



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 298 227**

(51) Int. Cl.:

C07D 327/00 (2006.01)

C07D 327/06 (2006.01)

C07F 9/06 (2006.01)

C07F 9/38 (2006.01)

C07F 9/10 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01922465 .8**

(86) Fecha de presentación : **19.03.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1263752**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.12.2002**

(54) Título: **Agonistas y antagonistas de receptores de LPA y procedimientos de utilización.**

(30) Prioridad: **17.03.2000 US 190370 P**

(73) Titular/es: **The University of Tennessee Research Corporation
1534 White Avenue, Suite 403
Knoxville, Tennessee 37996-1527, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

(72) Inventor/es: **Miller, Duane, D.;
Tigyi, Gabor;
Dalton, James, T.;
Sardar, Vineet, M.;
Elrod, Don, B.;
Xu, Huiping;
Baker, Daniel, L.;
Wang, Dean;
Liliom, Karoly;
Fischer, David, J.;
Virág, Tamas y
Nusser, Nora**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agonistas y antagonistas de receptores de LPA y procedimientos de utilización.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a derivados del ácido lisofosfatídico (“LPA”), que tienen actividad como agonistas o antagonistas en los receptores del LPA y a diversas aplicaciones terapéuticas de los mismos incluyendo, entre otros posibles, el tratamiento del cáncer de próstata y el tratamiento del cáncer de ovario.

10 Antecedentes de la invención

Todas las células no transformadas necesitan factores de crecimiento para su supervivencia y proliferación. Además de los factores de crecimiento polipeptídicos, se ha descubierto una clase emergente de lípidos que tienen propiedades similares a las de los factores de crecimiento conocida colectivamente por el nombre de factores de crecimiento fosfolípídicos (PLGFs). Pese a que tienen propiedades farmacológicas similares en cuanto a que inducen la proliferación de la mayoría de las células inactivas (Jalink *et al.*, 1994a; Tokumura, 1995; y Moolenaar *et al.*, 1997), los PLGFs pueden ser subdivididos, por su estructura, en dos amplias categorías. En la primera categoría se engloban los mediadores glicerofosfolípídicos (GPMs), que presentan un esqueleto de glicerol. GPMs representativos son, entre otros posibles, el LPA, el ácido fosfatídico (PA), el ácido fosfatídico cíclico (PA cíclico), el alquenil-glicerol-fosfato (alquenil-GP) y la lisofosfatidilserina (LPS). En la segunda categoría se encuadran los mediadores esfingolípídicos (SPMs), que presentan un motivo de base esfingoide. SPMs representativos son, entre otros posibles, la esfingosina-1-fosfato (SPP), la dihidroesfingosina-1-fosfato, la esfingosilfosforilcolina (SPC) y la esfingosina (SPH).

En suero se han detectado el LPA (Tigyi *et al.*, 1991; Tigyi y Miledi, 1992), el PA (Myher *et al.*, 1989), el alquenil-GP (Liliom *et al.*, 1998), el PA cíclico (Kobayashi *et al.*, 1999), la SPP (Yatomi *et al.*, 1995) y la SPC (Tigyi *et al.*, 2000). Estos mediadores lipídicos han sido identificados y caracterizados. No obstante, en el suero y en el plasma aún hay más PLGFs presentes, que aunque sean desconocidos, muestran propiedades similares a los de los factores de crecimiento (Tigyi y Miledi, 1992). El LPA, con una concentración sérica de $\approx 20 \mu\text{M}$, es el PLGF más abundante presente en el suero (Tigyi y Miledi, 1992; Jalink *et al.*, 1993).

En las células eucarióticas, el LPA es un intermedio clave en las fases iniciales de la biosíntesis de fosfolípidos, que tiene lugar predominantemente en la membrana del retículo endoplásmico (Bosch, 1974; Bishop y Bell, 1988). En el retículo endoplásmico, el LPA se deriva de la acción de la acil-CoA sobre el glicerol-3-fosfato, que es acilado adicionalmente para producir PA. Dado que la tasa de acilación de LPA a PA es muy alta, se acumula muy poco LPA en el lugar de la biosíntesis (Bosch, 1974). Como el LPA está limitado al retículo endoplásmico, lo más probable es que su función como intermedio metabólico no esté relacionada con su función como molécula señalizadora.

