、スフィンゴシンを用いた他の研究は、細胞成長及び生存性 (viability) へのその効果を示した。さらに、スフィンゴシンは、プロテインキナーゼCを阻害しそしてカルシウムイオンの細胞内濃度を増加させることが示された。スフィンゴシンのリン酸化型、すなわち、スフィンゴシン-1-ホスフェートはホスホリパーゼDの潜在的な活性化物質であることが示された。そして、ジ-又はトリ-メチル化スフィンゴシンは癌細胞の増殖を阻害することが示された [Endoら, *Cancer Research*, 51, 1613-1618, (1981)]。

10

20

【0005】

癌におけるセラミド及びスフィンゴリピド代謝の関与が研究されてきた。種々の化学療法剤の投与により誘導されるアポトーシスはセラミドにより媒介されることが証明された [Strumら, *J. Biol. Chem.* 269, 15493-15497 (1994) ; Maurerら, *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1138-1146 (1999) ; Suzukiら, *Exp. Cell Res.* 233, 41-47 (1997)]。アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン) は、セラミド蓄積を誘導しそれが引き続いて癌細胞の死に導くことが示された [Boseら, *Cell*, 82, 405-414 (1995)]。研究の第二の方向は、薬物耐性癌細胞がそのスフィンゴリピド代謝において薬物感受性癌細胞とは異なっていることを示した。このことについては、Cabotらの研究 [Lavieら, *J. Biol. Chem.* 271, 19530-19536 (1996)] がとりわけ興味深く、Cabotらは、セラミドの直接的代謝産物であるグルコシルセラミドが、P-糖タンパク質ポンプ (Pgp) を過剰発現する数種の薬物耐性細胞において増加することを証明した。このグリコリピドを合成する酵素、すなわち、グルコシルセラミドシンターゼ (GCS) の、レトロウイルス発現系による過剰発現は、ドキソルビシン感受性細胞の耐性細胞への変換を生じた [Liuら, *J. Biol. Chem.* 274, 1140-1146 (1999)]。逆に、アンチセンス法によるGCS発現の抑制は、ドキソルビシンに対する感受性を高めた。Cabotらも、薬物耐性モジュレーター、例えば、タモキシフェン、ベラパミル及びシクロスポリンアナログ、PSC833が、GCSの抑制によりそれらの効果を発揮し [Cabotら, *FEBS Letters*, 394, 129-131 (1996), *FEBS Letters*, 431, 185-199 (1998) ; Lavieら, *J. Biol. Chem.* 272, 1682-1687 (1999) ; Lucciら, *Cancer*, 86, 300-311 (1999)]、細胞セラミドの増加をもたらすことを提唱した。Nicholsonら [British *J. Cancer*, 81, 423-430 (1989)] は、GCSの阻害剤である、1-フェニル-2-デカノイル-アミノ-3-モルホリノ-1-プロパノールが、多薬剤 (multidrug) 耐性細胞を、それらの薬物感受性相当物 (counterpart) に比して、優先的に殺傷することを示した。

30

40

前記研究を総合すると、MDR細胞においてセラミドをグルコシルセラミドに変換することにより細胞のセラミド含有量を低減させる代謝メカニズムは、一連の化学療法剤に対し

50

て細胞を耐性にすることが示唆される。

【0006】

抗癌剤であるヘキサデシルホスホコリン [HePC, Wiederら, J. Biol. Chem. 273, 11025-11031, (1998)] に対して提唱されたメカニズムは、とりわけ興味深い。これは、抗増殖性 (antiproliferative) 薬剤であり、現在、乳癌の異質の転移の治療に対して用いられており、そして濃度 25 μM でアポトーシスを誘導することが示されている。前記刊行物は、ホスファチジルコリンの生合成を阻害する HePC がスフィンゴミエリンの生合成を低減させそしてその結果としてセラミドの量を増加させることにより二次的効果を発揮し、そして HePC のプロアポトーシス特性の原因となるのはおそらく後者であるという支持を提供している。そして、  
10 実際、前記著者らは、PC 誘導アポトーシスがセラミド合成の阻害剤である、フモニシン (Fumonisin) B1 により遮断されることを示した。そして、短鎖の、膜透過性セラミドが HePC のアポトーシス効果をさらに増大させた。

【0007】

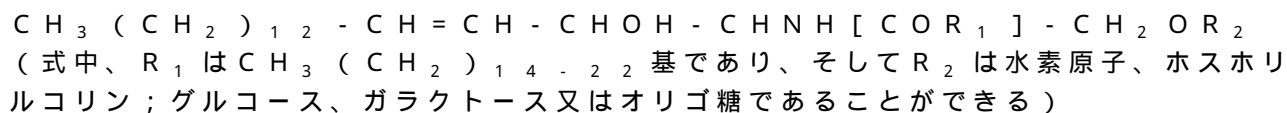
スフィンゴリピドの代謝の別の主要な観点は、遺伝性の脂質蓄積症、例えば、ゴーシェ病 (α-グルコシダーゼ)、テイ-サックス病 (N-アセチルヘキササミニダーゼ)；  
20 ニーマン-ピック病 (酸性スフィンゴミエリナーゼ)、クラッペ病 (ガラクトシダーゼ)、異染性ロイコジストロフィー (アリアルスルファターゼ A)、ファブリー病 (セラミダーゼ) 及びファーバー病 (ガラクトシダーゼ) を罹病した患者の器官におけるスフィンゴリピドの蓄積である。これらの疾病のそれぞれは、リソソームのスフィンゴリピド加水分解酵素 (括弧中に表示) をコードする遺伝子における突然変異によるものである。その結果として、それぞれの加水分解酵素の活性は相当に低減され、患者の器官におけるそれぞれのスフィンゴリピドの蓄積を生じる。

【0008】

代謝障害になると、相当するスフィンゴリピドの代謝的欠損及び蓄積が生涯の現象となる。3つの治療形態が用いられ又は考えられ続けている。1. 関与する酵素を精製して、患者の亡くなるまでの間ずっと患者に注入する、酵素代替治療；このアプローチは、現在、ヒト胎盤から精製した α-グルコシダーゼ又は、それに代えて、前記酵素の組換え体型を患者に注入することにより、ゴーシェ病の患者に適用されている。2. 正常な酵素をコードする遺伝子をクローニングして患者に投与する遺伝子治療；これは、現在、計画の段階  
30 である。3. 疾病において蓄積するスフィンゴリピドの生合成の阻害剤の患者への注入であって、その目的は、患者の器官に蓄積するスフィンゴリピドの量を低減することにある。このアプローチは、現在、いくつかの医療センターにおいてゴーシェ病の患者に対して、臨床試験段階にある [Coxら, The Lancet, 355, 1481-1485, (2000)]。

【0009】

スフィンゴリピドは、下記一般構造式：



を有している。

スフィンゴリピドの前駆体である、式中の R<sub>2</sub> が水素原子であるセラミドは、細胞分化、アポトーシス及び成長抑制に影響を及ぼすバイオエフェクター分子である。

【0010】

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub> - CH = CH 残基に代えてフェニル基を有している、セラミドの数の非天然アナログが合成されてきた。

例えば、化合物 PDMP：

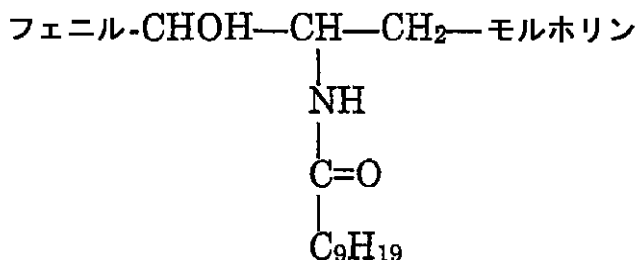
【化1】

10

20

30

40



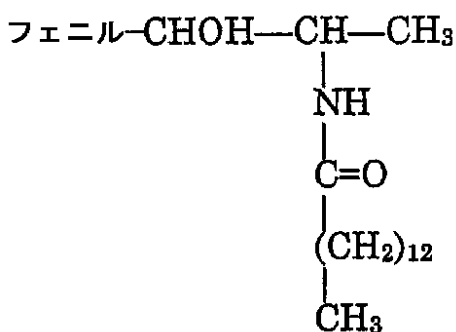
は、グルコスフィンゴリピドの阻害剤であることが示された [ V u n n a m & R a d i n Chem. Phys. Lipid, 26, 265 (1980) ]。

10

【0011】

アシルフェニルアミノアルコール ( M A P P ) :

【化2】



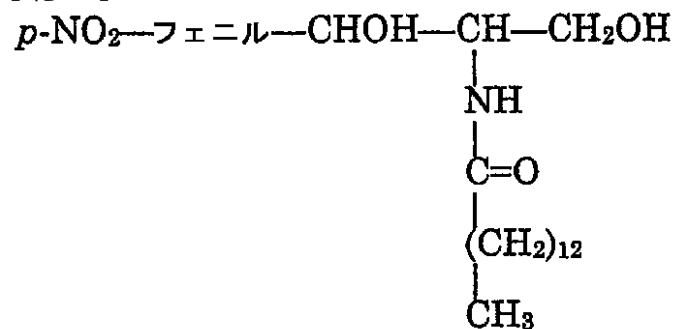
20

は、セラミダーゼを阻害して、細胞増殖の阻害を生じることが示された [ B i e l a w s k a ら, J. Biol. Chem. 271, 12646 - 12654 (1996) ]。

【0012】

p - ニトロフェニル - アミノ - プロパンジオールのエステル :

【化3】



30

は、細胞分化を阻害することが示された [ B i e l a w s k a ら, J. Biol. Chem. 267, 18493 - 18497 (1992) ]。

【0013】

スフィンゴリピドの他の非天然誘導体は、細胞増殖及び分化に影響を及ぼす。例えば、N, N, N - トリメチルスフィンゴシンは、細胞増殖を阻害することが示された [ E n d o ら, Cancer Research, 51, 1613 - 1618 (1991) ]。アミド基が - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CH=CH-CHOH-CHNH[(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>]-CH<sub>2</sub>OHにより置換されているC<sub>8</sub>セラミドは、アポトーシスを誘導した [ K a r a s a v v a s ら, Eur. J. Biochem. 236, 729 - 731 (1996) ]。

40

ヘキサデシルホスホコリンは、セラミド媒介アポトーシスを誘導した [ W i e d e r 等, J. Biol. Chem. 273, 11025 - 11031 (1998) ]。

【0014】

本発明の目的は、スフィンゴリピドの代謝を調節することができる新規な治療用化合物を

50

提供することである。

本発明の更なる目的は、望ましくない細胞を殺傷するのに用いることができる新規な治療用化合物を提供することである。

本発明のこれらの及び他の目的は、記載が進行するにつれてさらに明らかになるであろう。

【発明の要旨】

【0015】

本発明は、一般式(I)：

【化4】

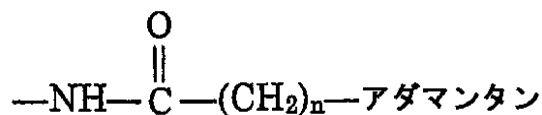


10

[式中、Rは、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和のアルキル鎖又はアルケニル鎖、 $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2$ ) $_m$   $\text{CH}=\text{CH}$ -基、 $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2$ ) $_m$  基 (mは、0又は1~20の整数である)、場合によりニトロ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アシルアミノ基、 $-\text{NHC}(\text{S})\text{NH}$ -アルキル基、スルホニルアミド-アルキル基、式

20

【化5】



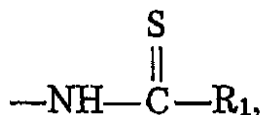
(nは、1~20の整数である)で表される基、又は $-\text{NH}$ -アダマンタン基により置換されているフェニル基、 $-\text{NH}-t-\text{BOC}$ 基、 $-\text{NH}-\text{FMOC}$ 基、又は $\text{NH}-\text{CBZ}$ 基であり；

30

Xは、水素原子又は $-\text{OR}_4$ 基 ( $\text{R}_4$ は、水素原子又は、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル鎖又はアルケニル鎖である)であり；

Yは、 $-\text{NH}_2$ 基、 $\text{NHR}^x$ 基 ( $\text{R}^x$ は、水素原子、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状のアルキル鎖又はアルケニル鎖である)、アミノ保護基、式

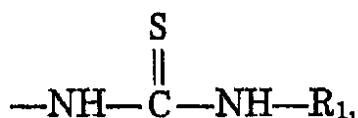
【化6】



40

で表される基、式

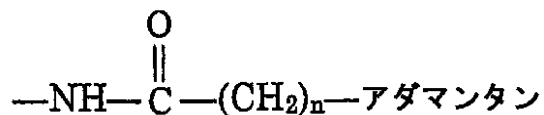
【化7】



で表される基、 $-\text{NH}(\text{SO}_2)\text{R}_1$ 基、 $-\text{NR}_1\text{R}_2$ 基、 $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ 基 ( $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 及び $\text{R}_3$ は、同一であるか又は異なっていることがあり、それぞれ $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基又は $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルケニル基である)、式

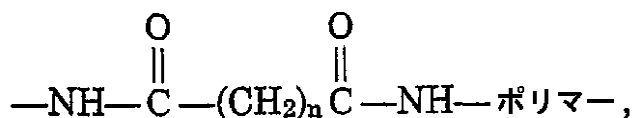
50

【化 8】



(n は、0 又は 1 ~ 20 の整数である) で表される基、-NH-アダマンタン基、式

【化 9】



10

(式中、「ポリマー」は、 $10^3$  ダルトンから  $10^6$  ダルトンの分子量を有する天然又は合成の生体適合性 (biocompatible) ポリマーである) で表される基であり;

Z は、水素原子、-OH 基、モノ-又はジサッカライド、モノサッカライドスルフェート及びコリンホスフェートであるが;

但し、R が、アルキル基、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}$ -基、フェニル基又はニトロフェニル基である場合に、Y は、 $\text{NH}_2$  基であることができず; そして  $R_1$  がメチル基であり、R が  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}$ -基であり、そして Z が -OH 基である場合に、Y は、- $\text{NR}_1\text{R}_2$  基、- $\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$  基又は  $\text{NHR}_4$  基 ( $R_4$  は、オクチル基である) であることができない]

20

で表される化合物、及びその異性体及び薬剤学的に許容することができる塩に関する。

【0016】

本発明は、式中の置換基が請求項 1 に定義した意味を有する式 (I) で表される化合物を活性成分として含む医薬組成物、及び場合により薬剤学的に許容することができる担体、佐剤及び希釈剤を更に含む医薬組成物にも関する。

【0017】

本発明の医薬組成物は、スフィンゴリピドの蓄積を低減するのに用いることができ、そして従って、脂質蓄積症、例えば、ゴーシェ病、テイ-サックス病、ニーマン-ピック病、クラッペ病、異染性ロイコジストロフィー、ファブリー病及びファーバー病の治療に用い

30

ることができる。  
式 (I) で表される新規化合物は、酸性、中性及びアルカリ性のスフィンゴミエリナーゼ、酸性、中性及びアルカリ性のセラミダーゼ、-ガラクトシルシンテターゼ、セラミドシンテターゼ、スフィンゴミエリンシンテターゼ及びグリコセラミドシンテターゼの阻害剤として用いることができる。

【0018】

本発明の医薬組成物は、癌性疾患の治療に、野生型及び薬剤耐性癌細胞の殺傷にも用いることができる。

本発明の医薬組成物は、寄生生物、ウイルス、細菌、真菌類及びプリオンの疾患の治療にも用いることができる。

40

別の観点において、本発明は、脂質蓄積症又は癌性疾患の治療が必要な患者において前記脂質蓄積症又は癌性疾患を治療する方法であって、式 (I) で表される化合物又は前記化合物を含む医薬組成物の治療上有効量を前記患者に投与することを含む前記治療方法を提供する。

《図面の簡単な説明》

【0019】

図 1 - 細胞生存性への AD-2646 の効果

増加する濃度の AD-2646 の存在下に、HL60 細胞生存性を試験した。

略語: V i a (生存)、C (細胞)、C o n t r (対照)、I n h i (阻害剤)、C o n c (濃度)。

50

図 2 - T S U - P R 細胞への A D - 2 6 4 6 の細胞毒性効果

A D - 2 6 4 6 の細胞毒性効果を、増加する濃度の A D - 2 6 4 6 を用いて 2 日間にわたり試験した。全タンパク質量を測定した。略語：P r o t (タンパク質)。

図 3 - スフィンゴリピド代謝への A D - 2 6 4 6 の効果 ( S P M )

ボディピー ( B o d i p y ) - C 3 - セラミド 2 . 5  $\mu$  M の存在下に、増加する濃度の A D - 2 6 4 6 と共に、H L 6 0 細胞を 3 時間インキュベートした。抽出後、リピドを薄層クロマトグラフィープレート上にアプライし、そしてボディピー - C 3 - スフィンゴミエリン ( S P M ) の蛍光を定量した。

図 4 - スフィンゴリピド代謝への A D - 2 6 4 6 の効果 ( G C )

ボディピー - C 3 - セラミド 2 . 5  $\mu$  M の存在下に、増加する濃度の A D - 2 6 4 6 と共に、H L 6 0 細胞を 3 時間インキュベートした。抽出後、リピドを薄層クロマトグラフィープレート上にアプライし、そしてボディピー - C 3 - セレブロシド ( G C ) の蛍光を定量した。 10

図 5 - A D - 2 6 4 6 は T S U - P R 1 細胞における S P M 合成を阻害する

増加する濃度の A D - 2 6 4 6 の存在下に、T S U - P R 1 細胞を 3 日間インキュベートし、ボディピー - C 3 - スフィンゴミエリン ( S P M ) の蛍光を定量した。

図 6 - 本発明の化合物によるスフィンゴリピド代謝の阻害

H L 6 0 細胞を、種々の化合物 A D - 2 6 7 2、A D - 2 6 7 3 及び A D - 2 6 7 4 (それぞれ 5  $\mu$  M 及び 1 0  $\mu$  M) と共にインキュベートした。B o d 3 - S P M 及び B o d 3 - G C の合成への前記種々の化合物の効果を試験した。S P M 及び G C の相対量をプレートの蛍光像に示す。 20

略語：C o n t (対照)

【 0 0 2 0 】

スフィンゴリピドの代謝を調節することができる物質の調査において、本発明者らは、一般式 ( I ) :

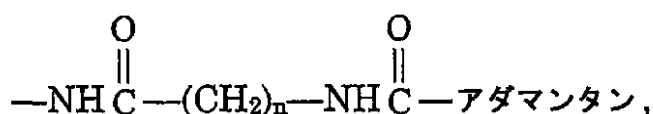
【 化 1 0 】



30

[ 式中、R は、場合によりヒドロキシル基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和のアルキル鎖又はアルケニル鎖、 $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2$ ) $_m$   $\text{CH}=\text{CH}$ -基、 $\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_2$ ) $_m$  基 (m は、0 又は 1 ~ 2 0 の整数である)、場合によりニトロ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アシルアミノ基、 $-\text{NHCO}(\text{S})\text{NH}$ -アルキル基、スルホニルアミドアルキル基、式

【 化 1 1 】



40

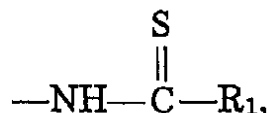
(n は、1 ~ 2 0 の整数である) で表される基、NH-アダマンタン基、又は -NH-t-BOC 基により置換されているフェニル基、-NH-FMOC 基又は NH-CBZ 基であり;

X は、水素原子又は -OR<sub>4</sub> 基 (R<sub>4</sub> は、水素原子、又は、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル鎖又はアルケニル鎖である) であり;

50

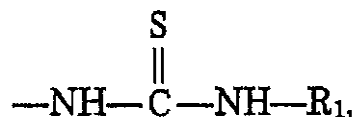
Yは、 $-NH_2$ 基、 $NHR^x$ 基 ( $R^x$ は、水素原子、場合によりヒドロキシ基によって置換されていることのある、直鎖状又は分枝状のアルキル鎖又はアルケニル鎖である)、アミノ保護基、式

