

Diss. ETH No. 18601

**Synthesis and Biological Evaluation of Novel Analogues of
Sphingosine, Ceramide, and Glycosphingolipids**

Submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Sciences

Presented by

Thresen MATHEW

M.Sc. Chem., Mahatma Gandhi University, India

Born on October 2nd, 1979, in Kerala, India

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Andrea Vasella, Examiner
Prof. Dr. Hans Jürg Borschberg, Co-examiner

Zürich 2009

SUMMARY

Sphingolipids (SLs) are important membrane lipids and implicated in cellular functions, like growth, differentiation, proliferation, inflammation, and immune response. Structural analogues of the fundamental members of SLs, *viz.* sphingosine (Sph), ceramide (Cer) and α -galactosyl ceramide (α -GalCer) were synthesized by modifying the salient structural features, *viz.* the polar head group and/or the lipophilic tail(s). The analogues were tested for their structure-activity relationships towards inhibition of sphingosine and ceramide kinases (SphK and CerK) and activation of T-cells (immune response) as part of collaboration with *Dr. P. Nussbaumer* and *Dr. G. De Libero*.

Wallimann (1985) and *Rajan* (2004) had synthesized 7-Oxasphingosine and -ceramide, by a procedure starting from D-galactal, a method oriented towards the independent variation of the head/alkyl groups.

In an attempt to explore the H-bond donor and acceptor properties, the head group modified 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole analogues of 7-oxaCer **229–235** were synthesized by a [2+3] cycloaddition between the azidosphingosine **224** and various alkynes. The amide moiety of Cer was displaced with a ureido (**236**) and sulfonamido (**237**) functionalities. The C(1)–OH of Sph was replaced by an *N,N*-dimethylamino function in **238**. All compounds, except for the triazolyl Sph analogue **235**, inhibit neither SphK type 1, nor acid sphingomyelinase, and none of them activated invariant natural killer T (iNKT) cells when presented by human CD1d-transfected antigen presenting cells (APC) or by plate-bound human CD1d. Triazole **235** weakly inhibited SphK1.

The *N*-acetyl-2-amino-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl-1-thio-7-oxaceramide (**239**) was synthesized by substituting the 7-oxasphingosine triflate **241** with 1-thio- α -D-*N*-acetylgalactosamine (**240**). As compared to Cer, **239** is neither a substrate of CerK, consistent with the absence of the C(1)–OH group, nor an inhibitor of Cer phosphorylation by CerK. While **239** partially displaced CD1d-bound lipids, it failed to stimulate iNKT cells when presented by human CD1d-transfected cells. These results suggest that **239** binds weakly to recombinant CD1d, but does not form immunogenic complexes with CD1d.

The conformationally biased piperidinone sphingosine analogues **242**, **243**, **244**, and **245** were synthesized from the allylic alcohol **298** *via* the lactams **320** and **321**, to elucidate the

question about the active conformation of Cer. The key reaction is the *Eschenmoser-Claisen* rearrangement of **298**. The *L-arabino* diol **242** and the *L-ribo* diol **243** were transformed into the amino alcohols **246–253**. The *L-gluco* ceramide analogues **254**, **255**, and **256a**, and the *L-altro* ceramide analogues **257** and **258a** were synthesized from either **320**, or **321**. The diols **243** and **245**, and the amino alcohols **248** and **249** inhibit SphK1, while the analogues **242**, **244**, **246**, and **247** are inactive. The dimethylamines **250–253**, the analogues **254**, **255**, **256a**, and the *L-altro* ceramide analogues **257** and **258a** did not block SphK1. Neither **242** nor **243** inhibited SphK2 or CerK. The *L-arabino* diols **242** and **244** stimulate iNKT cells when presented by living APC and also by plate-bound human CD1d, whereas the diols **243** and **245**, the amino alcohols **246–247**, and the dimethylamines **250–251** did not activate iNKT cells. The analogues **254**, **255**, and **256a** had a strongly stimulatory effect on iNKT cells when presented by living APC and also by plate-bound human CD1d, whereas **257** activated only weakly. All activatory compounds induced preferentially the release of pro-inflammatory cytokines, indicating the formation of a stable CD1d-lipid-T cell receptor complex. The biological results reveal that the synthesis of the conformationally biased analogues is very promising, in particular of the *L-ribo* configured piperidinones, possessing a biased *Gauche* conformation which is important for binding not only with SPhK, but also with CD1d.