El LPA es un constituyente del suero, y su nivel sérico está en la franja micromolar baja (μM) (Eicholtz *et al.*, 1993). Este nivel está dentro de lo que cabría esperar, porque el LPA es liberado por las plaquetas activadas durante el proceso de coagulación. A diferencia de lo que ocurre en el suero, el LPA no es detectable en sangre fresca o plasma (Tigyi y Miledi, 1992; Eicholtz *et al.*, 1993). El LPA presente en el suero está ligado a la albúmina, y es responsable de la mayoría de la actividad biológica termoestable, no dializable, del suero completo (Moolenaar, 1994). Se logró identificar que el componente sérico activo que es responsable de provocar una corriente de cloruro hacia el interior del oocito de *Xenopus* es otro el LPA (18:0) (Tigyi y Miledi, 1992). La mayor parte del LPA ligado a la albúmina (18:0) es producido durante el proceso de coagulación, más que por la acción de la lisofosfolipasa D (LPD) sobre la lisofosfatidilcolina (liso-PC). Esta última ruta metabólica es responsable de la presencia de LPA en el plasma “envejecido” que ha sido descoagulado por la acción de la heparina o del citrato más dextrosa (Tokumura *et al.*, 1986). Otro aspecto a tener en cuenta es que el LPA no está presente en el plasma que ha sido tratado con EDTA. Este hecho implica que la lisofosfolipasa plasmática puede ser dependiente del Ca^{2+} (Tokumura *et al.*, 1986).

El papel o función de la albúmina es proteger al LPA de las acciones de las fosfolipasas presentes en el suero (Tigyi y Miledi, 1992). Tigyi y Miledi sugirieron que la albúmina no sólo actúa como portador del LPA en el torrente sanguíneo, sino que, además, aumenta su semivida fisiológica. Hay mediadores lipídicos aún no identificados presentes en la seroalbúmina que imitan las acciones del LPA a la hora de provocar una corriente de cloruro hacia el interior del oocito de *Xenopus*.

Los tipos de células que responden al LPA van desde los mohos deslizantes y el oocito de *Xenopus* hasta las células somáticas de los mamíferos. Por lo tanto, parece probable que la fuente de LPA y la liberación de LPA no estén limitadas únicamente a las plaquetas activadas. En experimentos recientes se ha demostrado que los fibroblastos de los mamíferos, cuando son estimulados con factores de crecimiento peptídicos, producen LPA rápidamente, y que tras esta producción de LPA, el LPA resultante es liberado en el medio extracelular (Fukami y Takenawa, 1992).

Existen indicios de que hay cantidades relativamente altas de LPA bioactivo de origen celular desconocido en el líquido ascítico de pacientes aquejados de cáncer de ovario (Xu *et al.*, 1995a), y se sabe que el líquido ascítico de tales pacientes tiene una potente actividad mitógena en las células del carcinoma ovárico (Mills *et al.*, 1988; Mills *et al.*,

ES 2 298 227 T3

1990). Aún no se ha determinado si este LPA bioactivo es secretado por las células tumorales al líquido extracelular, o si es secretado por los leucocitos, o si es producido a partir de lípidos más complejos mediante las acciones de diversas fosfolipasas.

5 Los GPMs y los SPMs provocan una amplia variedad de respuestas celulares que abarcan todo el árbol filogenético (Jalink *et al.*, 1993a). El LPA induce incrementos transitorios del Ca²⁺ (señales de Ca²⁺) originados en depósitos intracelulares de varios tipos de células, por ejemplo, las células neuronales (Jalink *et al.*, 1993; Durieux *et al.*, 1992), las plaquetas, los fibroblastos tanto normales como transformados (Jalink *et al.*, 1990), las células epiteliales (van Corven *et al.*, 1989; Moolenaar, 1991), y los oocitos de *Xenopus* (Tigyi y Miledi, 1992; Durieux *et al.*, 1992; Fernhout *et al.*, 1992). El LPA induce la agregación plaquetaria (Schumacher *et al.*, 1979; Tokumura *et al.*, 1981; Gerrard *et al.*, 1979; Simon *et al.*, 1982) y la contracción de la musculatura lisa (Tokumura *et al.*, 1980; Tokumura *et al.*, 1994); y tras administración intravenosa, induce cambios dependientes de especie en la presión sanguínea (Schumacher *et al.*, 1979; Tokumura *et al.*, 1978).