【化12】



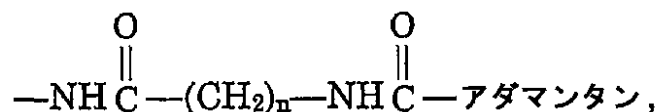
で表される基、式

【化13】



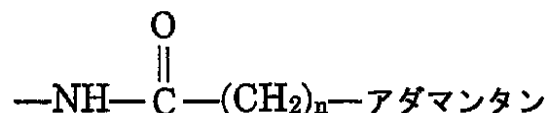
で表される基、 $-NH(SO_2)R_1$ 基、 $-NR_1R_2$ 基、 $-N^+R_1R_2R_3$ 基 ( $R_1$ 、 $R_2$ 及び $R_3$ は、同一であるか又は異なっていることがあり、それぞれ $C_{1-6}$ アルキル基又は $C_{1-6}$ アルケニル基である)、式

【化14】



( $n$ は、0又は1~20の整数である)で表される基、 $-NH-$ アダマンタン基、式

【化15】



(式中、「ポリマー」は、 $10^3$ ダルトンから $10^6$ ダルトンの分子量を有する天然又は合成の生体適合性ポリマーである)で表される基であり;

Zは、水素原子、 $-OH$ 基、モノ-又はジサッカライド、モノサッカライドスルフェート及びコリンホスフェートであるが;

但し、Rが、アルキル鎖又はアルケニル鎖、 $CH_3(CH_2)_mCH=CH-$ 基、フェニル基又はニトロフェニル基である場合に、Yは、 $NH_2$ 基であることができず;そして $R_1$ がメチル基であり、Rが $CH_3(CH_2)_mCH=CH-$ 基であり、そしてZが $-OH$ 基である場合に、Yは、 $-NR_1R_2$ 基、 $-N^+R_1R_2R_3$ 基又は $NHR_4$ 基 ( $R_4$ は、オクチル基である)であることができない]

を有する一連の新規化合物、及びその異性体及び薬剤学的に許容することができる塩を合成した。

【0021】

式(I)で表される好ましい化合物は、式中のRがアミノフェニル基又はニトロフェニル基である化合物である。

式中のYが $-NH_2$ 基、 $NHR^x$ 基である式(I)で表される化合物、とりわけ、式中の $R^x$ がアルキル鎖である化合物も好ましい。

アミノ保護基は、当業者に公知の任意の適切なアミノ保護基、とりわけ、BOC(第三級ブチルオキシカルボニル)、FMOC(フルオレニルメトキシカルボニル)又はCBZ(ベンジルオキシカルボニル)であることができる。

【0022】

一部の特定のとりわけ好ましい化合物を以下に列挙する。アルキル鎖又はアルケニル鎖の長さを変化させることができることに留意されたい。アダマンチル部分を含む化合物は、

10

20

30

40

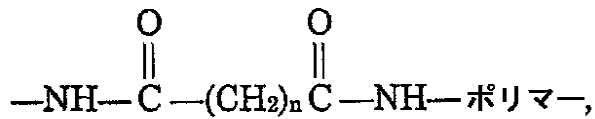
50

この基の大きさ及び立体配置によりその化合物は細胞膜中に留められ、この膜内の酵素に影響を及ぼすことができるので、有利であることができる。

【0023】

他の好ましい化合物は、式中の Y が式

【化16】

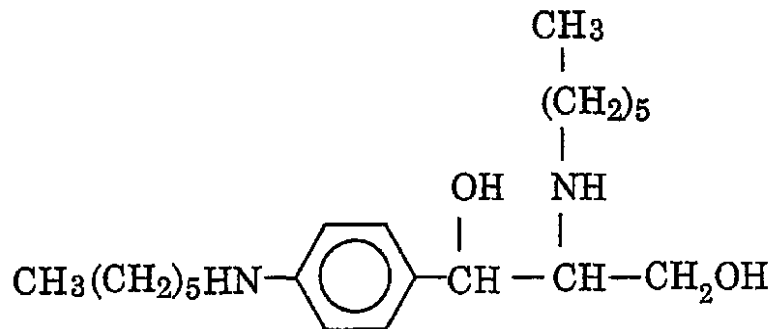


(式中、「ポリマー」は分子量  $10^3 \sim 10^6$  を有する天然又は合成の生体適合性ポリマー、例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸、デキストラン、カルボキシメチルセルロース、コンドロイチンスルフェート、デルマトンスルフェート、ポリエチレングリコール、ペプチド又はタンパク質である)で表される基である化合物であることができる。本発明の前記高分子化合物は、細胞膜を透過して細胞に入ることができないので、外側の細胞膜又は細胞外周囲でのみ阻害することができる。

【0024】

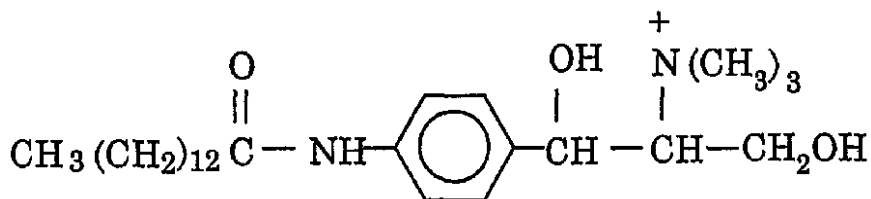
一部の特定の好ましい化合物は、式

【化17】



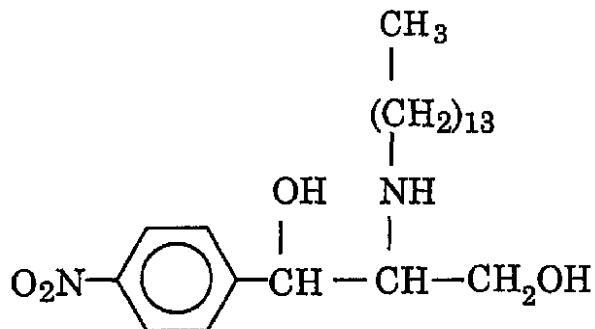
(AD-2665 と称する)、式

【化18】



(AD-2687 と称する)、式

【化19】



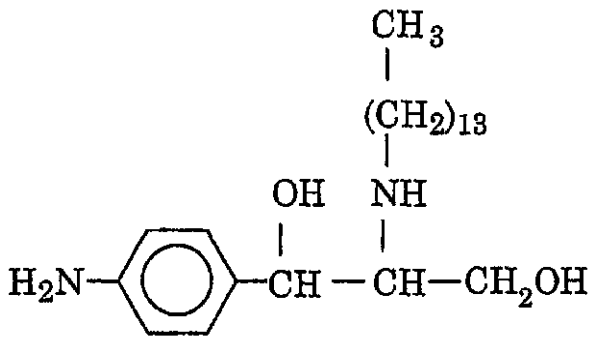
(AD-2646 と称する)、式

【化20】

20

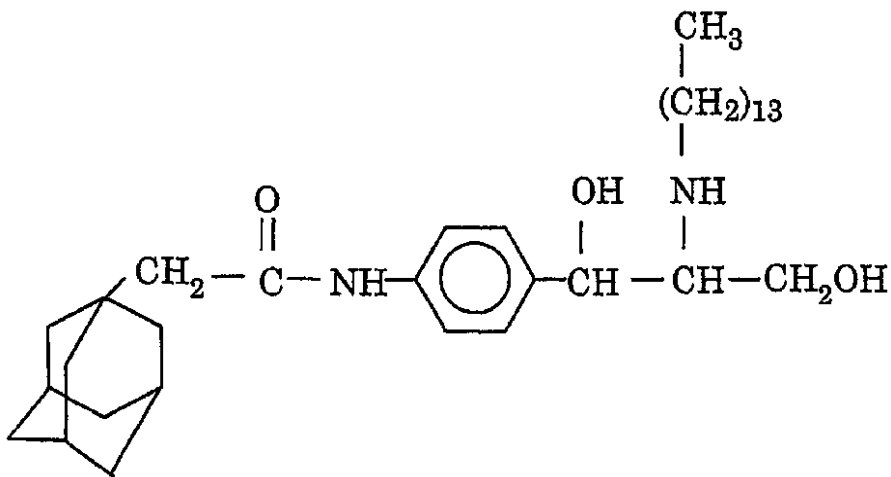
30

40



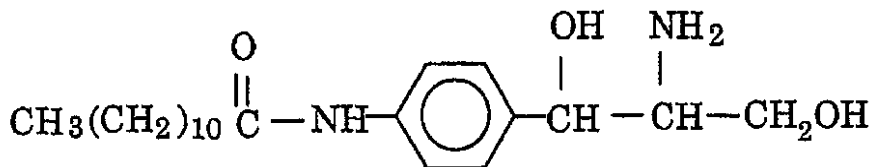
10

(AD-2672と称する)、式  
【化21】



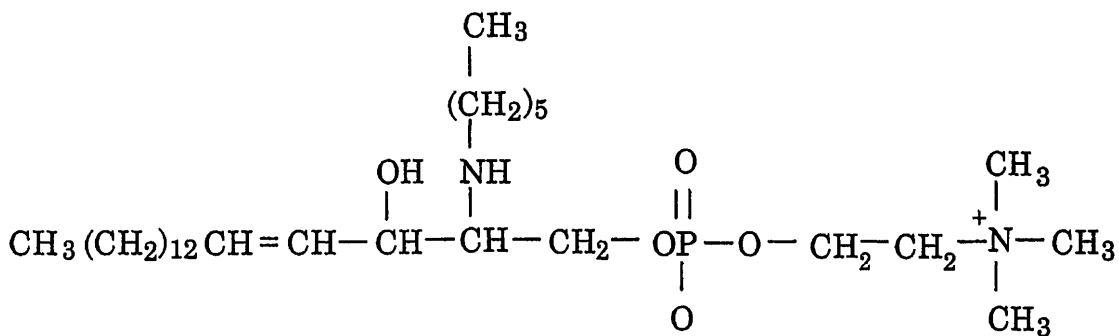
20

(AD-2754と称する)、式  
【化22】



30

(AD-2673と称する)、式  
【化23】



40

(AD-2144と称する)で表される化合物である。

【0025】

下記の実施例に示すように、本発明の新規な合成化合物は、スフィンゴリピドの分解並びに生合成を阻害することができる。従って、これらの化合物は、リポドーシス、とりわけ、罹患した患者の器官にスフィンゴリピドが蓄積する遺伝的な脂質蓄積症、例えば、ゴーシェ病、テイ-サックス病、ニーマン-ピック病、クラッペ病、異染性ロイコジストロフ

50

ィー、ファブリー病及びファーバー病の治療に用いることができる。脂質蓄積症の治療用の医薬組成物も、本発明の範囲内にある。

【0026】

本発明の化合物を単独で又は他の抗癌剤と組合わせて使用することにより、薬物感受性細胞及び薬物耐性細胞を含む種々の細胞の殺傷にも至った。従って、本発明は、活性成分として本発明の化合物を、場合により少なくとも1種の他の抗癌剤と組み合わせて含有する、癌性疾病の治療のための医薬組成物にも関する。

なお、更に、本発明の化合物は、寄生生物の疾病、例えば、マラリア及びリーシュマニアの治療に用いることができる。前記寄生生物の疾病の治療のための医薬組成物も、本発明の範囲内にある。

10

【0027】

本発明の化合物は、一般に、医薬組成物の形態で提供される。前記組成物は、注射による又は経口摂取による使用のためのものである。

本発明の医薬組成物は、一般に、緩衝剤、医薬組成物の浸透圧を調節する剤、及び、例えば、医薬組成物に風味、色、潤滑等を付与する目的で、場合により、当業者に公知の1種又はそれ以上の担体、賦形剤及び/又は添加剤を含んでいる。

【0028】

それぞれの担体は、他の成分と適合性でありそして治療されるべき患者に対して有害でないという意味において薬剤学的及び生理学的のいずれについても許容することができるものでなければならない。製剤は、直腸投与、鼻投与に適した製剤を含んでいるが、好ましい製剤は、筋肉内投与、皮膚内投与、皮下的投与及びとりわけ静脈内投与を含む、経口的投与又は非経口的投与に向けられたものである。製剤は、便利には、単位投与量型で提供することができる、そして製薬業において公知の任意の方法により製造することができる。

20

【0029】

担体は、デンプン及びその誘導体、セルロース及びその誘導体、例えば、微晶質セルロース、キサンタンガムなどを含んでいることができる。潤滑剤は、硬化ヒマシ油などを含んでいることができる。

好ましい緩衝剤は、リン酸緩衝食塩水溶液(PBS)であり、前記水溶液は浸透圧に関しても調節されている。

【0030】

本明細書中で用いる「薬剤学的に許容することができる担体」とは、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤などを含んでいる。薬剤学的な活性物質に対する前記媒体及び剤の使用は、当業者に周知である。任意の通常の媒体又は剤が活性成分と適合性でない場合以外は、治療用組成物におけるその使用は考慮される。

30

【0031】

好ましい医薬製剤は、好ましくは、静脈注射を含む注射による投与に対して用いられる。本発明の組成物は、種々の方法で投与することができる。限定的でない例によれば、本組成物は、静脈内、筋肉内、又は腹腔内注射により投与することができる。例えば、静脈内投与が有利である。

【0032】

注射用に適した医薬形態は、滅菌の注射可能な溶液又は分散液の即時製剤に対する、滅菌の水溶液又は分散液及び滅菌の粉末を含んでいる。全ての場合に、前記形態は、滅菌されていなければならない、そして容易な注射針通過性が存在する程度まで流動性がなければならない。前記形態は、製造及び保存条件下で安定でなければならない、そして微生物、例えば、細菌及び真菌の汚染作用に対して保存されていなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、及び植物油を含む溶媒又は分散媒体であることができる。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えば、レシチンを用いることにより、分散液の場合には必要な粒度の維持により、及び界面活性剤を用いることにより維持することができる。

40

50

## 【0033】

微生物の作用の阻止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどにより達成することができる。多くの場合に、等張剤、例えば、砂糖又は塩化ナトリウムを含んでいることが好ましい。注射可能な組成物の延長された吸収は、吸収を遅らせる剤、例えば、アルミニウムモノステアレート及びゼラチンの組成物における使用により達成することができる。

## 【0034】

滅菌の注射可能な溶液は、前記列挙した種々の他の成分を有する適切な溶媒中に必要量の活性成分を加え、必要により、続いてる過滅菌を行うことにより調製する。一般に、分散液は、基本的な分散媒体及び前記列挙した他の成分からの必要な成分を含有する滅菌担体中に種々の滅菌した活性成分を加えることにより調製する。

10

滅菌した注射可能な溶液の調製用の滅菌粉末の場合に、好ましい製造方法は、活性成分に任意の追加の所望成分を加えた予め滅菌した溶液から、前記活性成分に任意の追加の所望成分を加えた粉末を生じる真空乾燥法及び凍結乾燥法である。

## 【0035】

経口投与に対して、本発明の組成物は、処理されるべき患者用の栄養供給材料又は給水と混合することができる。しかしながら、有効な組成物は、栄養供給材料又は水と混合することができる又は別々に患者に供給することができると考えられる。

医薬組成物の調製は当業者に周知であり、そして多くの論文及び教科書に記載されており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. 編集, Mack Publishing Company, イーストン, ペンシルバニア州, 1990, 及びとりわけその1521~1712頁を参照されたい。

20

## 【0036】

添加剤は、細胞膜全体にわたる活性成分の吸収を高めるようにも設計することができる。前記剤は、一般に、本発明の分子の細胞吸収を高める剤である。例えば、本発明の化合物は、リポソーム内に封入されていることができる。リポソームの、例えば、特定のトランスフェクション試薬を用いた、調製及び使用は、当業者に周知である。リポソームを得る他の方法は、センダイウイルス又は他のウイルスの使用を含んでいる。

## 【0037】

前記リポド剤は、細胞によって吸収された活性化合物の安定性を改善することもできる。活性剤の量は変化させることができる。その量は、一般に、疾病、疾病の状態、患者の年齢、体重及び性別に依存しており、そして主治医により決定されるはずである。

本発明は、脂質蓄積症、癌性疾患又は寄生生物疾患の治療方法又は予防方法であって、本発明の化合物又は医薬組成物又は任意のその好ましい態様物を、前記治療又は予防が必要な患者に投与することを含む前記治療方法又は予防方法にも関する。

30

## 【0038】

分子生物学の技術分野の多数の方法の詳細は、当業者に周知であるので、本明細書中では示さない。前記方法は、特定部位の突然変異誘発、PCRクローニング、cDNAの発現、組換え体タンパク質又はペプチドの分析、細菌及び酵母細胞の形質転換、哺乳類細胞のトランスフェクションなどを含んでいる。前記方法を記載する教科書は、例えば、Sambrookら, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0879693096, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelによる, ISBN: 047150338X, John Wiley & Sons, Inc. 1988, 及びShort Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelらによる(編集)第3版, John Wiley & Sons; ISBN: 0471137812, 1995である。これらの出版物の全体を、参考までに本明細書に引用する。さらに、多数の免疫学的技術が当業者に周知であるので、それぞれの例における

40

50

技術の詳細は本明細書中に記載しない。例えば、Current Protocols in Immunology, Coliganら(編集), John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク, ニューヨーク州を参照されたい。

【0039】

本明細書及び特許請求の範囲を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む(comprise)」なる語、及びその変形、例えば、「含む(comprises)」及び「含んでいる」は、記載した整数もしくは工程又は整数もしくは工程の群の包含を意味するが、任意の他の整数もしくは工程又は整数もしくは工程の群の除外を意味するものでないことを理解されたい。

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いる、単一形の「一つの(a)」、「一つの(an)」及び「その(the)」は、文脈上明確に他の意味に解すべき場合を除き、複数の対象を含んでいる。

【0040】

開示しそして記載した本発明は、本明細書に開示のプロセス工程及び材料がある程度変化することができるので、本明細書に開示の特定の実施例、プロセス工程、及び材料に限定されるものでないことを理解されたい。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲及びその等価物によってのみ限定されるものであるから、本明細書に用いた用語は、特定の態様のみを記載する目的で用いるものであり限定されることを意図するものでないことを理解されたい。

【0041】

従って、以下の実施例は、本発明の観点を実施することにおける、本発明により用いられる技術の代表に過ぎない。これらの技術は本発明の実施に対する好ましい態様の典型であるが、本発明の開示内容に照らして、当業者が、本発明の精神及び意図した範囲から逸脱することなく多くの変形を行うことができることが認識されるであろうことを理解されたい。

【実施例】

【0042】

《実験手順》

細胞系

HL60: ヒト白血病細胞系(ATCC CCL-240)

TSU-PR1: 前立腺癌細胞(ATCCで入手可能)

MCF7-AdrR: ヒト乳癌細胞、薬物耐性(ATCCで入手可能)

MCF7-NCi: ヒト乳癌細胞、薬物感受性(ATCCで入手可能)

U937: 骨髄性白血病細胞(ATCCで入手可能)

【0043】

《実施例1: 化合物の合成》

《1-(2R, 3R)-2-(N-ヘキシルアミン)-1-(4-ニトロフェニル)-1,3-プロパンジオール(AD-2593)の調製》

丸底フラスコ中のメタノール50mL中に、(2R, 3R)-2-アミノ-1-(4-ニトロフェニル)-1,3-プロパンジオール2gを溶解した。磁氣的攪拌した溶液に、0.1N-HCl(5mL)、続いてヘキシルアルデヒド(ヘキサナール)2gを添加した。この混合物を30分間攪拌した後、3時間かけて数回に分けてNaBH<sub>4</sub>1gを添加した。この混合物を一晩攪拌下におき、その溶液を分液漏斗に移し、H<sub>2</sub>O100mL及びジクロロメタン100mLを添加し、そしてその溶媒混合物を振盪した。その下相を収集し、その水性メタノール相をジクロロメタン:メタノール(3:1)50mLで2回抽出し、その3回分の下方相を一緒にし、そしてH<sub>2</sub>O75mLで振盪した。その有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、ろ過し、そして蒸発乾固した。小容量のジクロロメタン:メタノール(1:1)中にその残さを溶解し、そして50×2cmのシリカゲルカラム上にロードした。増加する量のメタノールを含有するジクロロメタンで、標記化合物を溶離した。収量:1.2g; M.S.I<sup>+</sup>=296。

## 【0044】

《2. (2S, 3R) 2 - アミノ - 1 - (4 - アミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2516) の調製》