The synthesis of 7-oxasphingosine (**216**) and 7-oxaceramide (**217**) was improved by replacing the benzyl by the methoxybenzyl protecting group. The 7-thiasphingosine analogues **259–260** and 7-azasphingosine analogues **261** and **353** were synthesized *via* the azidoalcohol **342**. The 7-thiasphingosine **259** is a poorer substrate for both isoforms of SphK than Sph, but showed a slight preference for SphK2. The 7-sulfone **260** and the 7-aza compounds **261** **353** were not phosphorylated by either SphK1 or SphK2. None of **259–261** and **353** activated iNKT clones when presented by human CD1d-transfected APC or by plate-bound human CD1d. Only **261** and **353** partially inhibited T cells stimulated with plate-bound recombinant CD1d and α -GalCer.

A few other representative compounds **265–267** that are alkyl chain modified analogues of Cer were prepared. These analogues bear an OH or SH group on the alkyl/acyl chains.

The 1-deoxy sphinganine base (*R*)-1-amino-heptadecan-2-ol (**268**) is of interest, particularly in studying the effect of recognition of glycine (instead of serine) by serine palmitoyl transferase (SPT). The first practical, cost effective synthesis of aminoalcohol **268** was done in four steps (in 76% overall yield) starting from (*R*)-heptadecane-1,2-diol.

ZUSAMMENFASSUNG

Sphingolipide (SL) sind Bestandteil der Zellmembran. Sie spielen in zellulären Prozessen wie dem Zellwachstum, der Differenzierung, der Proliferation, Entzündungsprozessen und Immunreaktion eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit wurden durch Modifikation der charakteristischen Merkmale Strukturanaloge der Sphingolipide (SL), der Sphingosine (Sph), der Ceramide (Cer) und der α -Galactosylceramide (α GalCer) synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht. Die Synthese der Analogen basierte auf einer Methode zur Herstellung von 7-Oxasphingosin und -Ceramid, die von *Wallimann* (1985) und *Rajan* (2004) ausgearbeitet wurde. Die Analogen wurden bezüglich einer Struktur-Aktivitätsbeziehung in der Hemmung der Sphingosin- und Ceramidkinase (SphK und CerK) und Aktivierung der T-Zellen (Immunreaktion) im Zuge einer Zusammenarbeit mit *Dr. P. Nussbaumer* und *Dr. G. De Libero* untersucht.

Für die Untersuchungen der Wasserstoffbrückendonor- und -akzeptoreigenschaften wurden an der Kopfgruppe modifizierte 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazolanalogue von 7-OxaCer **229–235** hergestellt, die durch eine [2+3] Cycloaddition des Azidosphingosin **224** an unterschiedliche Alkine synthetisiert wurden. Die Amideinheit von Cer wurde durch eine Harnstoff- (**236**) und eine Sulfonamidofunktionalität (**237**) ersetzt. Die Hydroxygruppe an C(1) von Sph wurde auch durch eine *N,N*-Dimethylaminogruppe ersetzt. Mit Ausnahme des Triazoeylanalogen **235** hemmt keine der Verbindungen weder SphK Typ 1 noch saure Sphingomyelinase. Keine der Verbindungen aktivierte die invarianten natürlichen Killer-T-Zellen (iNKT) bei Versuchen mit CD1d transfizierten antigenpräsentierenden Zellen (APC) oder mit plattengebundenen menschlichen CD1d. Das Triazol **235** hemmt SphK1 schwach.

Das *N*-Acetyl-2-amino- α -D-galaktopyranosyl-1-thio-7-oxaceramid (**239**) wurde durch Substitution des 7-Oxasphingosintriflats mit 1-Thio- α -D-*N*-acetylgalaktosamin **240** hergestellt; das *S*-glycosid ist **239** weder ein Substrat von CerK, in Übereinstimmung mit der fehlenden Hydroxygruppe an C(1), noch ein Hemmer der Cer Phosphorylierung durch CerK. Während **239** teilweise CD1d-gebundene Lipide ersetzt, stimuliert es iNKT-Zellen bei Versuchen mit menschlichen CD1d transfizierten Zellen nicht. Die Ergebnisse sind eine Indiz dafür, dass **239** schwach an rekombinante CD1d bindet, ohne jedoch mit CD1d immunogene Komplexe zu bilden.