15 Cuando se añade LPA a fibroblastos inactivos, éste estimula la síntesis de ADN y la división celular (van Corven *et al.*, 1989; van Corven *et al.*, 1992). Los efectos similares a los del crecimiento que tiene el LPA no requieren de la presencia de factores de crecimiento peptídicos para manifestarse. Dada esta observación, se constata que el LPA difiere en este sentido de la endotelina o de la vasopresina, que sí que requieren de la presencia de la insulina o del factor de crecimiento epidérmico (Moolenaar, 1991) para mantener la proliferación celular. Un hecho a tener en cuenta 20 es que en las células del mieloma Sp², el LPA fue responsable de una respuesta antimitógena que fue mediada por un aumento de los niveles de AMPc (Tigyi *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1998). A diferencia de lo que ocurría con la ruta mitógena, la ruta antimitógena no se veía afectada por la toxina pertussis (PTX). Además, al añadir forskolina e isobutil metilxantina, las acciones antimitógenas del LPA en las células del mieloma Sp² fueron aditivas (Tigyi *et al.*, 1994). En diversos tipos de células, el LPA ocasiona cambios en el citoesqueleto, incluida la formación de adherencias 25 focalizadas y de fibras de tensión en los fibroblastos (Ridley y Hall, 1992). Asimismo, el LPA promueve la reducción y supresión de la diferenciación de los neuroblastomas induciendo la retracción de las neuritas en desarrollo (Jalink *et al.*, 1994a; Jalink *et al.*, 1994b). La adición de cantidades nanomolares (nmol) de LPA (Jalink y Moolenaar, 1992) a células de neuroblastoma N1E-115 privadas de suero ocasionó una retracción inmediata de las neuritas, acompañada de un redondeamiento rápido, aunque transitorio, del cuerpo celular (Jalink *et al.*, 1993b). En presencia continua de 30 LPA, las células del neuroblastoma mantienen su fenotipo indiferenciado, pero no sufren mitosis (Jalink *et al.*, 1993b). Fueron necesarios factores adicionales, tales como los factores de crecimiento similares a la insulina, para la progresión del ciclo celular. Una vez que las células se han diferenciado morfológicamente, la adición de LPA invierte el cambio morfológico. Por lo tanto, las retracciones de las neuritas inducidas por el LPA son consecuencia de la contracción 35 del citoesqueleto de actina, más que de una pérdida de adherencia al sustrato (Jalink *et al.*, 1993b; Jalink *et al.*, 1994b).

El LPA, a semejanza de otros quimioatrayentes fisiológicos (por ejemplo, la interleucina 8), induce la migración 40 celular, mediante un mecanismo haptotáctico, en los monocitos humanos (Zhou *et al.*, 1995). Además de inducir la migración celular, el LPA promueve la invasión, por parte de las células de hepatoma y de carcinoma, de la monocapa de células mesoteliales (Imamura *et al.*, 1993). El mecanismo causante de esta invasión sigue sin estar claro, pero la invasión puede deberse a un aumento de la motilidad celular y de la adherencia celular. Por último, se sabe que el LPA 45 bloquea la apoptosis de los cardiomiositos neonatales (Umansky *et al.*, 1997).

Se observó que un fosfolípido natural único, el PA cíclico, es responsable de acciones celulares similares u opuestas 45 a las de otros GPMs, en función del tipo de célula. Cuando se probó el PA cíclico con el oocito de *Xenopus*, provocó una corriente de cloruro (al igual que otros GPMs), pero la respuesta no era desensibilizada por el LPA (Fischer *et al.*, 1998). Murakami-Murofushi *et al.* (1993) demostraron que el PA cíclico es responsable de acciones antiproliferativas (a diferencia del LPA, que induce la proliferación).