メタノール 150 mL 中に (2S, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - アミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール 5 g を溶解し、10% Pd/C 100 mg を添加し、そしてその溶液を室温においてハイドロジェネーター中で 50 Psi で 6 時間水素化した。ろ過により触媒を除去し、そしてその溶液を蒸発乾固した。その乾燥化合物を更に精製することなく合成に用いた。収量：5 g ; M . S . I<sup>+</sup> = 183。

## 【0045】

《3. (2S, 3S) - 2 - (N - オクチルアミン) - 1 - (4 - N - オクチルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2670) の調製》 10

丸底フラスコ中のメタノール：水 (1 : 1) 100 mL 中に (2S, 3S) - 2 - アミノ - 1 - (4 - アミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2516 に記載したとおりに調製) 3 g を溶解した。この溶液を磁氣的に攪拌し、そしてオクチルアルデヒド (オクタナール) 1 mL を、続いて酢酸 1 mL を添加した。この溶液を 15 分間攪拌し、そして 2 時間をかけて少しずつナトリウムシアノボロハイドライド NaCNBH<sub>3</sub> 1 g を添加した。この溶液をさらに 3 時間攪拌し、次いで分液漏斗に移し、そして水 100 mL、及びジクロロメタン 50 mL 及びメタノール 25 mL を加えた。振盪後、その下相を収集し、そして上方の水性メタノール相を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (3 : 1) 50 mL で 2 回抽出した。一緒にした有機相を H<sub>2</sub>O 100 mL で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で 2 時間乾燥し、ろ過し、そしてその溶液を蒸発乾固した。最小量のジクロロメタン：エタノール (1 : 1) 中にその残さを溶解し、そして 2 x 50 cm のシリカゲル上にロードした。ジクロロメタン中の増加する量のメタノールでカラムを溶離した。収量：2.1 g ; M . S . I<sup>+</sup> = 407。 20

## 【0046】

《4. (2R, 3R) - 2 - BOC アミノ - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2502) の調製》

ジクロロメタン：メタノール (2 : 1) 100 mL 中に、(2R, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール 8 g を溶解し、そして同じ溶媒混合物 50 mL 中に溶解した BOC 無水物 6 g を加えた。250 mL 容エルレンマイヤー 30 中に、この溶液を入れ、そして 30 分間攪拌すると、溶液は透明になった。次いで、さらに 12 時間攪拌に付した。その溶液を蒸発乾固し、そしてその残さを水 100 mL 及びイソプロパノール 100 mL 中に溶解し、次いで分液漏斗に移してヘプタン 100 mL で洗浄した。そのヘプタン相を取り出し、そして追加量のヘプタン 60 mL を加えた。各相を混合し、そしてヘプタン相を取り出した。その水相を、ジクロロメタン 100 mL で抽出した。そのジクロロメタン相を、MgSO<sub>4</sub> 5 g 上で 2 時間乾燥し、次いでろ過し、そして蒸発乾固した。更に精製することなく、標記化合物を用いた。収量 8 g ; M . S . I<sup>+</sup> = 313。

## 【0047】

《5. (2R, 3S) - 2 - BOC - アミノ - 1 - (4 - N - ヘキサデカノイルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2522) の調製》 40

AD 2502 の調製 (4) に記載したとおりに、2R, 3S - 2 - アミノ - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール 4 g に BOC を結合した。AD 2516 (2) に記載したとおりに、その BOC 誘導体 2 g を水素により還元した。その生成物、すなわち、それぞれのアミノフェニル誘導体 1 g を、EDAC 1 g の添加により、ジクロロメタン：メタノール (2 : 1) 50 mL 中のヘキサデカン酸 1 g と反応させた。その反応混合物を一晩攪拌し、蒸発乾固し、ジクロロメタン - メタノール (1 : 1) 4 mL 中にその残さを溶解し、そしてジクロロメタン中に調製した 50 x 1.5 cm のシリカゲルカラム上にロードした。ジクロロメタン及び増加する量のメタノールの混合物で、標記化合物を溶離した。全収量：4.5 g ; M . S . I<sup>+</sup> = 521。

## 【0048】

《6. (2R, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - N - ブチロイルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2602) の調製》  
 トリフルオロ酢酸 (TFA) : ジクロロメタン (1 : 1) 10 mL 中に、(2R, 3R) - 2 - BOC - アミノ - 1 - (4 - N - ブチロイルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (ヘキサデカン酸の代わりに酪酸を用いて、化合物 AD - 2522 の調製に記載したとおりに調製) を溶解した。20 mL 容スクリーキャップ付きの試験管に、その混合物を移し、そして時折攪拌しながら 37 に 2 時間保ち、次いでラタベイパー (ratavapor) 中で蒸発乾固し、そしてジクロロメタン及び増加する量のメタノールで溶離するシリカゲルカラムを用いてその残さを精製した。収量 : 1.2 g ; M.S.I<sup>+</sup> = 353。 10

## 【0049】

《7. 2 - N, N, N - トリメチルアミノ - 1 - (4 - N - ドデカノイルアミノフェニル) - 3 - プロパノール (AD - 2687) の調製》  
 AD - 2602 の調製 (6) に記載したとおりに、相当する出発材料から 2 - アミノ - 1 - (4 - N - ドデカノイルアミノフェニル) - 3 - プロパノール 2 g を調製した。スクリーキャップ付きの圧力ガラス管中のメタノール 20 mL 中に、その化合物を溶解した。CH<sub>3</sub>I 4 mL、続いて炭酸ナトリウム 1 g を添加した。その圧力ガラス管を密封し、そして 80 の加熱浴中に 12 時間浸漬した。その管を冷却して開けた。その溶液を丸底フラスコに移し、そして蒸発乾固した。最小量のジクロロメタン : メタノール (1 : 1) 中にその残さを溶解し、シリカゲルカラム上にロードし、そしてジクロロメタン及び増加するメタノールの溶液で溶離した。収量 : 1.6 g ; M.S.I<sup>+</sup> = 408。 20

## 【0050】

《8. スフィンゴシル - N - ブチルスルホンアミド (AD - 2208 - B) の調製》  
 25 mL 容三角フラスコ中のジクロロメタン : メタノール (2 : 1) 10 mL 中に、スフィンゴシン 200 mg を溶解した。ブチルスルホニルクロライド 200 μL を添加し、そしてその溶液を 10 分間攪拌した。次いで、1 時間かけてトリエチルアミン 300 μL を 50 μL ずつ添加し、そしてその溶液を一晩攪拌した。その溶液を 250 mL 容分液漏斗に移し、ジクロロメタン 50 mL、メタノール 15 mL 及び水 25 mL の混合物を添加し、そしてその溶液を分液漏斗中で振盪した。0.1 N - HCl (25 mL)、次いで水で、その有機相を洗浄し、そして MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥した。それをろ過し、蒸発乾固し、ジクロロメタン - メタノール 1 mL 中にその残さを溶解し、そして小型のシリカゲルカラム上にロードした。ジクロロメタン中の増加する比率のメタノールで、標記生成物を溶離した。収量 : 150 mg ; M.S. 主要 I<sup>+</sup> = 420。 30

## 【0051】

《9. スフィンゴシルホスホリルコリン - N - エチルチオ尿素 (AD - 2209) の調製》  
 25 mL 容の三角フラスコ中のメタノール : 水 (2 : 1) 10 mL 中に、スフィンゴシルホスホリルコリン 100 mg を溶解した。攪拌しながらその溶液に、第三級ブチルイソチオシアネート 100 mg を添加した。その溶液を 10 分間攪拌し、次いで 1 N 炭酸水素ナトリウム 2.5 mL を添加した。その溶液を 48 時間にわたり攪拌に付し、分液漏斗に移し、そしてジクロロメタン 80 mL、メタノール 30 mL 及び水 40 mL を添加した。その有機相を水 40 mL で洗浄し、次いで MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥し、ろ過し、そして蒸発乾固した。展開用にジクロロメタン : メタノール : 水 (65 : 35 : 5) を用いた調製用 TLC により、標記化合物を精製した。紫外線ランプにより、標記生成物を含有するシリカスポットを見つけ、削り取り、そして小型カラムにおいてジクロロメタン : メタノール : 水 (1 : 2 : 1) で溶離した。収量 : 80 mg ; M.S.I<sup>+</sup> = 574。 40

## 【0052】

《10. L - エリスロスフィンゴシル - N - ドデシル (AD - 2754) の調製》  
 マグネチックスターラー及び還流冷却器を備えた 50 mL 容丸底フラスコ中のメタノール 50 40

30 mL中に、合成L-エリスロスフィンゴシン100 mgを溶解した。ドデシルブロマイド200 mg、続いて炭酸ナトリウム300 mgを添加した。そのフラスコを水浴中で加熱し、そしてその溶液を24時間にわたり還流した。250 mL容分液漏斗に、その溶液を移し、ジクロロメタン50 mL及び水30 mLを添加し、そして下方の有機相を収集し、そして0.5 N-HCl(25 mL)で洗浄し、次いで水25 mLで2回洗浄した。その有機相を、MgSO<sub>4</sub> 2 g上で乾燥し、ろ過し、そして蒸発乾固した。ジクロロメタン：メタノール(1：1)1 mL中に、その残さを溶解し、小型のシリカゲルカラム上にロードし、そして増加する比率のメタノール及びジクロロメタンで標記生成物を溶離した。収量：70 mg；M.S.I<sup>+</sup> = 468。

## 【0053】

10

《11.L-エリスロスフィンゴシルホスホリルコリン-N-ヘキシル(AD-2144)》

100 mL容三角フラスコ中のメタノール：水(1：1)25 mL中に、スフィンゴシルホスホリルコリン100 mgを溶解した。マグネチックスターラーによりその溶液を攪拌し、そしてヘキサナール100 mg及び酢酸250 µLを添加した。その混合物を20分間攪拌し、そしてNaCNBH<sub>3</sub> 100 mgを添加した。室温で一晩攪拌した後、溶媒を蒸発乾固し、そしてその残さを洗浄してAD-2209(9)の調製において実施したとおりに精製した。収量：65 mg；M.S.Na<sup>+</sup> = 562。

## 【0054】

20

《12.D,L-1,3-ジヒドロキシ-2-[アミノ(N-FMOCプロピル-3-アミン)]-オクタデカン(AD-2751)》

メタノール：水(1：1)50 mL中に、DL-1,3-ジヒドロキシ-2-アミノオクタデカン300 mgを溶解した。FMOC-アラニナル(N-FMOC3アミノプロパナール)100 mg、続いて酢酸0.5 mLを添加した。その溶液を20分間攪拌し、そして1時間かけて少しずつNaCNBH<sub>3</sub> 200 mgを添加した。その混合物を5時間攪拌に付し、蒸発乾固し、最小量のジクロロメタン：メタノール(2：1)中に再溶解し、そして増加する比率のメタノール及びジクロロメタンを用いてシリカゲルカラム上でのカラムクロマトグラフィーにより精製した。収量：200 mg；M.S.I<sup>+</sup> = 581。

## 【0055】

30

《13.D,L-1,3-ジヒドロキシ-2-[アミノ(3-アミノプロピル)]-オクタデカン(AD-2752)》

メタノール4 mL及びピペリジン1 mL中に、DL-1,3-ジヒドロキシ-2-[アミノ(N-FMOCプロピル-3-アミン)]オクタデカン50 mgを溶解した。その混合物を30分間攪拌し、次いで窒素流下に蒸発乾固した。ジクロロメタン：メタノール：水酸化アンモニウム：水(80：20：1：1)の溶液で展開する調製用薄層クロマトグラフィーシリカプレートを用いて、標記生成物を精製した。標記生成物(UVランプにより確認)を削り取り、そしてジクロロメタン：メタノール：水(1：2：1)を用いて小型カラム中のシリカゲルから溶離した。収量：30 mg；M.S.I<sup>+</sup> = 359。

## 【0056】

40

《14.(2R,3S)-2-BOC-アミノ-1-[4-N-(ドデカノイル-12-N-BOC-アミン)-フェニル]-1,3-プロパンジオール(AD-2620)》

AD-2502(4)の調製において実施したとおり、(2R,3S)-2-アミノ-1-(4-ニトロフェニル)-1,3-プロパンジオール3 gにBOCを結合した。AD-2516(2)の調製に記載したとおり水素により、そのBOC誘導体3 gを還元した。EDAC500 mgの添加により、ジクロロメタン：メタノール(2：1)50 mL中のBOC12アミノドデカン酸1 gと、その生成物2 gとを反応させた。その混合物を一晩攪拌し、蒸発乾固し、そしてAD-2687(7)に記載したとおりに精製した。全収量：2.5 g；M.S.I<sup>+</sup> = 673。

## 【0057】

50

《15.(2R,3R)-2-アミノ-1-(4-アミノフェニル)-1,3-プロパン

ジオール (AD - 2516B)》

AD - 2516 (2) の調製において実施したとおりに、(2R, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール 5 g の水素化により標記化合物を調製した。収量：4.9 g；M.S.I<sup>+</sup> = 183。

【0058】

《16. (2R, 3R) - 2 - (N - ヘキシルアミン) - 1 - (4 - N - ヘキシルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2665)》

AD - 2593 (1) の調製において実施したとおりに、ヘキサナール 2 g と (2R, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - アミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール 1 g とを反応させ、そして同様の手順により精製した。標記化合物を分光光度計により定量したところ、ピーク 255 nm 及びモル吸光係数 16.6 光学密度単位 / μmol / mL を与えた。収量：800 mg；M.S.I<sup>+</sup> = 351。

10

【0059】

《17. (2R, 3R) - 2 - (N - テトラデシルアミン) - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2646)》

エタノール 100 mL 中に、(2R, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール 3 g を溶解し、テトラデシルブロマイド 4 mL、続いてジイソプロピルエチルアミン 5 mL を添加した。還流冷却器を備えた 250 mL 容丸底フラスコ中で、24 時間にわたり還流温度まで、その混合物を加熱し、そしてマグネチックスターラーで攪拌した。その溶液を蒸発乾固し、ジクロロメタン：メタノール (2 : 1) 200 mL 中に溶解し、500 mL 容分液漏斗に移し、そして 0.2 N - HCl (75 mL) で洗浄した。相を分離し、そして 0.1 N - HCl (75 mL) 及びメタノール 15 mL でその有機相を再度洗浄した。その有機相を分離し、そして硫酸マグネシウム 5 g 上で乾燥し、ろ過し、そして蒸発乾固した。最小量の温エーテル中に、得られた油状体を溶解し、そして -20 に一晩放置して結晶化した。低温で結晶をろ過し、そして H<sub>2</sub>O 3% を含有する熱エーテルから再結晶化させた。収量は 3.6 g。標記化合物を分光光度計により定量したところ、ピーク 270 nm を与えた。そのモル吸光係数は 7.84 光学密度単位 / μmol / mL であった。M.S.I<sup>+</sup> = 409。

20

NMR：(CDCl<sub>3</sub>) 0.88, t (3H)；1.26, m (22H)；1.48, m (2H)；2.54, m (1H)；2.73, m (2H)；3.30, ブロード s (3H)；7.6, d (2H)；8.2, d (2H)。

30

【0060】

《18. (2R, 3R) - 2 - (N - テトラデシルアミン) - 1 - (4 - アミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2672)》

AD - 2516 (2) の調製において実施したとおりに、(2R, 3R) - 2 - (N - テトラデシルアミン) - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2644) 2 g を水素化した。ジクロロメタン中の増加する濃度のメタノールで溶離するシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーにより、得られた油状体を精製した。収量：1.5 g；M.S.I<sup>+</sup> = 378。

【0061】

《19. (2R, 3R) - 2 アミノ - 1 - (N - ドデカノイルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2673)》

AD - 2602 の調製 (6) に記載したのと同じプロトコルを用いて、(2R, 3R) - 2 (N - tBOCアミノ) - 1 - (N - ドデカノイルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2582) 2 g から標記化合物を調製した。全収量：1.3 g；M.S.I<sup>+</sup> = 365。

40

【0062】

20. 同じ手順により、2S, 3S 相当体を調製し、AD - 2674 と命名した。

【0063】

《21. (2R, 3R) - 2 - (N, N, N - トリメチルアミン) - 1 - (N - テトラデ

50

カノイル - 4 - アミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2687)》  
 (2R, 3R) - 2 - アミノ - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール  
 5 g から AD - 2687 の調製 (7) に記載したとおりに調製した (2R, 3R) - 2 -  
 (N, N, N - トリメチルアミン) - 1 - (4 - ニトロフェニル) - 1, 3 - プロパンジ  
 オール (AD - 2667) 3 g から AD - 2516 の調製 (2) に記載したとおりに調製  
 した (2R, 3R) - 2 - (N, N, N - トリメチルアミン) - 1 - (4 - アミノフェニ  
 ル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD 2671) 2 g から標記化合物を調製した。収量  
 : 2 g ; M . S . I <sup>+</sup> = 436。

【0064】

《22 . (2R, 3R) - 2 - (N - テトラデシルアミン) - 1 - (4 - アダマンチルア 10  
 セトアミド - フェニル) - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2754)》  
 EDC 100 mg の添加により、ジクロロメタン - メタノール (1 : 1) 10 mL 中の 1  
 - アダマンタン酢酸 (1 - adamantane acetic) 100 mg と、化合物  
 AD - 2672 (100 mg) とを反応させた。その反応混合物をマグネチックスターラ  
 ーで一晩攪拌した。その溶液を蒸発乾固し、そしてジクロロメタン 1 mL 及びメタノール  
 0 . 5 mL の混合物中に、得られた油状体を溶解した。その溶液を 25 x 1 cm のシリカ  
 ゲルカラム上にロードした。増加する量のメタノールを含有するジクロロメタンで標記化  
 合物を溶離した。収量 : 90 mg ; M . S . I <sup>+</sup> = 555。

【0065】

《実施例 2》

《細胞生存性への化合物 AD 2646 の効果》

細胞死亡率 (生細胞計数) 及び / 又は全タンパク質量を測定することにより、細胞生存性  
 への AD - 2646 の効果を分析した。6 - 又は 24 - ウェル・ディッシュ中の増加する  
 濃度の (2R, 3R) - 2 - (N - テトラデシルアミン) - 1 - (4 - ニトロフェニル)  
 - 1, 3 - プロパンジオール (AD - 2646) と共に、10% ウシ胎児血清を加えた R  
 M P I 中で増殖させた H L 60 細胞をインキュベートした。ジメチルホルムアミド (DM  
 SO) 中の溶液として、この溶媒の濃度が培養基の容量の 0 . 1% を超えないことを確認  
 しながら、標記化合物を添加した。2日後、細胞を収集し、生理的食塩水で2回洗浄し、  
 トリパンブルーで処理し、そして生存している (ブルーでない) 細胞の数を計数した。図  
 1 は、I C 50 値 5 μ M を示している。 30

【0066】

次に、AD - 2646 化合物の観察された殺傷効果の動態 (k i n e t i c) を試験した  
 。40 μ M の AD - 2646 と共に、1時間、3時間、5時間及び7時間にわたり H L 6  
 0 細胞をインキュベートした。1時間後すでに、生存細胞数の 60% の減少を観察した。

【0067】

細胞生存性への AD - 2646 の効果は、さらに、全タンパク質含量を定量したときに支  
 持された。種々の濃度の AD - 2646 と共に、前記のとおり、H L 60 細胞をインキ  
 ュベートした。2日後、細胞を収集し、生理的食塩水で2回洗浄し、分散し、プローブ  
 ソニケーターでショートパルシングした後に前記細胞のタンパク質含量をブラッドフォ  
 ード法により定量した。生細胞計数結果と同様に、タンパク質測定は I C 50 値 5 μ M を示 40  
 した。

【0068】

AD - 2646 化合物が、他の化合物と協同して、細胞生存性及び全タンパク質含量への  
 その効果を媒介することができるかどうかを分析するために、次に、標記化合物とタキソ  
 ールとの協同効果を評価した。タキソール 2 ng の存在下又は非存在下に 4 μ M の AD 2  
 646 と共に2日間、H L 60 細胞をインキュベートした。表 1 に示すように、両方の化  
 合物の協同作用により、2つの各化合物間の相乗作用を示す、全タンパク質量の有意な減  
 少を生じた。