Um die aktive Konformation von Cer zu ermitteln, wurden die konformationell eingeschränkten Piperidon-Sphingosinanalogen **242–245** über die Lactame **320** und **321**

ausgehend vom Allylalkohol **298** synthetisiert. Der Schlüsselschritt dieser Synthese ist eine *Eschenmoser-Claisen-Umlagerung* von **298**. Das *L-arabino* Diol **242** und das *L-ribo* Diol **243** wurden in die Aminoalkohole **246–253** übergeführt. Die *L-gluco* Ceramid Analogen **254**, **255** und **256a** und die *L-altro* Analogen **257** und **258a** wurden aus **320** oder **321** synthetisiert. Die Diole **243** and **245** und die Aminoalkohole **248** und **249** hemmen SphK1, wogegen **242**, **244**, **246** und **247** inaktiv sind. Die Dimethylamine **250–253**, die Analogen **254**, **255**, **256a** und die *L-altro* Ceramid Analogen **257** und **258a** zeigen ebenfalls keine Aktivität gegenüber SphK1. Weder **242** noch **243** hemmen SphK2 oder CerK. Die *L-arabino* Diole **242** und **244** stimulieren iNKT Zellen sowohl bei Versuchen mit lebenden APC als auch mit plattengebundenen menschlichen CD1d, während die Diole **243** und **245**, die Aminoalkohole **246** und **247** sowie die Dimethylamine **250** und **251** keine Stimulation der iNKT Zellen hervorrufen. Die Analogen **254**, **255**, **256a** zeigten einen stark stimulierenden Effekt auf die iNKT Zellen sowohl mit lebenden APC als auch mit plattengebundenen menschlichen CD1d. Hingegen zeigte **257** nur eine geringe Aktivität. Alle aktivierenden Verbindungen induzierten bevorzugt die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen, was ein Indiz für die Bildung eines stabilen CD1d-Lipid-T-Zellen-Rezeptorkomplexes ist. Die Resultate der biologischen Experimente zeigten, dass die konformationell eingeschränkten Analogen eine vielversprechende Klasse von Verbindungen darstellen, im Speziellen die *L-ribo* konfigurierten Piperidinone, welche durch eine *gauche*-Konformation charakterisiert sind. Diese Konformation ist nicht nur für die Bindung mit SPhK sondern auch mit CD1d entscheidend.

Die Synthese von 7-Oxasphingosin **216** und 7-Oxaceramid **217** wurde durch die Verwendung einer Methoxybenzyl- an Stelle einer Benzylgruppe verbessert. Die 7-Thiasphingosinanalogen **259** und **260** und die 7-Azasphingosinanalogen **261** und **353** wurden über den Azidoalkohl **342** synthetisiert. Das 7-Thiasphingosin **259** ist ein schlechteres Substrat für beide Isoformen von SphK als SPh, zeigte jedoch eine geringe Präferenz für SphK2. Das Sulfon **260** und die 7-Aza-Verbindungen **261** und **353** wurden weder durch SphK1 noch durch SphK2 phosphoryliert. Keine der Verbindungen **259–261** und **353** aktivierte iNKT Klone in Versuchen mit menschlichen CD1d-transfizierten APC oder mit plattengebundenen menschlichen CD1d. Lediglich **261** und **353** zeigten eine partielle Hemmung der plattengebundenen rekombinierten CD1d und α -GalCer stimulierten T-Zellen.

Einige weitere repräsentative Vertreter der Cer-Analogen **265–267**, welche durch Modifikation der Alkylkette(n) charakterisiert sind, wurden synthetisiert. Die Alkylkette(n) dieser Analogen tragen entweder eine Hydroxy- oder eine Thiolgruppe.

Die 1-Desoxy-Sphinganinebase (*R*)-1-Amino-heptadecan-2-ol (**268**) ist hinsichtlich der Untersuchungen zur Erkennung von Glycin (anstatt Serin) durch Palmitoyltransferase (SPT) von Interesse. Die erste zweckmässige und kostengünstige Synthese des Aminoalkohols **268** wurde ausgehend von (*R*)-heptadecan-1,2-diol über vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 76% durchgeführt.