50 Los receptores de los PLGF (PLGFRs) pertenecen a una superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana unidos a proteínas G que regulan la unión a nucleótidos de guanina. Los GPCRs de siete-TM son una familia de receptores situados en la superficie celular que median respuestas celulares interaccionando con la proteína G heterotrimérica. Se ha identificado una serie de receptores del LPA, incluidos, entre otros, el EDG-2, el EDG-4, el EDG-7 y el PSP-24. En la Figura 1 aparece un árbol filogenético que ilustra la relación existente entre estos receptores del LPA 55 y otros.

En 1996, Hecht *et al.* emplearon la técnica de hibridación diferencial para clonar un ADNc que codifica un receptor serpantino putativo de líneas celulares neocorticales de ratón (Hecht *et al.*, 1996). El gen fue denominado "gen 1 de la zona ventricular" (Vzg-1). El Vzg-1 se expresaba en las regiones neurógenas corticales y codificaba una proteína de 41 60 kDa de peso molecular (364 aminoácidos). El Vzg-1 era muy similar a una secuencia ovina no publicada denominada "gen 2 de diferenciación endotelial" (EDG-2). El mismo ADNc fue aislado también como un receptor huérfano en bibliotecas murinas y bovinas, y se denominó recl.3 (Macrae *et al.*, 1996). Estaba ampliamente distribuido en los tejidos murinos, y su expresión más alta tenía lugar en el cerebro y el corazón.

65 En 1996, Guo *et al.*, empleando un protocolo basado en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), aislaron otro receptor putativo del LPA, conocido como PSP-24 (372 aminoácidos), del oocito de *Xenopus* (Guo *et al.*, 1996). Este receptor mostraba pocas semejanzas con el Vzg-1/EDG-2/recl.3 (Guo *et al.*, 1996). Una búsqueda de receptores de los esfingolípidos, basada en secuencia (realizada empleando la secuencia de ADNc del receptor del LPA humano EDG-

ES 2 298 227 T3

2), condujo a dos GPCRs estrechamente relacionados entre sí, a saber: el H218 de rata (EDG-5, 354 aminoácidos) y el EDG-3 (378 aminoácidos) (An *et al.*, 1997a). El análisis mediante la técnica Northern blot reveló una alta expresión de los ARNm que codificaban el EDG-3 y el EDG-5 en el tejido cardíaco.

5 La reciente identificación del EDG-2 como receptor funcional del LPA motivó a An *et al.* a llevar a cabo una búsqueda basada en secuencia de un subtipo novedoso de receptor del LPA (An *et al.*, 1998a). Se descubrió un ADNc humano que codificaba un GPCR; dicho ADNc humano fue designado como EDG-4 (An *et al.*, 1998a). El análisis mediante la técnica Northern blot reveló que aunque tanto EDG-2 como EDG-4 actúan como receptores de los GPMs, sus distribuciones tisulares eran muy diferentes. A diferencia del EDG-2, el EDG-4 se expresaba principalmente en 10 los leucocitos de sangre periférica, y en los testículos (An *et al.*, 1998a).

15 Gracias a la amplificación mediante PCR del ADNc procedente de células T (linfocitos) Jurkat, se identificó un GPCR anteriormente desconocido que pertenece a la familia de los EDG. El GPCR identificado se designó como EDG-7. Tiene una masa molecular de 40 kDa (353 aminoácidos). El análisis, mediante la técnica Northern blot, de la expresión del EDG-7 en tejidos humanos reveló que el EDG-7 se expresa en corazón, páncreas, próstata y testículos (Bandoh *et al.*, 1999). Por lo tanto, hay dos familias bien diferenciadas de receptores de los PLGFs: PSP24 y EDG, con un total de diez PLGFRs diferentes (Figura 1). La lista de PLGFRs va en aumento.

20 Estos diversos receptores se pueden clasificar con arreglo a sus especificidades en cuanto a ligandos: GPMs o SPMs (como se indica en la siguiente tabla, Tabla 1).