【0069】

【表 1】

タキソール	AD-2646	タンパク質含量 $\mu\text{g}$
+	-	206
-	+	174
+	+	93

## 【0070】

《異なる細胞系へのAD-2646の効果》

細胞生存性へのAD-2646化合物効果の一般性を評価するために、前記開示したのと同じ方法に他の細胞系を付した。

増加する濃度のAD-2646と共に2日間、TSU-PR1細胞（前立腺癌細胞）をインキュベートした。図2に示したタンパク質含量測定値は、IC50値6~7 $\mu\text{M}$ で細胞が殺傷されたことを示している。

《実施例3》

《細胞生存性への種々の化合物の効果》

次いで、細胞の全タンパク質量を測定することにより、細胞生存性への本発明の種々の化合物の効果の評価した。増加する濃度の本発明の種々の化合物の存在下に2日間、種々の細胞系をインキュベートした。その結果を表2に要約する。

## 【0071】

【表2】

細胞生存性への種々の化合物の効果

化合物	細胞系	IC50
AD-2673	HL60	7.5 $\mu\text{M}$
AD-2620	HL60	3 $\mu\text{M}$
AD-2687	HL60	2 $\mu\text{M}$
AD-2665	MCF7-AdrR	7 $\mu\text{M}$
AD-2665	MCF7-NCi	3 $\mu\text{M}$

## 【0072】

《実施例4》

《種々の化合物のアポトーシス効果》

観察された細胞生存性への効果がアポトーシスの誘導に関連しているかどうかを調べるために、次に、本発明のいくつかの化合物のアポトーシス効果を試験した。

5 $\mu\text{M}$ のAD-2672及びAD-2665の非存在下又は存在下に24時間にわたり、骨髄性白血病U937細胞をインキュベートした。次いで、細胞を収集し、そしてDEV Dアーゼ、カスパーゼ(caspase)3活性を定量するキットを用いて、アポトーシスを起こした細胞の百分率を測定した。AD-2672と共にインキュベートしてアポトーシスを起こした細胞の数は、対照細胞においてアポトーシスを起こした細胞の6倍を超えた。AD-2665と共にインキュベートした細胞は、対照細胞における数の2.8倍を超えた。

## 【0073】

さらに、フローサイトメトリー法を用いて、HL60細胞に対して、3つの異なる化合物のアポトーシス効果を試験した。AD-2646、AD-2665又はAD-2687と共に3時間及び24時間及び増加する化合物濃度で、細胞をインキュベートし、収集し、

10

20

30

40

50

そして洗浄した。次いで、洗浄した細胞を、5%トリトンで処理し、そして0.1%クエン酸ナトリウム(pH 7.4)中のヨウ化プロピジウム0.5%mgで染色した。ベクトン・ディキンソン・蛍光活性化セルソーター(Becton Dickinson Fluorescence Activated Cell Sorter; FACS)を用いて分析を実施した。

【0074】

低濃度のAD-2646化合物(10 $\mu$ M)での3時間のインキュベーションの結果は、12%のアポトーシスを起こした細胞を示し、20 $\mu$ Mで細胞の18%がアポトーシスを起こし、そして40 $\mu$ Mで細胞の26%がアポトーシスを起こした。より長い時間(24時間)にわたるインキュベーションは、低濃度(10 $\mu$ M)ですでに約50%のアポトーシスを起こした細胞を示した。

10

【0075】

同様に、AD-2665を用いた3時間の処理は、低濃度(10 $\mu$ M)において約8%の細胞がアポトーシスを起こしたが、20 $\mu$ Mにおいてこの値は26%まで増加した。10 $\mu$ Mで24時間のインキュベーション後、細胞の25%がすでにアポトーシスを起こした。

【0076】

AD-2687を用いた場合、15 $\mu$ Mで3時間のインキュベーション後、細胞の9%のみがアポトーシスを起こしたが、低濃度(2.5 $\mu$ M)で24時間のインキュベーション後、50%に近い細胞がアポトーシスを起こした。

20

40 $\mu$ MのAD-2646又はAD-2665による短時間(30分間)処理後、細胞の5%のみがアポトーシスを起こした。

【0077】

《実施例5》

《スフィンゴリピド代謝への種々の化合物の効果》

発明の背景に述べたように、アポトーシスにおけるセラミドの効果は十分に証明されている。従って、本発明の種々の化合物の観察されたアポトーシス効果がスフィンゴリピド代謝に関連しているかもしれないという可能性を、次に試験した。

【0078】

スフィンゴリピド代謝への種々の化合物の効果を試験するために、ジメチルスルホキシド中の溶液(最終容量の0.1%DMSOを超えない)として培養基に添加したボディピー-C3-セラミド2.5 $\mu$ Mの存在下に、増加する濃度の本発明の種々の化合物と共に種々の細胞系をインキュベートした。3時間後、細胞及び培地を収集し、そして遠心分離した。次いで、酢酸2%を含有するクロロホルム-メタノール(1:1、容量比)で細胞を抽出し、そして等しい容量のクロロホルム-メタノール(1:1、容量比)で培地を振盪した。遠心分離により相を分離し、そして下方のクロロホルム相を収集した。溶媒を蒸発させ、そして濃縮部分を用いて、薄層クロマトグラフィーシリカゲルプレート(ワットマン(Whatman)4865-821)にアブライした。

30

【0079】

以下のように、プレートを展開した：培地に対して：クロロホルム-メタノール-H<sub>2</sub>O(容量比で75:25:4)中で。細胞に対して：最初に、クロロホルム-メタノール(9:1)でプレートを展開し、次いで乾燥し、クロロホルム-メタノール:H<sub>2</sub>O(65:35:4)中で再度実施した。

40

【0080】

ボディピー-C3-セラミドの標準物質：マーカーとして、ボディピー-C3-グルコシルセラミド(Bod3-GC)及びボディピー-C3-スフィンゴミエリン(Bod3-SPM)を用いた。フジ(Fuji)FLA-2000スキャナーを用いて、各Bod3-SPM及びBod3-GCスポットの蛍光を定量した。

概して言えば、Bod3-SPMが細胞及び培地の両方に存在していたのに対して、Bod3-GCは実際には細胞中にのみ存在していたという結果が示された。

50

## 【0081】

表3に示すように、種々の濃度のAD-2646を用いたHL60細胞のインキュベーションは、IC50値約6 $\mu$ M(図3)で、Bod3-SPMの低減を生じ、一方、Bod3-GC低減のIC50は約12 $\mu$ M(図4)であった。

TSU-PR1前立腺癌細胞を用いて、スフィンゴリピド代謝へのAD-2646の効果をさらに調べた。結果は、Bod3-SPMの低減がIC50値約5 $\mu$ Mを有していることを示した(図5)。

## 【0082】

## 【表3】

## スフィンゴリピドの代謝への本発明の種々の化合物の効果

細胞系	化合物	Bod 3-SPM	Bod 3-GC
HL60	AD-2646	6 $\mu$ M	12 $\mu$ M
MCF-NCi	AD-2665	7 $\mu$ M	10 $\mu$ M
HL60	AD-2673	6 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M
HL60	AD-2672	4 $\mu$ M	10 $\mu$ M
HL60	AD-2665	4 $\mu$ M	5 $\mu$ M
HL60	AD-2687	4 $\mu$ M	12 $\mu$ M

## 【0083】

次に、Bod3-SPM及びBod3-GCの合成への種々の化合物の効果の比較を試験した。それぞれ5 $\mu$ M及び10 $\mu$ Mの、種々の化合物AD-2672、AD-2673及びAD-2674と共にHL60細胞をインキュベートした。

図6は、AD-2672がBod3-SPMの量を大きく低減させるがBod3-GCの量についてはそうでないことを示す蛍光像である。対照的に、AD-2673及びAD-2674は10 $\mu$ Mで、Bod3-SPMの低い阻害を示すが、Bod3-GCの量のはるかに大きな低減を示す。

## 【0084】

## 《スフィンゴリピドの代謝への細胞の薬物感受性の効果》

Bod-C3-セラミドと共に、乳癌細胞、MCF-NCi(薬物感受性)及びMCD-AdrR(アドリアマイシン耐性)を1時間、2時間、4時間及び8時間インキュベートし、そしてそれぞれの細胞及び培地中のBod-C3-SPM及びBod-C3-GCを定量した。薬物耐性細胞において、細胞中のBod-C3-SPM及びBod-C3-GCは、それぞれ、培地中の量の3~4倍及び6倍を超えていた。驚くべきことに、アドリアマイシン耐性細胞中の各値は、有意に異なっており、薬物耐性細胞培地中に分泌されたBod-C3-SPM並びにBod-C3-GCの量は、その薬物感受性相当物により分泌されたそれらの量より5~9倍まで高くなった。

## 【0085】

## 《実施例6》

## 《スフィンゴミエリナーゼへのAD-2144の阻害効果》

N-ヘキシル-スフィンゴシルホスホリルコリン(AD-2144)を、酸性(すなわち、約pH5で至適の)スフィンゴミエリナーゼ又は中性(約pH7.4で至適pHの)スフィンゴミエリナーゼへのその阻害効果に関して試験した。この目的のために、酵素供給源として、HL60白血病細胞の超音波処理物(sonicate)を用いた。容量100 $\mu$ L中の蛍光性及び非蛍光性のスフィンゴミエリン(ボディピー-C12-SPM:SPM, 1:19)、緩衝液及び0.25%トリトン-X100の混合物により、増加する濃度のAD-2144を分散させた。酸性スフィンゴミエリナーゼに対して、0.4M酢

10

20

30

40

50

酸緩衝液 (pH 5.0) を用い; 中性スフィンゴミエリナーゼに対して、0.2 M トリス緩衝液 (pH 7.4) 及び 5 mM 塩化マグネシウムを用いた。これらの分散液 100  $\mu$ L に対して、HL 60 細胞超音波処理物 100  $\mu$ L を添加した。インキュベーションを 2 ~ 3 時間行った後、クロロホルム:メタノール (2:1) 0.8 mL を添加し、攪拌し、そして下方のクロロホルム相を収集し、乾燥し、そして薄層クロマトグラフィープレートにアプライした。クロロホルム及びメタノール (87:3) の混合物中でプレートを展開した。その生成物、すなわち、ボディピー-C12-セラミドの蛍光を定量した。

【0086】

酸性スフィンゴミエリナーゼ並びに中性スフィンゴミエリナーゼについて: 300  $\mu$ M の AD-2144 で、ボディピー-C12-セラミドにおいて 60% を超える量の低減があった。表 4 は、AD-2144 化合物によるボディピー-C12-セラミドの低減を示している。

10

【0087】

【表 4】

#### AD-2144 はボディピー-C12-セラミドの低減を引き起こす

AD-2144 濃度	ボディピー-C12-セラミド における低減%
50 $\mu$ l	30
100 $\mu$ l	44
150 $\mu$ l	65
300 $\mu$ l	82

20

【0088】

《実施例 7》

《AD-2646 のインビボ毒性》

前記実施例に示したように、AD-2646 化合物は、アポトーシスを起こす機構を誘導することによる有意な特異的細胞死亡率を示す。このアポトーシス現象は、おそらく、スフィンゴリピド代謝の阻害により媒介されるものであろう。特異的な抗増殖性薬剤としての前記化合物の潜在的用途を評価するために、インビボ毒性試験をマウスで実施した。

30

【0089】

各群 5 匹のスイスマウスの 6 群に、それぞれ容量 100  $\mu$ L 中の種々の濃度の AD-2646 の溶液を腹腔内に注射した。1 日目、2 日目、3 日目及び 4 日目に注射を実施し、そしてマウスの生存率を試験した (表 5)。

表 5 に示すように、極めての高濃度の AD-2646 のみが毒性であった。

【表 5】

## AD-2646 生存性試験

AD-2646 濃度	各日のマウスの数					
	1	2	3	4	5	6
0	5	5	5	5	5	5
1mg/kg	5	5	5	5	5	5
5mg/kg	5	5	5	5	5	5
10mg/kg	5	5	5	5	5	5
25mg/kg	5	5	5	5	5	5
50mg/kg	5	5	4	3	2	1

10

【0090】

《実施例8》

2倍に連続希釈した0及び増加する濃度の(2S, 3R) - 2N - アミノヘキシル - 1 - (4 - N - ヘキシルアミノフェニル) - 1, 3 - プロパンジオール(AD - 2663)を含有する96ウェルプレート中の培地100 $\mu$ L(20%FSC、1%ペニシリン及び1%ストレプトマイシンを補充したRPMI1640培養基)に、各容量100 $\mu$ L中の $2 \times 10^5$ 個のリーシュマニア・メジャー・プロマスティゴート(Leishmania major promastigote)細胞を添加した。インキュベーション(3時間、27 $^{\circ}$ C)後、顕微鏡下にニューランダー(Neulander)セルカウンターで各ウェルからのアリコートについて計数することにより細胞数を測定した。細胞低減のIC50は7 $\mu$ Mであった。

20

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】細胞生存性へのAD - 2646の効果を示すものである。

【図2】TSU - PR細胞へのAD - 2646の細胞毒性効果を示すものである。

30

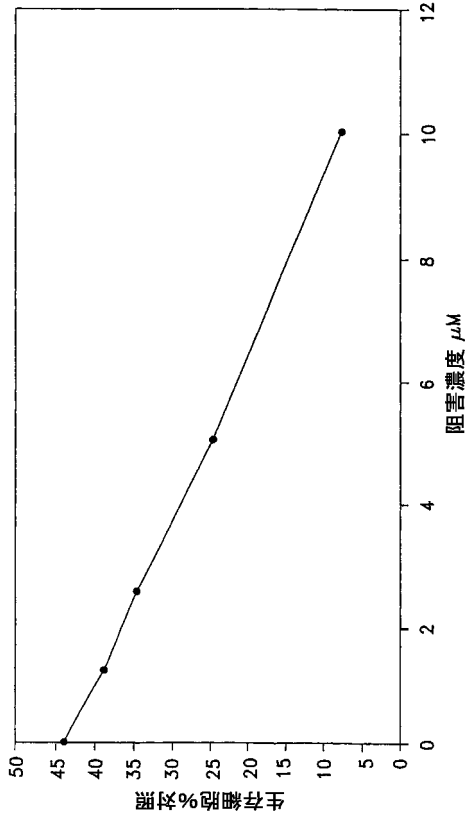
【図3】スフィンゴリピド代謝へのAD - 2646の効果(SPM)を示すものである。

【図4】スフィンゴリピド代謝へのAD - 2646の効果(GC)を示すものである。

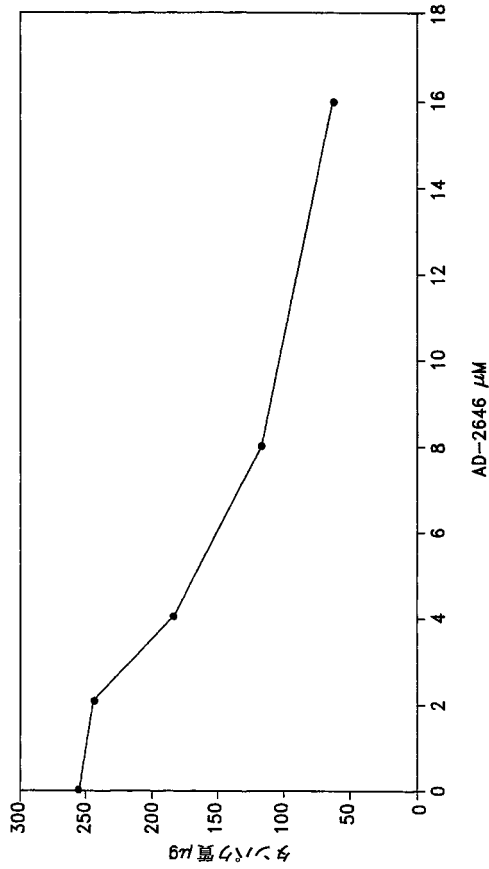
【図5】AD - 2646がTSU - PR1細胞におけるSPM合成を阻害することを示すものである。

【図6】本発明の化合物によるスフィンゴリピド代謝の阻害を示すものである。

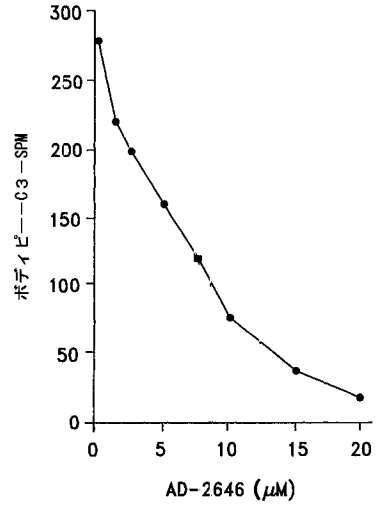
【 図 1 】



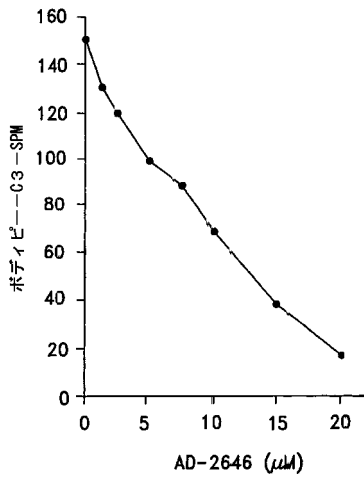
【 図 2 】



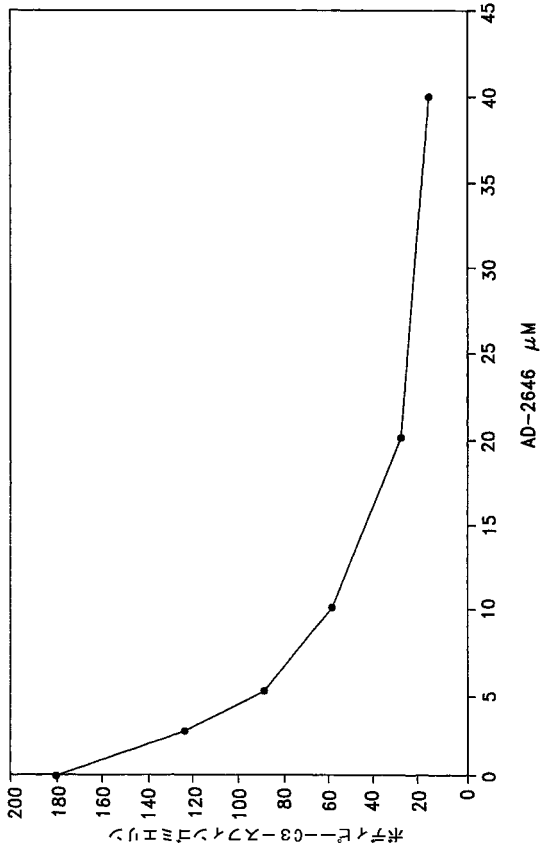
【 図 3 】



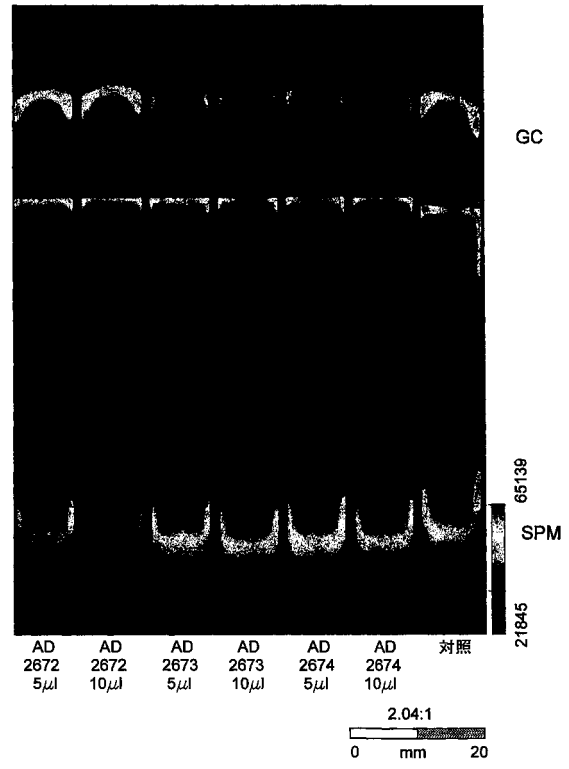
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 April 2003 (03.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 03/027058 A1**

- (51) International Patent Classification: C07C 215/68, 215/24, 215/28, 233/43, C07F 9/113, C07C 31/04, A61P 35/00, A61K 31/135, 31/165, 31/66
- (52) International Application Number: PCT/IL.01/00909
- (22) International Filing Date:  
26 September 2001 (26.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant (for all designated States except US): YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM [IL/IL]; HI Tech Park, The Hebrew University of Jerusalem, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram P.O. Box 39135, Jerusalem 91390 (IL).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): DAGAN, Arieh [IL/IL]; Harlap Street 13, 92341 Jerusalem (IL). GATT, Shimon [IL/IL]; Bartenura Street 11, 92104 Jerusalem (IL).
- (74) Agents: LUZZATTO, Kfir et al.; Luzzatto & Luzzatto, P.O. Box 5352, 84152 Beer-Sheva (IL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/027058 A1

(54) Title: SPIINGOLIPIDS

(57) Abstract: The invention relates to compounds of the general formula (I), as defined, and to pharmaceutical compositions containing them. The compounds of formula (I) are inhibitors of various lipid-related enzymes. They can be used in reducing accumulation of sphingolipids and thus in the treatment of lipid storage diseases. The compounds of formula (I) can also be used for the treatment of cancerous diseases and for killing of wild type and drug-resistant cancer cells.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

## SPHINGOLIPIDS

## Background of the Invention

Sphingolipids (SL) comprise a group of lipids having ceramide, *i.e.*, *N*-acylsphingosine as the basic group. There are two main types of SL, phosphoSL and glycoSL. While the former have one main component, *i.e.*, sphingomyelin (ceramide-phosphorylcholine), the glycosphingolipids comprise a wide group. They range from monohexosylceramides (ceramide  $\beta$ -glucose and ceramide  $\beta$ -galactose), through oligohexosyl ceramide (e.g., di- and trihexosyl ceramides) to a large number of gangliosides composed of oligohexosyl ceramides to which sialic acid is also linked. SLs are present in practically every cell type and tissue and particularly abound in the nervous system. The relative composition of the SL may change with age; thus, it has been shown that the ratio of sphingomyelin to lecithin increases with age.