TABLA 1
Receptor del factor de crecimiento fosfolipídico, Longitud, y ligando principal

30	PLGFR	Número aminoácidos	de principal	Ligando
	EDG-1	381		SPP
	EDG-2	364		LPA
35	EDG-3	378		SPP
	EDG-4	382		LPA
	EDG-5	354		SPP
40	EDG-6	385		SPP
	EDG-7	353		LPA
	EDG-8	400		SPP
45	PSP24	de	372	LPA
	<i>Xenopus</i>			
50	PSP24 murino	373		LPA

El PSP24 de *Xenopus* y el PSP24 expresado en ratones transducen específicamente las corrientes oscilatorias de cloruro inducidas por GPM (LPA, Fischer *et al.*, 1998). Ninguno de ambos PSP24 es estructuralmente homólogo a la familia EDG (Tigyi y Miledi, 1992; Fernhout *et al.*, 1992). La familia EDG puede dividirse en dos subgrupos bien diferenciados. En el primer grupo se encuadran EDG-2, EDG-4 y EDG-7, que sólo actúan como receptores para los GPMs (Hecht *et al.*, 1996; An *et al.*, 1998a; Bandoh *et al.*, 1999; An *et al.*, 1998b) y transmiten numerosas señales en respuesta a la unión a ligandos. En el segundo grupo se encuadran EDG-1, EDG-3, EDG-5, EDG-6 y EDG-8, y este segundo grupo es específico de los SPMs (An *et al.*, 1997a; Im *et al.*, 2000; van Brocklyn *et al.*, 1998; Speigel y Milstein, 2000). En la Tabla 2 se indican las principales expresiones tisulares de los diversos PLGFRs.

TABLA 2

Expresión de los receptores de los factores de crecimiento fosfolipídico en tejidos humanos

5

	PLGFR	Tejido humano en el que se da la mayor expresión
10	EDG-1	Ubícuo
	EDG-2	Cardiovascular, SNC, gonadal, gastrointestinal
15	EDG-3	Cardiovascular, leucocitos
	EDG-4	Leucocitos, testículos
20	EDG-5	Cardiovascular, SNC, gonadal, placenta
	EDG-6	Linfoide, hematopoyético
25	EDG-7	Corazón, páncreas, próstata, testículos
	EDG-8	Cerebro
30	PSP24	SNC

Los PLGFs activan varios procesos de transducción de señales mediados por las proteínas G. Dichos procesos son mediados por las familias de proteínas G heterotriméricas $G_{q/11}$, $G_{1/0}$ y $G_{12/13}$ (Moolenaar, 1997; Speigel y Milstein, 1995; Gohla *et al.*, 1998).

35

La ruta de la proteína $G_{q/11}$ es responsable de la activación de la fosfolipasa C (PLC), que a su vez induce la producción de inositol trifosfato (IP_3), con la consiguiente movilización de Ca^{2+} , en una amplia variedad de células (Tokumura, 1995). En algunas células esta respuesta es sensible a la PTX, lo que implica que participan varias rutas sensibles y no sensibles a la PTX (Tigyi *et al.*, 1996). Además, esta ruta es responsable de la activación de la proteína quinasa C (PKC) mediada por el diacilglicerol (DAG). La PKC activa la fosfolipasa D (PLD) celular, que es responsable de la hidrólisis de la fosfatidilcolina; dicha hidrólisis produce colina libre y PA (van der Bend *et al.*, 1992a). Asimismo, la PLC es capaz de activar la MAP quinasa, bien directamente, bien a través de la activación -mediada por el DAG- de la PKC, en algunos tipos de células (Ghosh *et al.*, 1997).

45

La ruta de señalización mitógena es mediada a través de la subunidad $G_{1/0}$ de las proteínas G heterotriméricas. Los estudios de transfección llevados a cabo indican que el responsable de la activación de las Ras-MAP quinasas es el dímero $G_{\beta\gamma}$, y no la subunidad αi . La activación de Ras se ve precedida por la transactivación de las tirosina quinasas receptoras (RTK) tales como los receptores del EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Cunnik *et al.*, 1998) o los receptores del PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) (Herrlich *et al.*, 1998). Las RTKs transactivadas activan la Ras, y esto conduce a la activación de las MAP quinasas (ERK 1,2) mediante la Raf. La subunidad $G_{i\alpha}$, que es sensible a la PTX, inhibe la adenilciclase (AC), lo que provoca que el dímero $\beta\gamma$ se acople a una quinasa receptora unida a proteína G (GRK) que fosforila y desensibiliza el receptor. El receptor fosforilado es reclutado por la β -arrestina, con lo que se recluta la quinasa *src*, que a su vez fosforila el receptor de EGF, generando su conformación activa (Lin *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999). A su vez, las RTKs transactivadas activan la Ras, lo que conduce a la activación de las MAP quinasas (ERK 1,2) mediante la Raf. La subunidad $G_{i\alpha}$, que es sensible a la PTX, inhibe la AC, y esto conduce a una reducción de los niveles de AMP cíclico (AMPc). Los efectos celulares opuestos que genera el LPA, a saber, mitogénesis y antimitogénesis, se ven acompañados por efectos contrarios en el sistema de segundo mensajero AMPc. La mitogénesis es mediada a través de la ruta de la $G_{i\alpha}$, que conduce a una reducción de los niveles de AMP cíclico (AMPc) (van Corven *et al.*, 1989; van Corven *et al.*, 1992), mientras que la antimitogénesis se ve acompañada de un incremento, dependiente del Ca^{2+} y no sensible a la PTX, de los niveles de AMPc (Tigyi *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1998).

55

En cambio, se sabe muy poco acerca de la vía de señalización de la $G_{12/13}$, insensible a la PTX, que conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina. Es posible que en esta vía se transactiven también las RTKs (Lin *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999; Gohla *et al.*, 1998), y que converja en una Rho GTPasa pequeña (Moolenaar, 1997). Se sabe mucho más acerca de la señalización "downstream" de Rho, porque se han aislado e identificado diversas proteínas asociadas. Rho activa las serina/treonina quinasas, que fosforilan, y como consecuencia inhiben, la

fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLC-fosfatasa) (Kimura *et al.*, 1996). Esta vía conduce a la acumulación de la forma fosforilada de la cadena ligera de la miosina (MLC), lo que a su vez provoca respuestas citoesqueléticas que conllevan efectos celulares tales como la retracción de las neuritas (Tigyi y Miledi, 1992; Tigyi *et al.*, 1996; Dyer *et al.*, 1992; Postma *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1997), la inducción de fibras de tensión (Ridley y Hall, 1992; Gonda *et al.*, 1999), la estimulación de la quimiotaxis (Jalink *et al.*, 1993a), la migración celular (Zhou *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1992) y la invasividad de las células tumorales (Imamura *et al.*, 1993; Imamura *et al.*, 1996). La invasividad de las células tumorales, inducida por los PLGF y mediada por Rho, es bloqueada por la toxina C3 de *C. Botulinum*, que ribosila de forma específica la Rho siguiendo un mecanismo dependiente de ADP (Imamura *et al.*, 1996).

Además, Rho tiene capacidad para estimular la síntesis de ADN en los fibroblastos inactivos (Machesky y Hall, 1996; Ridley, 1996). La expresión de la GTPasa de la familia Rho activa el factor de respuesta sérica (SRF), que media la transcripción temprana de los genes (Hill *et al.*, 1995). Asimismo, el PLGF (el LPA) induce la invasión por parte de las células tumorales (Imamura *et al.*, 1996), aunque aún no está claro si en este mecanismo subyacen cambios citoesqueléticos o transcripción de genes o ambas cosas.

Dada la implicación del LPA/de los receptores del LPA en una serie de rutas celulares y actividades celulares, tales como la proliferación o la migración, así como su implicación en la cicatrización de heridas y en el cáncer, sería deseable identificar compuestos nuevos que sean capaces de actuar, preferiblemente de modo selectivo, como antagonistas o agonistas de los receptores del LPA que se han indicado anteriormente.