Glycosphingolipids have a high binding potential and act as specific receptors for a number of external agents, e.g., lectins, toxins, hormones and viruses. To exemplify: *vibrio cholerae* toxin links to GM1-ganglioside and *Shigella dysenteriae* verotoxins to globotriaosyl ceramide.

During the past decade there has been an enormous increase in research on sphingolipids due to discoveries that implicated members of this group in signal transduction processes [recently reviewed in Levade *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 1-17 (1999); Mathias *et al.*, *Biochem. J.* 335, 465-480 (1998); Perry *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 233-243 (1998); Riboni *et al.*, *Prog. Lipid Res.* 36, 153-195 (1997)]. The most studied compound was ceramide which was shown to play a role in the regulation of key processes such as growth inhibition, differentiation and apoptosis [Hannun *et al.*,

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

*Biochim. Biophys. Acta* 1154, 223-236; Hannun *et al.*, *Trends Cell Biol.* 10, 73-80 (2001); Higgins *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 17, 18-21 (1992)]. SPM is generally considered as the primary metabolic source of ceramide whose generation in a particular location in the cell, (e.g., the membrane) makes it suitable for mediating cellular signaling processes. An increased *de novo* synthesis of ceramide has also been described as a potential source for signaling [Bose *et al.*, *Cell* 82, 405-414, (1995)]. Therefore, a major effort has been directed to modulate the generation of intracellular ceramide by sphingomyelinases, mostly the neutral, membrane-bound enzyme, although the acidic enzyme has also been implicated. Nevertheless, it should be emphasized that modification of the biosynthetic mechanisms such as reduction of the conversion of ceramide to SPM or glycolipids and, in parallel, its hydrolysis by ceramidases would also increase its concentration in the cell.

The role of sphingolipids in signal transduction [reviewed in L. Riboni *et al.*, *Prog. Lipid Res.* 36, 153-195 (1997) and A. Gomez-Munoz, *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 32-109 (1998)] have been extensively studied, and was proposed to operate through the "sphingomyelin cycle". According to this hypothesis, binding a particular extracellular ligand to its receptor activates a plasma membrane-bound sphingomyelinase, giving rise to ceramide, which acts as a mediator of the intracellular effects of the ligand. Numerous publications describe and emphasize the role of ceramide in cell killing by apoptosis as well as its effect on important cellular events such as proliferation, differentiation and reaction to stress conditions. Of particular interest are also reports that short chain, cell-permeable (e.g., C<sub>2</sub> or C<sub>6</sub>) ceramides evoke biological responses that lead to cell killing. Other studies, using the precursor of ceramide, *i.e.*, sphingosine have shown its effects on cell growth and viability. Furthermore, sphingosine was shown to inhibit protein kinase C and increase the intracellular concentration of calcium ions. The phosphorylated form of sphingosine, *i.e.*, sphingosine-1-phosphate has been shown to be a potent activator of phospholipase D. And di- or tri- methylated

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

sphingosine was shown to inhibit growth of cancer cells [Endo *et al.*, *Cancer Research* 51, 1613-1618, (1981)].

The involvement of ceramide and sphingolipid metabolism in cancer has been studied. It has been demonstrated that apoptosis induced by administration of a variety of chemotherapeutic agents is mediated by ceramide [Strum *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 15493-15497 (1994); Maurer *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1138-1146 (1999); Suzuki *et al.*, *Exp. Cell Res.* 233, 41-47 (1997)]. Anthracyclins (e.g., daunorubicin) have been shown to induce ceramide accumulation which subsequently led to death of cancer cells [Bose *et al.*, *Cell* 82, 405-414 (1995)]. The second line of study showed that drug-resistant cancer cells differ in their sphingolipid metabolism from drug-sensitive ones. Of special interest in this respect are studies of Cabot *et al.* [Lavie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271, 19530-19536 (1996)], who have demonstrated that glucosylceramide, a direct metabolic product of ceramide, was elevated in several drug-resistant cells overexpressing the P-glycoprotein pump (Pgp). Overexpression of the enzyme that synthesizes this glycolipid, *i.e.*, glucosylceramide synthetase (GCS), by a retroviral expression system resulted in conversion of doxorubicin-sensitive cells into resistant ones [Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 1140-1146 (1999)]. Conversely, inhibition of GCS expression, by antisense technology, resulted in increased sensitivity to doxorubicin. Cabot *et al.* have also proposed that drug-resistance modulators such as tamoxifen, verapamil and the cyclosporine analog, PSC 833, exert their effect by inhibition of GCS [Cabot *et al.*, *FEBS Letters* 394, 129-131 (1996), *FEBS Letters* 431, 185-199 (1998); Lavie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272, 1682-1687 (1999); Lucci *et al.*, *Cancer* 86, 300-311 (1999)], resulting in an increase of cellular ceramide. Nicholson *et al.* (*British J. Cancer* 81, 423-430 (1989)) have shown that an inhibitor of GCS, 1-phenyl-2-decanoyl-amino-3-morpholino-1-propanol, killed preferentially multidrug-resistant cells, compared to their drug-sensitive counterparts. Taken together, the above studies suggest a metabolic mechanism which in MDR-cells decrease their ceramide content by

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

converting it to glucosylceramide, making them resistant to a series of chemotherapeutic drugs.

Of special interest is the mechanism proposed for the anticancer drug hexadecylphosphocholine [HePC, Wieder *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273, 11025-11031, (1998)]. This is an antiproliferative drug, which is currently used for the treatment of extraneous metastases of mammary carcinoma and has been shown to induce apoptosis at a concentration of 25  $\mu$ M. The above publication provides support that HePC, which inhibits the biosynthesis of phosphatidylcholine exerts a secondary effect by decreasing the biosynthesis of sphingomyelin and consequently increasing the levels of ceramide and it is probably the latter that is responsible for the proapoptotic properties of HePC. And, indeed the authors showed that the PC-induced apoptosis was blocked by Fumonisin B1, an inhibitor of ceramide synthesis. And, short-chain, membrane-permeable ceramides additively increased the apoptotic effect of HePC.

Another major aspect of the metabolism of the sphingolipids is their accumulation in organs of patients afflicted with the genetic lipid storage diseases, such as Gaucher disease ( $\beta$ -glucosidase), Tay-Sachs disease ( $\beta$ -N-acetyl hexosaminidase); Niemann-Pick disease (acid sphingomyelinase), Krabbe disease ( $\beta$ -galactosidase), Metachromatic leukodystrophy (arylsulfatase A), Fabry disease (ceramidase) and Farber disease ( $\alpha$ -galactosidase). Each of these diseases is due to a mutation in a gene encoding a lysosomal sphingolipid hydrolase (shown in brackets). Consequently, the activity of the respective hydrolase is considerably reduced resulting in accumulation of the respective sphingolipid in the patients' organs.

Being a metabolic disorder, the metabolic defect and accumulation of the corresponding sphingolipid is a life-long phenomenon. Three forms of therapy are being used or considered. 1. Enzyme replacement therapy, in

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

which the enzyme involved is purified and infused into the patients for the rest of their lives; this approach is currently applied to patients with Gaucher disease, in which the patients are infused with  $\beta$ -glucosidase purified from human placentae or, alternatively, a recombinant form of the enzyme. 2. Gene therapy, in which a gene encoding the normal enzyme will be cloned and administered into the patients; this is currently in the stage of planning. 3. Infusion into the patient of an inhibitor of the biosynthesis of the sphingolipid accumulating in the disease, the aim being to reduce the quantity of the sphingolipid accumulating in the patients' organs. This approach is currently in clinical test, on Gaucher disease patients in several medical centers [Cox *et al.*, *The Lancet* 355, 1481-1485, (2000)].

Sphingolipids are of the general structure:



wherein  $R_1$  is  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14-22}$  and  $R_2$  may be a hydrogen atom, phosphorylcholine; glucose, galactose or an oligosaccharide.

Ceramide, in which  $R_2$  is hydrogen, the precursor of the sphingolipids, is a bioeffector molecule, affecting cell differentiation, apoptosis and growth suppression.

Several non-natural analogs of ceramide have been synthesized having a phenyl group instead of the  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}=\text{CH}$  residue.

For example, the compound PDMP  
Phenyl-CHOH-CH-CH<sub>2</sub>-morpholine

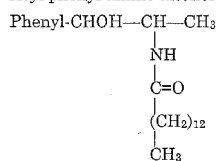


WO 03/027058

PCT/IL01/00909

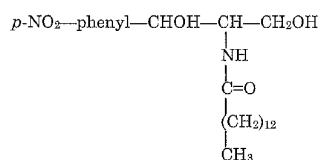
has been shown to be an inhibitor of glucosphingolipid [Vunnam & Radin  
*Chem. Phys. Lipid* 26, 265 (1980)].

Acyl phenyl amino alcohol (MAPP):



has been shown to inhibit ceramidase, resulting in an inhibition of cell  
growth [Bielawska *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271, 12646-12654 (1996)].

Esters of *p*-nitrophenyl-amino-propanediol:



have been shown to inhibit cell differentiation. [Bielawska *et al.*, *J. Biol.*  
*Chem.* 267, 18493-18497 (1992)].

Other non-natural derivatives of sphinglipids affect cell growth and  
differentiation. For example N,N,N-trimethyl sphingosine has been shown  
to inhibit cell growth [Endo *et al.*, *Cancer Research*, 51, 1613-1618 (1991)].  
C<sub>8</sub> ceramide in which the amide group was replaced by —NH—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>:  
CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>—CH=CH—CHOH—CHNH[(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>OH  
induced apoptosis [Karasavvas *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 236, 729-731 (1996)].

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Hexadecylphosphocholine induced a ceramide-mediated apoptosis [Wieder et al., *J. Biol. Chem.* 273, 11025-11031 (1998)].

It is an object of the present invention to provide novel therapeutic compounds that can modify the metabolism of sphingolipids.

It is a further object of this invention to provide novel therapeutic compounds that may be used for killing of unwanted cells.

These and other objects of the invention will become clearer as the description proceeds.

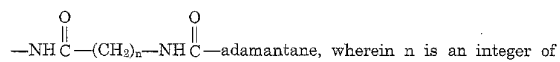
### Summary of the Invention

The invention relates to compounds of the general formula (I):



wherein

R represent a linear or branched, saturated, or unsaturated alkyl or alkenyl chain, which may optionally be substituted by hydroxyl,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ , wherein m is zero or an integer of from 1 to 20, phenyl, optionally substituted by nitro, amino, alkylamino, acylamino, -NHC(S)NH-alkyl, sulfonylamido-alkyl, a group



from 1 to 20, or a group -NH-adamantane, -NH-*t*-BOC, -NH-FMOC or NH-CBZ;

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

X represents hydrogen or the group  $-\text{OR}_4$  in which  $\text{R}_4$  is hydrogen or a linear or branched, saturated or unsaturated  $\text{C}_1\text{-C}_6$  alkyl or alkenyl chain which may be optionally substituted with hydroxy;

Y represents  $-\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}^x$  wherein  $\text{R}^x$  is hydrogen, a linear or branched alkyl or alkenyl chain which may be optionally substituted with

hydroxy, an amino protecting group,  $-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}_1$ ,  $-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{R}_1$ ,

$-\text{NH}(\text{SO}_2)\text{R}_1$ ,  $-\text{NR}_1\text{R}_2$ ,  $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , wherein  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  and  $\text{R}_3$ , which may be identical or different each represent  $\text{C}_{1-6}$ alkyl or  $\text{C}_{1-6}$ alkenyl, a group

$-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_n\text{-adamantane}$  wherein n is zero or an integer of from 1

to 20, a group  $-\text{NH}\text{-adamantane}$ , a group  $-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$

polymer, where "polymer" designates a natural or synthetic biocompatible polymer having a molecular weight between  $10^3$  and  $10^6$  daltons;

Z represents hydrogen,  $-\text{OH}$ , a mono- or disaccharide, a monosaccharide sulfate and choline phosphate;

with the proviso that

- Y cannot represent  $\text{NH}_2$  when R represents an alkyl, the group  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}-$ , phenyl or nitro phenyl; and

Y cannot represent the groups  $-\text{NR}_1\text{R}_2$  or  $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , or  $\text{NHR}_4$  where  $\text{R}_4$  represents octyl when  $\text{R}_1$  represents a methyl, R represents the group  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}-$  and Z represents  $-\text{OH}$ ;

and isomers and pharmaceutically acceptable salts thereof.

The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising as active ingredient a compound of formula (I) wherein the substituents are as

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

defined in claim1, and optionally further comprising pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant or diluent.

The pharmaceutical compositions of the invention may be used for reducing accumulation of sphinglipids, and thus for the treatment of lipid storage diseases such as Gaucher disease, Tay-Sachs disease, Niemann-Pick disease, Krabbe disease, Metachromatic leukodystrophy, Fabry disease and Farber disease.

The novel compounds of formula (I) may be used as inhibitors of acidic, neutral and alkaline sphingomyelinases, acidic, neutral and alkaline ceramidases,  $\alpha$ -galactosyl synthetase, ceramide synthetase, sphingomyelin synthetase and glycosceramides synthetase.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be used for the treatment of cancerous diseases, for killing of wild type and drug-resistant cancer cells.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be used for the treatment of parasitic, viral, bacterial, fungal and prion diseases.

In a further aspect the invention relates to a method of treating a lipid storage disease or a cancerous disease in a patient in need of such treatment comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of a compound of formula (I) or of pharmaceutical composition comprising the same.

#### **Brief Description of the Figures**

**Figure 1** – *Effect of AD-2646 on cell viability*

HL60 cell viability was tested in the presence of increasing concentrations of AD-2646.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Abbreviations: Via (viable), C (cells), Contr (control), Inhi (inhibitor), Conc (concentration).

**Figure 2 – AD-2646 cytotoxic effect on TSU-PR1 cells**

The cytotoxic effect of AD-2646 was examined using increasing concentrations of AD-2646 for two days. The total protein content was measured. Abbreviations: Prot (protein).

**Figure 3 – Effect of AD-2646 on sphingolipids metabolism (SPM)**

HL60 cells were incubated with increasing concentrations of AD-2646 for 3 hours in the presence of 2.5  $\mu$ M Bodipy-C3-ceramide. After extraction, the lipids were applied onto a thin layer chromatography plate, and the fluorescence of Bodipy-C3 - sphingomyelin (SPM) was quantified.

**Figure 4 – Effect of AD-2646 on sphingolipids metabolism (GC)**

HL60 cells were incubated with increasing concentrations of AD-2646 for 3 hours in the presence of 2.5  $\mu$ M Bodipy-C3-ceramide. After extraction, the lipids were applied on a thin layer chromatography plate, and the fluorescence of Bodipy-C3-cerebroside (GC) was quantified.

**Figure 5 – AD-2646 inhibits SPM synthesis in TSU-PR1 cells**

TSU-PR1 cells were incubated for 3 hours in the presence of increasing concentrations of AD-2646 and the fluorescence of Bodipy-C3 - sphingomyelin (SPM) was quantified.

**Figure 6 – Inhibition of sphingolipids metabolism by the compounds of the invention**

HL60 cells were incubated with the different compounds AD-2672, AD-2673 and AD-2674, each at 5 and 10  $\mu$ M. The effect of the different compounds on synthesis of Bod3-SPM and Bod3-GC was examined. The relative quantity

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

of the SPM and GC is shown in the fluorescent image of the plate  
Abbreviations: Cont (control).

#### Detailed Description of the Invention

In search for substances that could modify the metabolism of sphingolipids, the inventors have synthesized a range of new compounds, having the general formula (I):



Wherein

R represent a linear or branched, saturated, or unsaturated alkyl or alkenyl chain, which may optionally be substituted by hydroxyl,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ , wherein m is zero or an integer of from 1 to 20, phenyl, optionally substituted by nitro, amino, alkylamino, acylamino,  $-\text{NHC}(\text{S})\text{NH}$ -alkyl, sulfonylamidoalkyl,

a group  $-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{adamantane}$ , wherein n is an integer of

from 1 to 20, NH-adamantane, or a group  $-\text{NH}-t\text{-BOC}$ ,  $-\text{NH}-\text{FMOC}$ , or NH-CBZ;

X represents hydrogen or the group  $-\text{OR}_4$  in which  $\text{R}_4$  is hydrogen or a linear or branched, saturated or unsaturated  $\text{C}_1\text{-C}_6$  alkyl or alkenyl chain which may be optionally substituted with hydroxy;

Y represents  $-\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}^x$  wherein  $\text{R}^x$  is hydrogen, a linear or branched alkyl or alkenyl chain which may be optionally substituted with

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

hydroxy, an amino protecting group,  $-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}_1$ ,  $-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{R}_1$ ,

$-\text{NH}(\text{SO}_2)\text{R}_1$ ,  $-\text{NR}_1\text{R}_2$ ,  $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , wherein  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  and  $\text{R}_3$ , which may be identical or different each represent  $\text{C}_{1-6}$ alkyl or  $\text{C}_{1-6}$ alkenyl, a group

$-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_n-\text{adamantane}$  wherein  $n$  is zero or an integer of from 1

to 20, a group  $-\text{NH}-\text{adamantane}$ , a group

$-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{polymer}$ , where "polymer" designates a natural

or synthetic biocompatible polymer having a molecular weight between  $10^3$  and  $10^6$  daltons;

$Z$  represents hydrogen,  $-\text{OH}$ , a mono- or disaccharide, a monosaccharide sulfate and choline phosphate;

with the proviso that

-  $Y$  cannot represent  $\text{NH}_2$  when  $R$  represents an alkyl or alkenyl chain, the group  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}-$ , phenyl or nitro phenyl; and

-  $Y$  cannot represent the groups  $-\text{NR}_1\text{R}_2$  or  $-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , or  $\text{NHR}_4$  where  $\text{R}_4$  represents octyl when  $\text{R}_1$  represents methyl,  $R$  represents the group  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}-$  and  $Z$  represents  $-\text{OH}$ ; and isomers and pharmaceutically acceptable salts thereof.

Preferred compounds of formula (I) are those in which  $R$  designates aminophenyl or nitrophenyl.

Also preferred are compounds of formula (I) in which  $Y$  represents  $-\text{NH}_2$  or  $-\text{NHR}^x$ , particularly compounds in which  $\text{R}^x$  designates an alkyl chain.