Actualmente se conocen muy pocos inhibidores (ya sea sintéticos o endógenos) de los receptores del LPA. De entre los antagonistas notificados hasta la fecha, con los que más se ha trabajado es con la SPH, la SPP, la N-palmitoil-l-serina (Bittman *et al.*, 1996) y la N-palmitoil-l-tirosina (Bittman *et al.*, 1996). Se sabe que los compuestos mencionados inhiben las corrientes de cloruro inducidas por el LPA en el oocito de *Xenopus* (Bittman *et al.*, 1996; Zsiros *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han estudiado estos compuestos en sistemas celulares. Se sabe también que la SPP inhibe la invasividad de las células tumorales, pero no está claro si esta inhibición se debe a que la SPP actúa como inhibidor del LPA o a las acciones de los inhibidores de la propia SPP. La N-palmitoil-l-serina y la N-palmitoil-l-tirosina también inhibieron la agregación plaquetaria inducida por el LPA (Sugiura *et al.*, 1994), pero no se ha dilucidado todavía si actúan a nivel del receptor del LPA. El lisofosfatidilglicerol (LPG) fue el primer lípido del que se demostró que ejercía un cierto grado de inhibición de las acciones del LPA (van der Bend *et al.*, 1992b), pero, en varios tipos de células que respondían al LPA, el LPG no era detectable (Lilliom *et al.*, 1996). No se pudo demostrar que ninguno de estos inhibidores actuase selectivamente a nivel de receptores del LPA concretos.

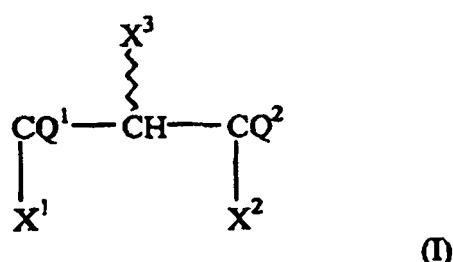
Se demostró que un compuesto polisulfonado, la suramina, inhibía la síntesis de ADN inducida por el LPA, de una manera reversible y proporcional a la dosis. No obstante, se halló que la suramina no presenta especificidad por el receptor del LPA y que bloquea las acciones del LPA únicamente a concentraciones milimolares (mM) muy altas (van Corven *et al.*, 1992).

Se afirma que dos compuestos, a saber, el ácido 2-[4-([3-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il)-propil]-{[4-fosfonooxi-butilcarbamoil]-metilsulfanil}-acetil]-amino)-benzoilamino]-pentanodioico, y el ácido 2-(4-([3-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il)-propil]-{8-fosfonooxi-octanil}-amino)-benzoilamino)-pentanodioico, inhiben el transporte del 3H-metotrexato al interior de las células de la leucemia de células T MOLT-4 (Beilstein, Abs XP002239009).

La presente invención tiene como objetivo superar las deficiencias asociadas con los agonistas del LPA y antagonistas del LPA conocidos actualmente.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a compuestos según la fórmula (I) siguiente:



donde

65 X¹ es (HO)₂PO-Z¹- o (HO)₂PO-Z²-P(OH)O-Z¹-;

ES 2 298 227 T3

X² y X³ son R¹-NR²-A-, cada uno siendo igual o diferente;

A es un enlace directo, (CH₂)_k, siendo k un número entero comprendido entre 0 y 30, o es O;

5 Z¹ es -O(CH₂)_m, siendo m un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Z² es -O(CH₂)_n, siendo n un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Q¹ y Q² son, independientemente, H₂ o =O;

10 R¹ es, independientemente, hidrógeno; un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30; un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, seleccionadas del grupo de los alquilos, los alcóxidos, los ácidos y los alcoholes; un acilo que incluye un anillo aromático; un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, -C(O)-O-R⁷; y

15 R² es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

20 R⁷ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

25 y donde cuando X¹ es (HO)₂PO-O-, X² es NHCH₃, Q¹ es H₂ y Q² es =O, entonces X³ no es -NHR₂, donde R₂ es hidrógeno o un acilo sustituido por metilo o fenilo.

30

Asimismo, se presentan composiciones farmacéuticas que incluyen un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la presente invención.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para modular la actividad del receptor del LPA *in vitro*, que incluye proporcionar un compuesto de la presente invención que tiene actividad como agonista del receptor del LPA o como antagonista del receptor del LPA, así como poner en contacto un receptor del LPA *in vitro* con el compuesto, en condiciones eficaces para modular la actividad del receptor del LPA.