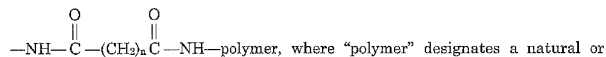
WO 03/027058

PCT/IL01/00909

The amino protecting groups may be any suitable amino protecting groups as known to the man of skill in the art, particularly BOC (tertiary. butyloxy carbonyl), Fmoc (fluorenylmethoxycarbonyl) or CBZ (benzyloxycarbonyl).

Some specific particularly preferred compounds are listed hereunder. It is to be noted that the length of the alkyl or alkenyl chains may be varied. Compounds containing an adamantyl moiety may be advantageous, as due to the size and configuration of this group the compound may be arrested in the cell membrane, and influence enzymes within this membrane.

Other preferred compounds may be those in which Y represents a group

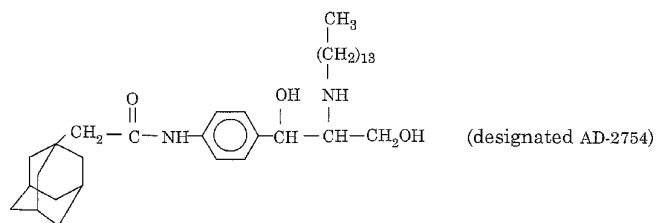
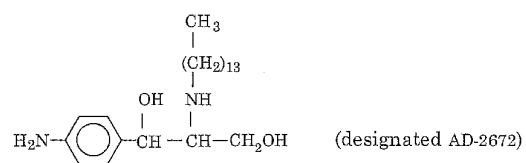
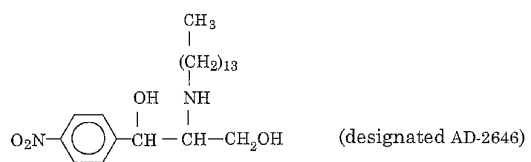
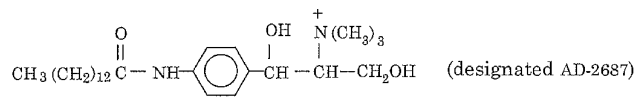
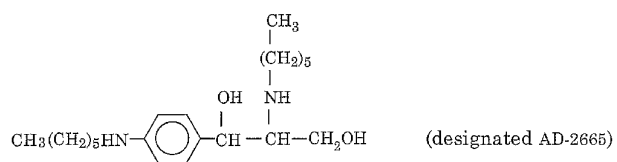


synthetic biocompatible polymer having a molecular weight of  $10^3$ - $10^6$ , like heparin, hyaluronic acid, dextran, carboxymethylcellulose, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, polyethyleneglycol, peptides or proteins. Such polymeric compounds of the invention are unable to penetrate the cell membrane and enter the cells, and will thus enable inhibition only at the outer cell membrane or extracellular surroundings.

Some specific preferred compounds are the following:

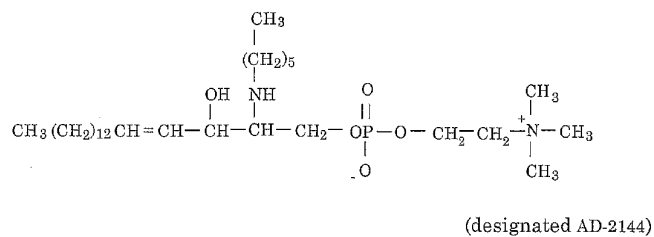
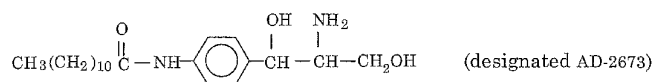
WO 03/027058

PCT/IL01/00909



WO 03/027058

PCT/IL01/00909



As shown in the following Examples, the novel synthetic compounds of the invention are capable of inhibiting degradation as well as biosynthesis of sphingolipids. As such, these compounds may be used in the treatment of lipidoses, particularly genetic lipid storage diseases in which sphingolipids accumulate in organs of afflicted patients, such as Gaucher disease, Tay-Sachs disease, Niemann-Pick disease, Krabbe disease, Metachromatic leukodystrophy, Fabry disease and Farber disease. Pharmaceutical compositions for the treatment of lipid storage diseases are also within scope of the present invention.

Use of the compounds of the invention has also resulted in killing of a variety of cells, including drug-sensitive and drug-resistant cells, alone or in combination with other anti-cancer drugs. The invention thus also relates to pharmaceutical compositions for the treatment of cancerous diseases,

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

comprising as active ingredients the compounds of the invention, optionally in combination with at least one other anti-cancer drug.

Still further, the compounds of the invention may be used in the treatment of parasitic diseases such as malaria and leishmania. Pharmaceutical compositions for the treatment of such parasitic diseases are also within scope of the present invention.

The compounds of the invention are generally provided in the form of pharmaceutical compositions. Said compositions are for use by injection or by oral uptake.

The pharmaceutical compositions of the invention generally comprise a buffering agent, an agent which adjusts the osmolarity thereof, and optionally, one or more carriers, excipients and/or additives as known in the art, e.g., for the purposes of adding flavors, colors, lubrication, or the like to the pharmaceutical composition.

Each carrier should be both pharmaceutically and physiologically acceptable in the sense of being compatible with the other ingredients and not injurious to the subject to be treated. While formulations include those suitable for rectal, nasal, preferred formulations are intended for oral or parenteral administration, including intramuscular, intradermal, subcutaneous and specifically intravenous administration. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any methods known in the art of pharmacy.

Carriers may include starch and derivatives thereof, cellulose and derivatives thereof, e.g., microcrystalline cellulose, xanthan gum, and the like. Lubricants may include hydrogenated castor oil and the like.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

A preferred buffering agent is phosphate-buffered saline solution (PBS), which solution is also adjusted for osmolarity.

As used herein "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic composition is contemplated.

A preferred pharmaceutical formulation is preferably used for administration by injection, including intravenous injection.

The compositions of the invention may be administered in a variety of ways. By way of non-limiting example, the composition may be delivered by injection intravenously, intramuscularly, or intraperitoneally. Intravenous administration, for example, is advantageous.

The pharmaceutical forms suitable for injection use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above.

In the case of sterile powders for the preparation of the sterile injectable solutions, the preferred method of preparation are vacuum-drying and freeze drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

For oral administration, the composition of the invention may be mixed with nutritive feed material or water supplies for the subject to be treated. It is contemplated however that the effective composition can either be mixed with the nutritive feed material or water or fed to the subject separately.

The preparation of pharmaceutical compositions is well known in the art and has been described in many articles and textbooks, see e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A.R. ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1990, and especially pages 1521-1712 therein.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Additives may also be designed to enhance uptake of the active agent across cell membranes. Such agents are generally agents that will enhance cellular uptake of the molecules of the invention. For example, the compounds of the invention may be enclosed within liposomes. The preparation and use of liposomes, e.g., using particular transfection reagents, is well known in the art. Other methods of obtaining liposomes include the use of Sendai virus or of other viruses.

The above-mentioned lipid agents may also improve the stability of the active compounds that have been taken up by the cell.

The dose of the active agent may vary. The dose would generally depend on the disease, the state of the disease, age, weight and sex of the patient, and is to be determined by the attending physician.

The invention also relates to a method for the treatment or prevention of a lipid storage disease, a cancerous disease or a parasitic disease, comprising administering a compound or a pharmaceutical composition of the invention or of any of the preferred embodiments thereof, to a patient in need thereof.

A number of methods of the art of molecular biology are not detailed herein, as they are well known to the person of skill in the art. Such methods include site-directed mutagenesis, PCR cloning, expression of cDNAs, analysis of recombinant proteins or peptides, transformation of bacterial and yeast cells, transfection of mammalian cells, and the like. Textbooks describing such methods are e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0879693096, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, by F. M. Ausubel, ISBN: 047150338X, John Wiley & Sons, Inc. 1988, and *Short Protocols in Molecular Biology*, by F. M. Ausubel *et al.* (eds.) 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & Sons; ISBN: 0471137812, 1995. These publications are incorporated herein in their entirety by reference. Furthermore, a number of immunological

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

techniques are not in each instance described herein in detail, as they are well known to the person of skill in the art. See e.g., Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.* (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Throughout this specification and the claims which follow, unless the context requires otherwise, the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated integer or step or group of integers or steps but not the exclusion of any other integer or step or group of integers or steps.

It must be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise.

Disclosed and described, it is to be understood that this invention is not limited to the particular examples, process steps, and materials disclosed herein as such process steps and materials may vary somewhat. It is also to be understood that the terminology used herein is used for the purpose of describing particular embodiments only and not intended to be limiting since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims and equivalents thereof.

The following examples are thus only representative of techniques employed by the inventors in carrying out aspects of the present invention. It should be appreciated that while these techniques are exemplary of preferred embodiments for the practice of the invention, those of skill in the art, in light of the present disclosure, will recognize that numerous modifications can be made without departing from the spirit and intended scope of the invention.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

**Examples****Experimental procedures***Cell lines*

HL60:	Human leukemia cell line (ATCC CCL-240).
TSU-PR1:	Prostate cancer cells (available at the ATCC).
MCF7-AdrR:	Human breast cancer cells, drug resistant (available at the ATCC).
MCF7-NCI:	Human breast cancer cells, drug sensitive (available at the ATCC).
U937:	Myeloid Leukemic cells (available at the ATCC).

**Example 1***Synthesis of Compounds***1. Preparation of (2R,3R)-2-(N-hexylamine)-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol (AD-2593)**

2 gr (2R,3R)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol were dissolved in 50 ml methanol in a round bottom flask. To the magnetically-stirred solution were added 5 ml of 0.1 N HCl, followed by 2 gr of hexylaldehyde (hexanal). The mixture was stirred for 30 min, after which 1 gr of NaBH<sub>4</sub> was added in several portions during 3 hours. The mixture was left to stir overnight, the solution was transferred to a separatory funnel, 100 ml of H<sub>2</sub>O and 100 ml dichloromethane were added and the solvent mixture was shaken. The lower phase was collected, the aqueous-methanol phase was extracted twice with 50 ml 3:1 dichloromethane:methanol, the 3 lower phases were combined and shaken with 75 ml H<sub>2</sub>O. The organic phase was dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in a small volume of dichloromethane: methanol, 1:1, and loaded onto a 50 × 2 cm silica gel column. The compound was eluted with

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

dichloromethane containing increased amounts of methanol. Yield: 1.2 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 296.

2. *Preparation of (2S,3R)-2-amino-1-(4-aminophenyl)-1,3-propanediol (AD-2516)*

5 gr (2S,3R)-2-amino-1-(4-aminophenyl)-1,3-propanediol were dissolved in 150 ml methanol, 100 mg 10% Pd/C were added and the solution was hydrogenated for 6 h at 50 Psi in a hydrogenator at room temperature. The catalyst was removed by filtration and the solution was evaporated to dryness. The dry compound was used for synthesis without further purification. Yield: 5 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 183.

3. *Preparation of (2S,3S)-2-(N-octylamine)-1-(4-N-octylaminophenyl)-1,3-propanediol (AD-2670)*

3 gr (2S,3S)-2-amino-1-(4-aminophenyl)-1,3-propanediol (prepared as in AD-2516) were dissolved in 100 ml methanol:water 1:1 in a round bottom flask. The solution was magnetically stirred and 1 ml octyl aldehyde (octanal) was added followed by 1 ml acetic acid. The solution was stirred for 15 min and 1 gr of sodium cyanoborohydride NaCNBH<sub>3</sub> was added in portions during 2 hours. The solution was stirred for another 3 h, then transferred to a separatory funnel and 100 ml water, and 50 ml dichloromethane and 25 ml methanol were added. Following shaking, the lower phase was collected and the upper, aqueous-methanolic phase was extracted twice with 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 3:1. The combined organic phases were washed with 100 ml H<sub>2</sub>O, dried for 2 hours over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in minimal amount of dichloromethane methanol, 1:1, and loaded onto a 2 × 50 cm silica gel. The column was eluted with increasing amounts of methanol in dichloromethane. Yield: 2.1 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 407.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

4. *Preparation of (2R,3R)-2-BOC amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol (AD-2502)*

8 gr (2R,3R)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol were dissolved in 100 ml dichloromethane:methanol, 2:1, and 6 gr of BOC anhydride, dissolved in 50 ml of the same solvent mixture were added. The solution was introduced into 250 ml Erlenmeyer and stirred for 30 min, when it became clear. Then left to stir for another 12 h. The solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 100 ml water and 80 ml isopropanol, then transferred into a separatory funnel and washed with 100 ml heptane. The heptane phase was removed and another amount of 60 ml heptane was added. The phases were mixed and the heptane phase removed. The water phase was extracted with 100 ml dichloromethane. The dichloromethane phase was dried on 5 gr MgSO<sub>4</sub> during 2 hours, then filtered and evaporated to dryness. The compound was used without further purification; Yield: 8 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 313.

5. *Preparation of (2R,3S)-2-BOC-amino-1-(4-N-hexadecanoyl-aminophenyl)-1,3-propanediol (AD-2522)*

BOC was linked to 4 gr 2R, 3S-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol as in the preparation of AD2502 (4). 2 grams of the BOC derivative were reduced by hydrogen as in AD2516 (2). 1 gr of the product, *i.e.*, the respective amino phenyl derivative, was reacted with 1 gr hexadecanoic acid in 50 ml dichloromethane:methanol, 2:1, by addition of 1 gr EDAC. The reaction mixture was stirred overnight, evaporated to dryness, the residue was dissolved in 4 ml dichloromethane-methanol, 1:1 and loaded onto a 50 × 1.5 cm silica gel column prepared in dichloromethane. The compound was eluted with mixtures of dichloromethane and increasing amounts of methanol. Overall yield: 4.5 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 521.

6. *Preparation of (2R,3R)-2-amino-1-(4-N-butyroylaminophenyl)-1,3-propanediol (AD-2602)*

2 gr of (2R,3R)-2-BOC-amino-1-(4-N-butyroylaminophenyl)-1,3-propanediol (prepared as in the preparation of compound AD-2522, using butyric acid instead of hexadecanoic acid), were dissolved in 10 ml trifluoroacetic acid (TFA):dichloromethane, 1:1. The mixture was transferred to a 20 ml screw-capped test tube and kept for 2 h at 37°C with occasional stirring, then evaporated to dryness in a rotavapor and the residue purified using a silica gel column eluted with dichloromethane and increasing amounts of methanol. Yield: 1.2 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 353.

7. *Preparation of 2-N,N,N-trimethylamino-1-(4-N-dodecanoylaminophenyl)-3-propanol (AD-2687)*

2 gr of 2-amino-1-(4-N-dodecanoylamino phenyl)-3-propanol was prepared as in the preparation of AD-2602 (6) from the corresponding starting material. The compound was dissolved in 20 ml of methanol in a screw-capped pressure glass tube. 4 ml CH<sub>3</sub>I were added followed by 1 gr of sodium carbonate. The pressure glass tube was sealed and immersed in a heating bath at 80°C for 12 h. The tube was cooled and opened. The solution was transferred to a round bottom flask and evaporated to dryness. The residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane:methanol, 1:1, loaded onto a silica gel column and eluted with solutions of dichloromethane and increasing methanol. Yield: 1.6 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 408.

8. *Preparation of sphingosyl-N-butyl sulfonamide (AD-2208-B)*

200 mg of sphingosine were dissolved in 10 ml dichloromethane:methanol, 2:1, in a 25 ml Erlenmeyer flask. 200 µl of butylsulfonylchloride were added and the solution was stirred for 10 min. 300 µl of triethylamine were then added in 50 µl portions during 1 h and the solution was stirred overnight. The solution was transferred to a 250 ml separatory funnel, a mixture of 50 ml dichloromethane, 15 ml methanol and 25 ml water were added and

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

the solution was shaken in the separatory funnel. The organic phase was washed with 25 ml of 0.1N HCl, then with water, and dried over MgSO<sub>4</sub>. It was filtered, evaporated to dryness, the residue was dissolved in 1 ml dichloromethane-methanol and loaded onto a small silica gel column. The product was eluted with increasing ratios of methanol in dichloromethane. Yield: 150 mg; M.S. main I<sup>+</sup> = 420.

**9. Preparation of sphingosylphosphorylcholine-N-ethyl thiourea (AD-2209)**

100 mg of sphingosylphosphorylcholine were dissolved in 10 ml methanol:water, 2:1, in a 25 ml Erlenmeyer flask. To the stirred solution were added 100 mg of tertiary butyl isothiocyanate. The solution was stirred for 10 min, then 2.5 ml of 1N sodium bicarbonate were added. The solution was left to stir for 48 hours, transferred to a separatory funnel and 80 ml dichloromethane, 30 ml methanol and 40 ml water were added. The organic phase was washed with 40 ml of water, then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness. The compound was purified by preparative TLC using dichloromethane:methanol:water, 65:35:5 for development. The silica spot containing the product was viewed by an ultraviolet lamp, scraped and eluted with dichloromethane: methanol:water, 1:2:1, in a small column. Yield: 80 mg; M.S. Na<sup>+</sup> = 574.

**10. Preparation of L-erythro sphingosyl-N-dodecyl (AD-2754)**

100 mg of synthetic L-erythro sphingosine was dissolved in 30 ml methanol in a 50 ml round bottom flask, equipped with a magnetic stirrer and a reflux condenser. 200 mg dodecyl bromide were added, followed by 300 mg sodium carbonate. The flask was heated in a water bath and the solution refluxed for 24 hours. The solution was transferred to a 250 ml separatory funnel, 50 ml dichloromethane and 30 ml water were added and the lower, organic phase was collected and washed with 25 ml of 0.5N HCl and then twice with 25 ml water. The organic phase was dried over 2 gr of MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 1 ml dichloromethane:

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

methanol, 1:1, loaded onto a small silica gel column and the product eluted with increasing ratios of methanol and dichloromethane. Yield: 70 mg; M.S. I<sup>+</sup> = 468.

11. *L-erythro sphingosyl phosphorylcholine-N-hexyl (AD-2144)*

100 mg of sphingosyl phosphorylcholine were dissolved in 25 ml methanol:water 1:1 in 100 ml Erlenmeyer flask. The solution was stirred on a magnetic stirrer and 100 mg hexanal and 250 µl acetic acid were added. The mixture was stirred for 20 min and 100 mg NaCNBH<sub>3</sub> was added. After overnight stirring at room temperature the solvents were evaporated to dryness and the residue was washed and purified as was done in preparation of AD-2209 (9). Yield: 65 mg; M.S. Na<sup>+</sup> = 562.

12. *D,L-1,3-dihydroxy-2-[amino(N-FMOCpropyl-3-amine)]-octadecane (AD-2751)*

300 mg of DL-1,3-dihydroxy-2-aminooctadecane were dissolved in 50 ml methanol:water 1:1. 100 mg FMOC β-alaninal (*N*-FMOC 3 aminopropanal) were added followed by 0.5 ml acetic acid. The solution was stirred during 20 min and 200 mg NaCNBH<sub>3</sub> were added in portions during 1 hour. The mixture was left to stir for 5 hours, evaporated to dryness, redissolved in a minimal amount of dichloromethane: methanol, 2:1, and purified by column chromatography on a silica gel column and with increasing ratios of methanol and dichloromethane. Yield: 200 mg; M.S. I<sup>+</sup> = 581.

13. *D,L-1,3-dihydroxy-2-[amino(3-aminopropyl)]-octadecane (AD-2752)*

50 mg D,L-1,3-dihydroxy-2-[amino(*N*-FMOC propyl-3-amine)] octadecane were dissolved in 4 ml methanol and 1 ml piperidine. The mixture was stirred for 30 min, then evaporated to dryness under a nitrogen stream. The product was purified using a preparative thin layer chromatography silica plate developed with a solution of dichloromethane:methanol:ammonium hydroxide:water, 80:20:1:1. The product (viewed with a UV-lamp) was

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

scraped and eluted from the silica gel in a small column using dichloromethane:methanol:water, 1:2:1. Yield 30mg M.S.  $I^+$  = 359.

14. *(2R, 3S)-2-BOC-amino-1-(4-N-(dodecanoyl-12-N-BOC-amine)-phenyl)-1,3-propanediol (AD-2620)*

BOC was linked to 3 gr (2R, 3S)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol as was done in the preparation of AD-2502 (4). Three grams of the BOC derivative were reduced by hydrogen as in the preparation of AD-2516 (2). Two grams of the product were reacted with 1 gr BOC 12 aminododecanoic acid in 50 ml dichloromethane:methanol 2:1 by addition of 500 mg EDAC. The mixture was stirred overnight, evaporated to dryness and purified as in the preparation of AD-2687 (7). Overall yield: 2.5 gr; M.S.  $I^+$  = 673.

15. *(2R,3R)-2-amino-1-(4-amino phenyl)-1,3-propanediol (AD-2516B)*

This compound was prepared by hydrogenation of 5 gr of (2R,3R)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol as was done in preparation of AD-2516 (2). Yield: 4.9 gr; M.S.  $I^+$  = 183.

16. *(2R,3R)-2-(N-hexylamine)-1-(4-N-hexylaminophenyl)-1,3-propanediol (AD-2665)*

1 gr of (2R,3R)-2-amino-1-(4-aminophenyl)-1,3-propanediol was reacted with 2 gr of hexanal as was done in the preparation of AD-2593 (1) and purified in a similar procedure. The compound was quantified in a spectrophotometer providing a peak at 255 nm and a molar extinction coefficient of 16.6 optical density units per  $\mu$ mole per ml. Yield: 800 mg; M.S.  $I^+$  = 351.

17. *(2R, 3R)-2-(N-tetradecylamine)-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol (AD-2646)*

3 gr of (2R, 3R)-2 amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol were dissolved in 100 ml ethanol, 4 ml tetradecyl bromide were added followed by 5 ml diisopropyl ethylamine. The mixture was heated to reflux during 24 h in a

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

250 ml round bottom flask equipped with a reflux condenser and stirred on a magnetic stirrer. The solution was evaporated to dryness and dissolved in 200 ml dichloromethane:methanol, 2:1, transferred to a 500 ml separatory funnel and washed with 75 ml 0.2N HCl. Phases were separated and the organic phase was washed again with 75 ml 0.1N HCl and 15 ml methanol. The organic phase was separated and dried on 5 gr magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was dissolved in minimal amount of warm ether and left to crystallize overnight at -20°C. Crystals were filtered at low temperature and recrystallized from hot ether containing 3% of H<sub>2</sub>O. Yield, 3.6 gr. This compound was quantified in a spectrophotometer providing a peak at 270 nm. Its molar extinction coefficient was 7.84 optical density units per micromole per ml. M.S. I<sup>+</sup> = 409.

NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 0.88, t(3H); 1.26, m (22H); 1.48, m (2H); 2.54, m (1H); 2.73, m (2H);

3.30, broad s (3H); 7.6, d (2H); 8.2, d (2H).

18. *(2R,3R)-2-(N-tetradecylamine)-1-(4-aminophenyl)-1,3-propanediol*  
(AD-2672)

2 gr of *(2R,3R)-2-(N-tetradecyl amine)-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol* (AD-2644) were hydrogenated as was done in the preparation of AD-2516 (2). The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel eluted with increasing concentrations of methanol in dichloromethane. Yield: 1.5 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 378.

19. *(2R, 3R)-2 amino-1-(N-dodecanoylaminophenyl)-1,3-propanediol*  
(AD-2673)

This compound was prepared from 2 gr of *(2R,3R)-2(N-tBOC amino)-1-(N-dodecanoylaminophenyl)-1,3-propanediol* (AD-2582) using the same protocol as in the preparation of AD-2602 (6). Overall Yield: 1.3 gr M.S. I<sup>+</sup> = 365.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

20. The 2S,3S counterpart was prepared by the same procedure and named AD-2674.

21. *(2R,3R)-2-(N,N,N-trimethylamine)-1-(N-tetradecanoyl-4-amino phenyl)-1,3-propanediol (AD-2687)*

This compound was prepared from 2 gr (2R,3R)-2-(N,N,N-trimethylamine)-1-(4-aminophenyl)-1,3-propanediol (AD 2671) prepared as in the preparation of AD-2516 (2) from 3 gr of (2R,3R)-2-(N,N,N-trimethylamine)-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol (AD-2667) prepared as in the preparation of AD-2687 (7) from 5 gr (2R,3R)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol. Yield: 2 gr; M.S. I<sup>+</sup> = 436.

22. *(2R,3R)-2-(N-tetradecylamine)-1-(4-adamantylacetamido-phenyl)-1,3-propanediol (AD-2754)*

100 mg of compound AD-2672 were reacted with 100 mg of 1-adamantane acetic in 10 ml dichloromethane-methanol, 1:1, by the addition of 100 mg EDC. The reaction mixture was stirred with a magnetic stirrer overnight. The solution was evaporated to dryness and the resulting oil was dissolved in a mixture of 1 ml of dichloromethane and 0.5 ml methanol. This solution was loaded onto a 25x1 cm silica gel column. The compound was eluted with dichloromethane containing increasing amounts of methanol. Yield: 90 mg. M.S. I<sup>+</sup> = 555.

**Example 2**

*Effect of compound AD 2646 on cell viability*

*Effect of AD-2646 on HL60 cells*

The effect of AD-2646 on cell viability was analyzed by measuring cell mortality (viable cell count) and/or total protein quantity.

HL60 cells grown in RPMI plus 10% fetal calf serum, were incubated with increasing concentrations of (2R,3R)-2-(N-tetradecylamine)-1-(4-nitro-

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

phenyl)-1,3-propanediol (AD-2646) in 6- or 24-well dishes. The compound was added as solutions in dimethylsulfoxide (DMSO), ensuring that the concentration of this solvent did not exceed 0.1% of the volume of the culture medium. After 2 days the cells were collected, washed twice with saline, treated with trypan blue and the number of living (non-blue) cells was counted. Fig. 1 indicates an IC<sub>50</sub> value of 5  $\mu$ M.

Kinetic of the observed killing effect of the AD-2646 compound was next examined. HL60 cells were incubated with 40  $\mu$ M of AD-2646 for 1, 3, 5 and 7 hours. Already after 1 hour a reduction of 60% of the viable cell number was observed.

The effect of the AD-2646 compound on cell viability was further supported when the total protein content was quantified. HL60 cells were incubated as described above, with different concentrations of AD-2646. After 2 days the cells were collected, washed twice with saline, dispersed and following a short pulsing with a probe-sonicator their protein content was quantified by the Bradford procedure. Similarly to the viable cell counting results, the protein measurements indicated an IC<sub>50</sub> value of 5  $\mu$ M.

To analyze whether the AD-2646 compound may mediate its effect on cell viability and on total protein content, in cooperation with other compounds, the cooperative effect of this compound and Taxol was next evaluated. HL60 cells were incubated for two days with 4  $\mu$ M AD2646 in the presence or absence of 2 ng Taxol. As shown in Table 1, cooperation of both compounds caused significant decrease in the total protein quantity indicating a synergism between the two respective compounds.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Table 1

Taxol	AD-2646	Protein content $\mu\text{g}$
+	-	206
-	+	174
+	+	93

*Effect of AD-2646 on different cell lines*

In order to evaluate the generality of AD-2646 compound effect on cell viability, other cell lines were subjected to the same procedures disclosed herein above.

TSU-PR1 cells (prostate cancer cells) were incubated for two days with increasing concentrations of AD-2646. The protein content measurements shown in Fig. 2 indicate that the cells were killed with an IC<sub>50</sub> of 6-7  $\mu\text{M}$ .

**Example 3***Effect of different compounds on cell viability*

The effect of different compounds of the invention on cell viability was next evaluated by measuring total cell protein quantity. Different cell lines were incubated for two days in the presence of increasing concentrations of the different compounds of the present invention. The results are summarized in Table 2.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

**Table 2**

Effect of different compounds on cell viability

Compound	Cell line	IC50
AD-2673	HL60	7.5 $\mu$ M
AD-2620	HL60	3 $\mu$ M
AD-2687	HL60	2 $\mu$ M
AD-2665	MCF7-AdrR	7 $\mu$ M
AD-2665	MCF7-NCI	3 $\mu$ M

**Example 4***The apoptotic effect of different compounds*

In order to examine whether the observed effect on cell viability involves induction of apoptosis, the apoptotic effect of several compounds of the invention was next examined.

Myeloid, leukemic U937 cells were incubated for 24 hours in the absence or in the presence of 5  $\mu$ M AD-2672 and AD-2665. Cells were then collected and the percent of apoptotic cells was determined using a kit quantifying the DEVDase, caspase 3 activity. The number of apoptotic cells incubated with AD-2672 exceeded 6-fold those in the control cells. Cells incubated with AD-2665 exceeded 2.8-fold those in the control cells.

The apoptotic effect of three different compounds was further examined on HL60 cells using a flow cytometry method. Cells were incubated with AD-2646, AD-2665 or AD-2687 at 3 and 24hr and increasing compound concentrations, collected and washed. Washed cells were then treated with 5% Triton and stained with propidium iodide 0.5% mg in 0.1% sodium citrate pH 7.4. Analysis was performed using a Becton Dickinson Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS).

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Results of incubation for 3 hours with low concentration of the AD-2646 compound (10  $\mu$ M) indicate 12% of apoptotic cells, at 20  $\mu$ M 18% of the cells were apoptotic, and at 40  $\mu$ M, 26% of the cells were apoptotic. Incubation for longer period (24 hours) revealed already at the lower concentration (10  $\mu$ M) about 50% apoptotic cells.

Similar treatment with AD-2665 for 3 hours showed that in the low concentration (10  $\mu$ M) about 8% of the cells were apoptotic, while at 20  $\mu$ M this value increased to 26%. After 24 hours of incubation at 10  $\mu$ M, 25% of the cells were already apoptotic.

When AD-2687 was used, after 3 hours of incubation at 15  $\mu$ M, only 9% of the cells were apoptotic, while after 24 hours of incubation at a low concentration (2.5  $\mu$ M), close to 50% of the cells were apoptotic.

Following a short (30 min) treatment with 40  $\mu$ M of AD-2646 or AD-2665, only 5% of the cells were apoptotic.

#### **Example 5**

##### ***The effect of different compounds on sphingolipid metabolism***

As described in the background of the invention, the effect of ceramide in apoptosis has been well established. Therefore, the possibility that the observed apoptotic effect of the different compounds of the invention may involve sphingolipids metabolism, was next examined.

In order to examine the effect of the different compounds on sphingolipids metabolism, different cell lines were incubated with increasing concentrations of different compounds of the invention in the presence of 2.5  $\mu$ M Bodipy-C3-ceramide that was added to the culture medium as a solution in dimethylsulfoxide (not exceeding 0.1% DMSO of the final

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

volium). After 3 hours, cells and medium were collected and centrifuged. Cells were next extracted with chloroform-methanol containing 2% acetic acid 1:1 (by volume) and the medium was shaken with an equal volume of chloroform-methanol, 1:1 (by volume). The phases were separated by centrifugation and the lower chloroform phase was collected. The solvents were evaporated and applied to thin layer chromatography silica gel plates (Whatman 4865-821) with a concentrating zone.

Plates were developed as follows: For medium: in chloroform-methanol-H<sub>2</sub>O, 75:25:4 by volume. For cells: plates were first developed with chloroform-methanol, 9:1, then dried and re-run in chloroform-methanol: H<sub>2</sub>O, 65:35:4.

Standards of Bodipy-C3-ceramide: Bodipy-C3-glucosylceramide (Bod3-GC) and Bodipy C3 sphingomyelin (Bod3-SPM) were used as markers. The fluorescence of the respective Bod3-SPM and Bod3-GC spots was quantified using a Fuji FLA-2000 scanner.

Generally, results indicated that Bod3-SPM was present both in the cells and medium, whereas Bod3-GC was present practically only in the cells.

As shown in Table 3, incubation of HL60 cells with different concentrations of AD-2646 resulted in reduction of the Bod3-SPM (cell + medium), with IC50 values of about 6  $\mu$ M (Fig. 3), while the IC50 for Bod3-GC reduction was about 12  $\mu$ M (Fig. 4).

The effect of AD-2646 on sphingolipid metabolism was further examined using TSU-PR1 prostate cancer cells. Results showed reduction of Bod3-SPM had IC50 values of about 5  $\mu$ M (Fig. 5).

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

**Table 3**  
*Effect of different compounds of the invention on metabolism of sphingolipids*

Cell line	Compound	Bod 3-SPM	Bod 3-GC
HL60	AD-2646	6 $\mu$ M	12 $\mu$ M
MCF-NCi	AD-2665	7 $\mu$ M	10 $\mu$ M
HL60	AD-2673	6 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M
HL60	AD-2672	4 $\mu$ M	10 $\mu$ M
HL60	AD-2665	4 $\mu$ M	5 $\mu$ M
HL60	AD-2687	4 $\mu$ M	12 $\mu$ M

Comparison of the effect of the different compounds on synthesis of Bod3-SPM and Bod3-GC was next examined. HL60 cells were incubated with the different compounds AD-2672, AD-2673 and AD-2674, each at 5 and 10  $\mu$ M.

Fig. 6 is a fluorescent image, indicating that AD-2672 strongly reduces the level of Bod3-SPM but not of Bod3-GC. In contrast, AD-2673 and AD-2674 at 10  $\mu$ M show a low inhibition of Bod3-SPM but a much stronger reduction of the level of Bod3-GC.

***Effect of drug sensitivity of cells on the metabolism of sphingolipids***

Breast cancer cells, MCF-NCi (drug-sensitive) and MCF-AdrR (Adriamycin-resistant) were incubated with Bod-C3-ceramide for 1,2,4 and 8 hours, and the Bod-C3-SPM and Bod-C3-GC in the respective cells and medium were quantified. In the drug-sensitive cells, the Bod-C3-SPM and Bod-C3-GC in the cells exceeded the quantity in the medium 3-4-fold and 6-fold, respectively. Surprisingly, the respective values in the adriamycin resistant

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

cells were significantly different, quantities of Bod-C8-SPM as well as Bod-C8-GC secreted into the drug-resistant cell medium were higher by 5-9-fold of those secreted by their drug-sensitive counterparts.

**Example 6*****Inhibitory effect of AD-2144 on sphingomyelinases***

*N*-hexyl-sphingosyl phosphorylcholine (AD-2144) was tested as to its inhibitory effect on sphingomyelinases, acidic (*i.e.*, with an optimum at about pH 5) or neutral (with a pH optimum at about pH 7.4). For this purpose a sonicate of HL60 leukemic cells was used as enzyme source. Increasing concentrations of AD-2144 were dispersed by a mixture of fluorescent and non-fluorescent sphingomyelin (Bodipy-C12-SPM:SPM, 1:19), buffer and 0.25% Triton-X100 in a volume of 100  $\mu$ l. For acid sphingomyelinase 0.4M acetate buffer pH 5.0 was used; for neutral sphingomyelinase 0.2M Tris buffer, pH 7.4 and 5 mM magnesium chloride. To 100  $\mu$ l of these dispersions, 100  $\mu$ l of HL60 cells sonicate were added. Incubation was 2-3 hours after which 0.8 ml of chloroform:methanol 2:1 were added, stirred and the lower, chloroform phase was collected, dried and applied to a thin layer chromatography plate. The plate was developed in a mixture of chloroform and methanol, 87:3. The fluorescence of the product, *i.e.*, Bodipy-C12-ceramide, was quantified.

For acid sphingomyelinase as well as for neutral sphingomyelinase: at 300  $\mu$ M of AD-2144 there was a reduction of over 60% in Bodipy-C12-ceramide. Table 4 shows reduction of the Bodipy-C12-ceramide by the AD-2144 compound.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Table 4

*AD-2144 causes reduction of Bodipy-C12-ceramide*

AD-2144 Concentration	% reduction in Bodipy-C12-ceramide
50µl	30
100µl	44
150µl	65
300µl	82

**Example 7***In vivo toxicity of AD-2646*

As shown in the previous Examples, the AD-2646 compound displays significant specific cell mortality by inducing apoptotic mechanism. This apoptotic phenomenon is probably mediated by inhibition of sphingolipids metabolism. In order to evaluate the potential use of such compound as specific anti-proliferative drug, an *in vivo* toxicity study was performed in mice.

Six groups, each of 5 Swiss mice were injected, intra-peritoneally with solutions of AD-2646, at varying concentrations, each in a volume of 100 µl. Injections were performed on days 1, 2, 3, 4, and mice viability was tested (Table 5).

As shown in Table 5, only a very high concentration of AD-2646 was toxic.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Table 5  
AD-2646 viability test

AD-2646 Concentration	No. of mice in each day					
	1	2	3	4	5	6
0	5	5	5	5	5	5
1mg/kg	5	5	5	5	5	5
5mg/kg	5	5	5	5	5	5
10mg/kg	5	5	5	5	5	5
25mg/kg	5	5	5	5	5	5
50mg/kg	5	5	4	3	2	1

#### Example 8

$2 \times 10^5$  *Leishmania major* promastigote cell, each in a volume of 100  $\mu$ l were added to 100  $\mu$ l medium (RPMI 1640 culture medium complemented with 20% FCS, 1% penicillin and 1% streptomycin) in 96-well plates containing zero and increasing concentrations of (2S,3R)-2-N-aminohexyl-1-(4-N-hexylaminophenyl)-1,3-propanediol (AD-2663) in 2-fold serial dilution. After incubation period (3 h, 27°C) the number of cells was determined by counting on aliquot from each well on a Neulander cell counter under a microscope. The IC50 for cell reduction was 7  $\mu$ M.

WO 03/027058

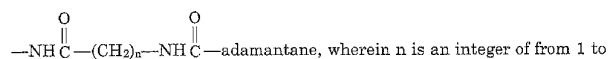
PCT/IL01/00909

## Claims:

1. Compounds of the general formula (I):



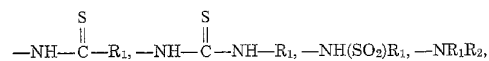
wherein R represent a linear or branched, saturated, or unsaturated alkyl or alkenyl chain, which may optionally be substituted by hydroxyl,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ , wherein m is zero or an integer of from 1 to 20, phenyl, optionally substituted by nitro, amino, alkylamino, acylamino, -NHC(S)NH-alkyl, sulfonylamido-alkyl, a group



20, or a group  $-\text{NH}-\text{adamantane}$ ,  $-\text{NH}-t\text{-BOC}$ ,  $-\text{NH}-\text{FMOC}$  or  $\text{NH}-\text{CBZ}$ ;

X represents hydrogen or the group  $-\text{OR}_4$  in which  $\text{R}_4$  is hydrogen or a linear or branched, saturated or unsaturated  $\text{C}_1\text{-C}_6$  alkyl or alkenyl chain which may be optionally substituted with hydroxy;

Y represents  $-\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}^*$  wherein  $\text{R}^*$  is hydrogen, a linear or branched alkyl or alkenyl chain which may be optionally substituted with hydroxy, an amino protecting group,

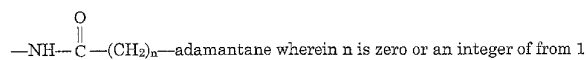


$-\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , wherein  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  and  $\text{R}_3$ , which may be identical or different each

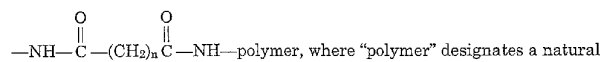
WO 03/027058

PCT/IL01/00909

represent C<sub>1-6</sub>alkyl or C<sub>1-6</sub>alkenyl, a group



to 20, a group —NH—adamantane, a group



or synthetic biocompatible polymer having a molecular weight between 10<sup>3</sup> and 10<sup>6</sup> daltons;

Z represents hydrogen, —OH, a mono- or disaccharide, a monosaccharide sulfate and choline phosphate;

with the proviso that

- Y cannot represent NH<sub>2</sub> when R represents an alkyl, the group CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH = CH—, phenyl or nitro phenyl; and Y cannot represent the groups —NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> or —N<sup>+</sup>R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, or NHR<sub>4</sub> where R<sub>4</sub> represents octyl when R<sub>1</sub> represents a methyl, R represents the group CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH = CH— and Z represents —OH; and isomers and pharmaceutically acceptable salts thereof.

2. A compound according to claim 1, wherein Y is —NH<sub>2</sub> or NHR<sup>x</sup>.
3. A compound according to claim 1 or claim 2, wherein R is nitrophenyl.
4. A compound according to any one of claims 1 or 2, wherein R is aminophenyl or alkylaminophenyl.
5. A compound according to any one of claims 1 to 4, wherein Z is —OH.

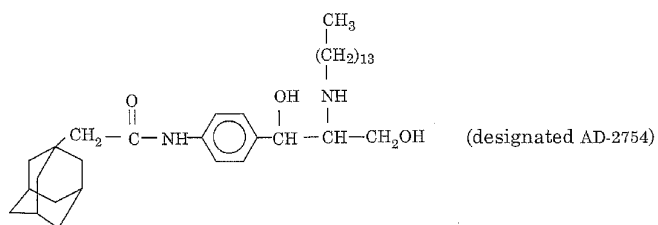
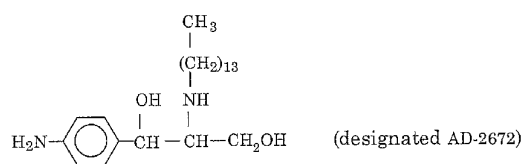
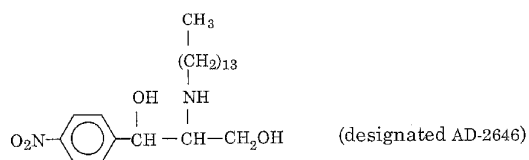
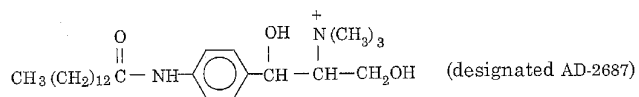
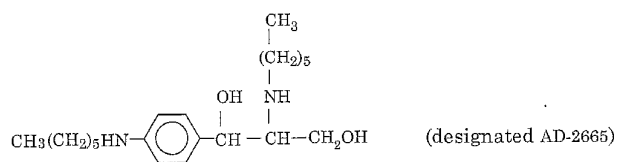
WO 03/027058

PCT/IL01/00909

6. A compound according to any one of the preceding claims wherein said amino protecting group is selected from tBOC, FMOC and CBZ.
7. A compound according to claim 1, being the compound:

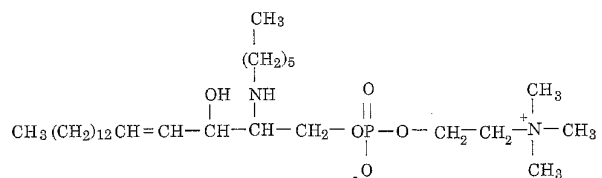
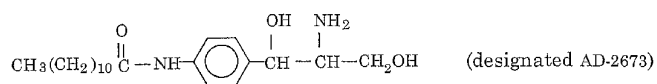
WO 03/027058

PCT/IL01/00909



WO 03/027058

PCT/IL01/00909



(designated AD-2144)

8. A pharmaceutical composition comprising as active ingredient a compound of formula (I) wherein the substituents are as defined in claim 1, and optionally further comprising pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant or diluent.

9. A pharmaceutical composition according to claim 8, for reducing accumulation of sphinglipids.

10. A pharmaceutical composition according to claim 9, for the treatment of a lipid storage disease.

11. A pharmaceutical composition according to claim 10, wherein said lipid storage disease is selected from Gaucher disease, Tay-Sachs disease, Niemann-Pick disease, Krabbe disease, Metachromatic leukodystrophy, Fabry disease and Farber disease.

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

12. Use of a compound of formula (I) wherein the substituents are as defined in claim 1 as an inhibitor of any one of acidic, neutral and alkaline sphingomyelinases, acidic, neutral and alkaline ceramidases,  $\alpha$ -galactosyl synthetase, ceramide synthetase, sphingomyelin synthetase and glycosphingolipid synthetase.
13. A pharmaceutical composition according to claim 8, for the treatment of cancerous diseases.
14. Use of a compound of formula (I) wherein the substituents are as defined in claim 1, for killing of wild type and drug-resistant cancer cells.
15. Use according to claim 14, for the selective killing of drug-resistant cancer cells.
16. A pharmaceutical composition according to claim 8, for the treatment of parasitic, viral, bacterial, fungal and prion diseases.
17. A pharmaceutical composition according to claim 16, wherein said parasitic disease is malaria or leishmania.
18. Use of a compound of formula (I) wherein the substituents are as defined in claim 1, as an antimalarial or antileishmanial agent.
19. A method of treating a lipid storage disease in a patient in need of such treatment comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of a compound of formula (I) wherein the substituents are as defined in claim 1 or of pharmaceutical composition comprising the same.
20. A method according to claim 19, wherein said lipid storage disease is selected from Gaucher disease, Tay-Sachs disease, Niemann-Pick disease,

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

Krabbe disease, Metachromatic leukodystrophy, Fabry disease and Farber disease.

21. A method of treating a cancerous disease in a patient in need of such treatment comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of a compound of formula (I) wherein the substituents are as defined in claim 1 or of pharmaceutical composition comprising the same.

1/5

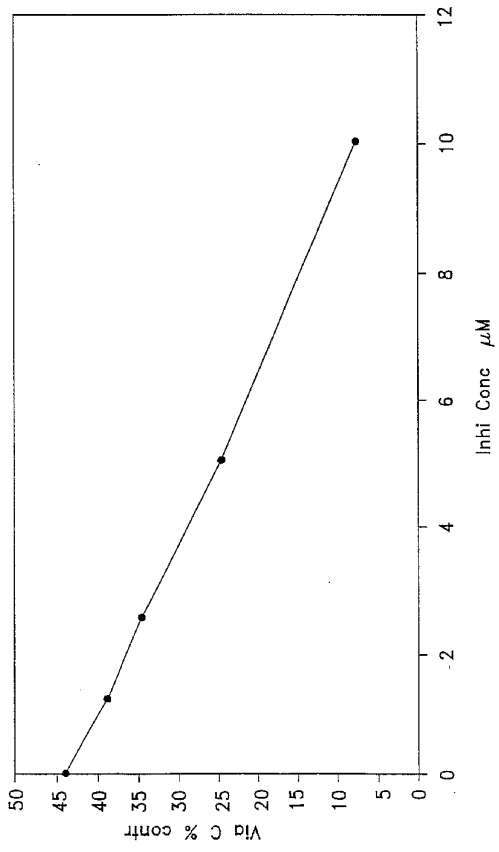


Fig. 1

2/5

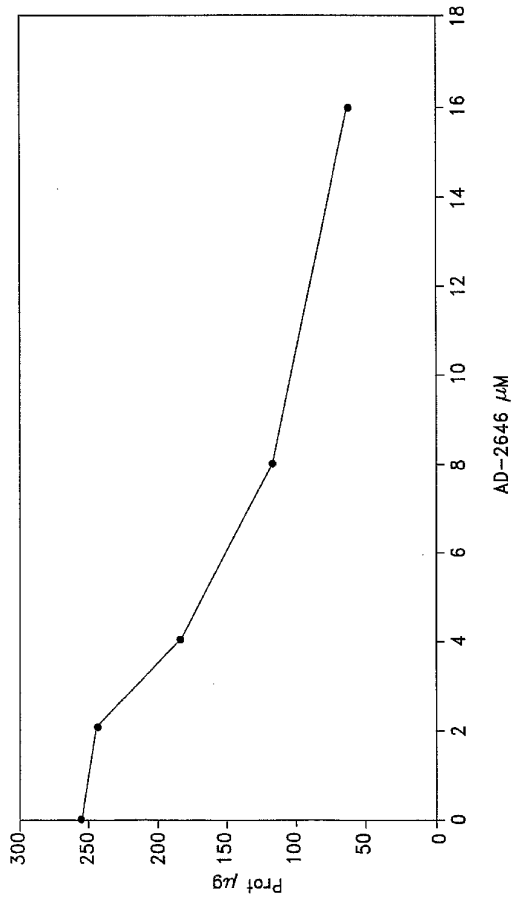


Fig. 2

3/5

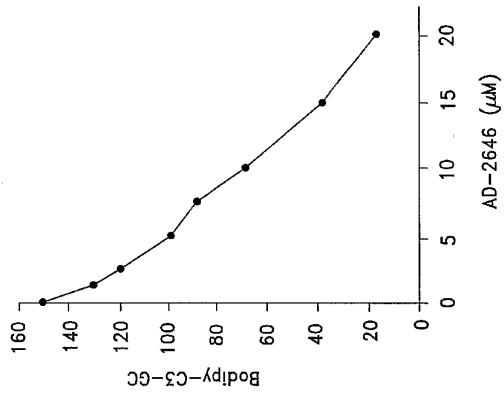


Fig. 4

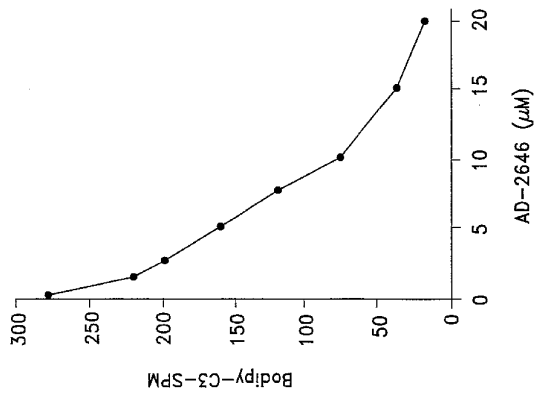


Fig. 3

4/5

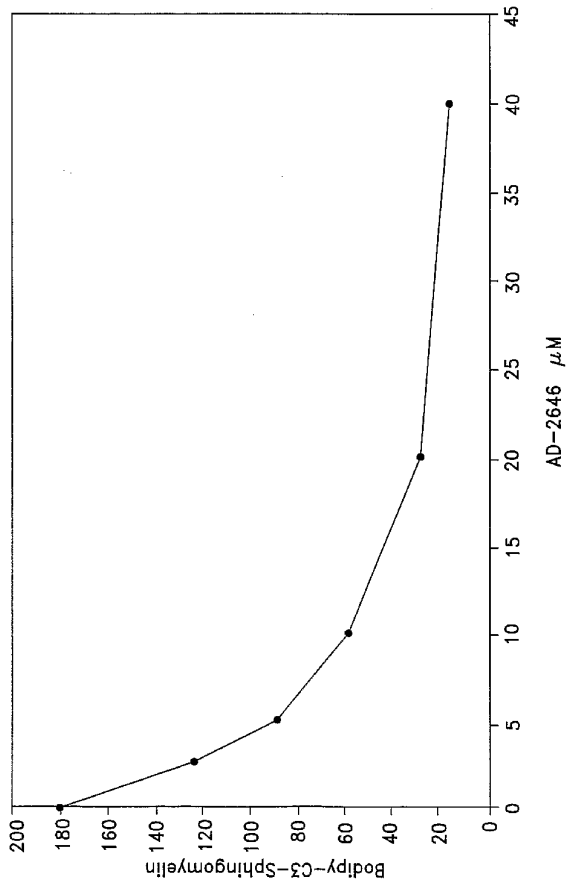


Fig. 5

WO 03/027058

PCT/IL01/00909

5/5

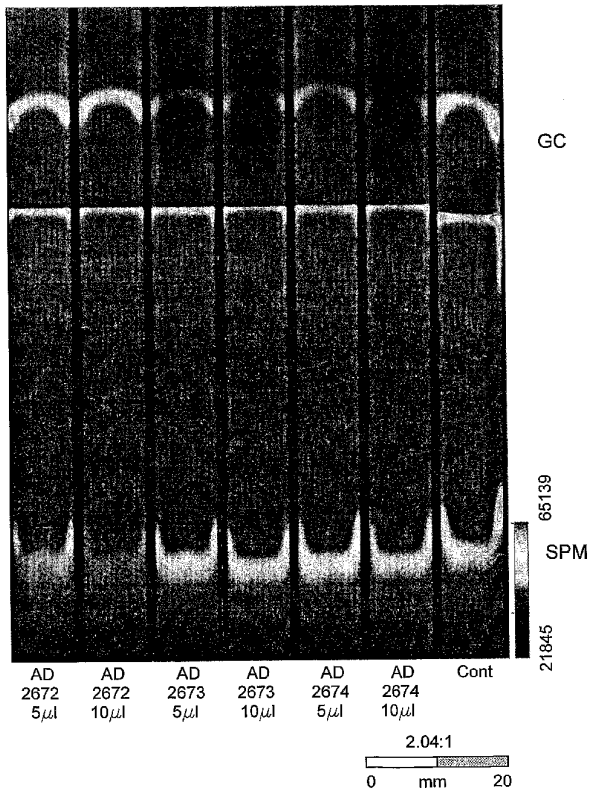


Fig. 6

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC/IL 01/00909
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7	C07C215/68 C07C215/24 C07C215/28 C07C233/43 C07F9/113 C07C311/04 A61P35/00 A61P43/00 A61K31/135 A61K31/165 A61K31/66	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07C C07F A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ENDO K ET AL: "CELL MEMBRANE SIGNALING AS TARGET IN CANCER THERAPY: INHIBITORY EFFECT OF N,N-DIMETHYL AND N,N,N-TRIMETHYL SPHINGOSINE DERIVATIVES ON IN VITRO AND IN VIVO GROWTH OF HUMAN TUMOR CELLS IN NUDE MICE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 51, no. 6, 15 March 1991 (1991-03-15), pages 1613-1618, XP000999201 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document ---	1, 8, 12-15
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
*E* earlier document but published on or after the international filing date		
*L* document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
*S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search:	Date of mailing of the international search report	
6 September 2002	19. 09. 2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax (+31-70) 340-2016	Authorized officer Rufet, J	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/IL 01/00909

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUNG C. HYUN ET AL.: "Synthetic inhibitors of glucocerebrosidase beta-glucosidase" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 166, no. 1975, pages 382-389, XP001040386 page 382 -page 387; table 1 ---	1,8, 12-15
X	SZULC Z M ET AL: "A facile regioselective synthesis of sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 41, 7 October 2000 (2000-10-07), pages 7821-7824, XP004235879 ISSN: 0040-4039 the whole document ---	1,12
X	JEAN PIERRE CRAVEDI ET AL.: "Chloramphenicol oxamylethanolamine as end product..." CHEM. RES. TOXICOL., vol. 8, 1995, pages 642-648, XP001040385 page 642 -page 644; figure 1 ---	1,16
X	K. R. WARREN ET AL.: "Glycosyltransferases of rat brain that make cerebrosides:" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 26, 1976, pages 1063-1072, XP001040387 the whole document ---	1,8, 12-15
X	ALICJA BIELAWSKA ET AL.: "(1S,2R)-D-erythro-2-(N-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 21, 1996, pages 12646-12654, XP001073628 cited in the application the whole document ---	1,8, 12-15
X	RANGA RAO YUNNAM ET AL.: "Analogues of ceramide that inhibit glucocerebrosidase synthetase in mouse brain" CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, vol. 26, 1980, pages 265-278, XP008002874 abstract; tables 1-V --- -/--	1,8, 12-15

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of secreted sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/IL 01/00909

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALICJA BIELAWSKA ET AL.: "Ceramide-mediated biology" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 26, 1992, pages 18493-18497, XP001073627 the whole document ---	1, 8, 12-15
X	REINER LUCKENBACH: "Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie, 4th Ed., 4th suppl., vol. XIII" 1985, SPRINGER-VERLAG, BERLIN HEIDELBERG NEW YORK TOKYO XP002197733 page 2776, paragraphs 6-8 ---	1
X	DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! BEILSTEIN INSTITUT ZUR FOEDERUNG DER CHEMISCHEN WISSENSCHAFTEN, FRANKFURT AM MAIN, DE; Database-Accession no. 2805762 (BRN), XP002197312 & PHARMAZIE, vol. 27, 1972, pages 148-153, ---	1
X	DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! BEILSTEIN INSTITUT ZUR FOEDERUNG DER CHEMISCHEN WISSENSCHAFTEN, FRANKFURT AM MAIN, DE; Database-Accession no. 8141389 (BRN), XP002197313 & J. PHARM. SCI., vol. 86, no. 10, 1997, pages 1173-1179, ---	1
X	DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! BEILSTEIN INSTITUT ZUR FOEDERUNG DER CHEMISCHEN WISSENSCHAFTEN, FRANKFURT AM MAIN, DE; Database-Accession no. 3157208 (BRN), XP002197314 & JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY., vol. 19, 1954, page 593 EASTON US ---	1
X	DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! BEILSTEIN INSTITUT ZUR FOEDERUNG DER CHEMISCHEN WISSENSCHAFTEN, FRANKFURT AM MAIN, DE; Database-Accession no. 3960297 (BRN), XP002197315 & BULL. ACAD. SCI. USSR DIV. CHEM. SCI., vol. 20, 1971, page 403 ---	1
	-/--	

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PC1/IL 01/00909

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! BEILSTEIN INSTITUT ZUR FOEDERUNG DER CHEMISCHEN WISSENSCHAFTEN, FRANKFURT AM MAIN, DE; Database-Accession no. 3746557 (BRN), XP002197316 & J. PHARM. PHARMACOL., vol. 4, 1952, page 693 ----	1
A	VUNNAM R R ET AL: "SHORT CHAIN CERAMIDES AS SUBSTRATES FOR GLUCOCEREBROSIDE SYNTHETASE DIFFERENCES BETWEEN LIVER AND BRAIN ENZYMES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 573, 1979, pages 73-82, XP002944323 ISSN: 0167-4781 abstract; tables I-V ----	1,8, 12-15
L	RAISOVA M ET AL: "Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCat keratinocytes" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 516, no. 1-3, 10 April 2002 (2002-04-10), pages 47-52, XP004349046 ISSN: 0014-5793 abstract; page 48 ----	1,8, 12-15
E	WO 01 79152 A (YISSUM RES DEV CO ;DAGAN ARIEH (IL); GATT SHIMON (IL)) 25 October 2001 (2001-10-25) the whole document ----	1-21
X	NAOYA MURATA ET AL.: "Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate by radioreceptor-binding assay" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 282, no. 1, 2000, pages 115-120, XP002212280 page 116, column 1, paragraph 2 ----	1
A	EP 0 398 340 A (THERA PATENT VERWALTUNGS GMBH) 22 November 1990 (1990-11-22) page 9 ----	1,8-10
A	WO 98 43675 A (CHASALOW FRED I ;AMUR PHARMACEUTICALS INC (US)) 8 October 1998 (1998-10-08) example 2 ----	1

7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IL 01/00909
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 19-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds as defined in invention 1.</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-21 all partly because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>	
<p><b>Remark on Protest</b> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

International Application No. PCT/L 01 00909

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-21 all partly

See for explanation the form PCT/ISA/206

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/IL 01/00909

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0179152	A	25-10-2001	AU 5250601 A WO 0179152 A1	30-10-2001 25-10-2001
EP 0398340	A	22-11-1990	DE 3916072 A1 AT 99671 T DE 59004086 D1 EP 0398340 A1 US 5103002 A	22-11-1990 15-01-1994 17-02-1994 22-11-1990 07-04-1992
WO 9843676	A	08-10-1998	US 5830432 A AU 6940998 A WO 9843676 A1	03-11-1998 22-10-1998 08-10-1998

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/02	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 33/06	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 P 33/14	A 6 1 P 33/14	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 C 215/14	C 0 7 C 215/14	
C 0 7 C 215/30	C 0 7 C 215/30	
C 0 7 C 215/36	C 0 7 C 215/36	
C 0 7 C 215/68	C 0 7 C 215/68	
C 0 7 C 233/36	C 0 7 C 233/36	
C 0 7 C 233/43	C 0 7 C 233/43	
C 0 7 C 271/16	C 0 7 C 271/16	
C 0 7 C 271/20	C 0 7 C 271/20	
C 0 7 F 9/09	C 0 7 F 9/09	V

## (72)発明者 ガット シモン

イスラエル国, エルサレム 9 2 1 0 4 , パーテナラ ストリート 1 1

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 DA42 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB33 ZB35  
 ZB37 ZB38 ZC02 ZC20 ZC33  
 4C206 AA01 AA02 AA03 FA31 GA31 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB33  
 ZB35 ZB37 ZB38 ZC02 ZC20 ZC33  
 4H006 AA01 AA03 AB20 AB24 AB28 BJ50 BN10 BU30 BU32 BV22  
 4H050 AA01 AA03 AB20 AB24 AB28 AB29