40 Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso, en el tratamiento del cáncer, de un compuesto de la presente invención, y a la administración de una cantidad eficaz del compuesto a un paciente, de una manera eficaz para tratar el cáncer.

45 Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso, para el aumento de la proliferación celular, de un compuesto de la presente invención que tiene actividad como agonista del receptor del LPA, así como poner en contacto un receptor del LPA en una célula con el compuesto, de una manera eficaz para aumentar la proliferación, inducida por el receptor del LPA, de la célula.

50 Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de los compuestos objeto de la presente invención. Una estrategia para la fabricación de los compuestos objeto de la presente invención consiste en:

hacer reaccionar (Y²O)₂PO-Z¹¹-Z¹³ o (Y²O)₂PO-Z¹²-P(OH)O-Z¹¹-Z¹³, donde

55 Z¹¹ es -O(CH₂)_m, siendo m un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Z¹² es -O(CH₂)_n, siendo n un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

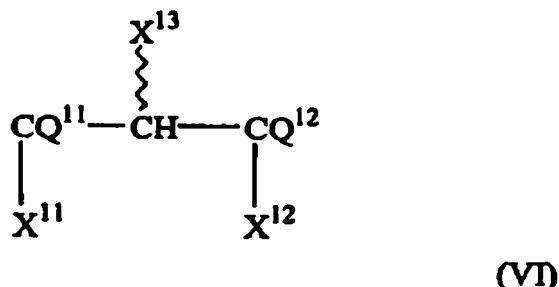
60 Z¹³ es H o un primer grupo saliente, o bien -Z¹¹-Z¹³ juntos forman el primer grupo saliente; e

Y² es H o un grupo protector,

65

ES 2 298 227 T3

con un compuesto intermedio seg\xfcren la f\xf3rmula (VI)



15 donde

X¹² y X¹³ son ambos R¹¹-NR¹²-A-, siendo cada uno iguales o diferentes entre s\xf;í;

20 X¹¹ es OH, NH₂, SH o un segundo grupo saliente;

A es o bien un enlace directo, o bien (CH₂)_k, siendo k un n\xfamero entero comprendido entre 0 y 30, o es O;

Q¹¹ y Q¹² son, independientemente, H₂ o =O;

25 R¹¹ es, independientemente, hidr\xf3geno; un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30; un anillo arom\xf3tico con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, seleccionadas del grupo de los alquilos, los alc\xf3xidos, los \xfatidos y los alcoholes; un acilo que incluye un anillo arom\xf3tico; un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; -C(O)-O-R¹⁶; y

30 R¹² es, independientemente, hidr\xf3geno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo arom\xf3tico con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo arom\xf3tico, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

40 R¹⁶ es, independientemente, hidr\xf3geno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo arom\xf3tico con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo arom\xf3tico, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

45 si es necesario, despu\xe9s se lleva a cabo una etapa de desprotecci\xf3n, realiz\'andose tanto dicha etapa de reacci\xf3n como dicha etapa de desprotecci\xf3n en condiciones que resultan eficaces para obtener un compuesto seg\xfcren la f\xf3rmula (I), donde X¹ es (HO)₂PO-Z¹- o (HO)₂PO-Z²-P(OH)O-Z¹-.

50 Los compuestos de la presente invenci\xf3n que se han identificado en la presente invenci\xf3n como agonistas o antagonistas de uno o m\xf1s receptores del LPA se pueden usar para inhibir o potenciar, respectivamente, rutas bioqu\xfamicas mediadas por la señalizaci\xf3n a trav\xeds de los receptores del LPA. Dado que modulan la señalizaci\xf3n a trav\xeds de los receptores del LPA, dichos antagonistas y agonistas se pueden usar, de manera espec\xf9fica y sustancial, para tratar el c\xe1ncer y mejorar la cicatrizaci\xf3n de las heridas.

Breve descripci\xf3n de las ilustraciones

55 La Figura 1 es un \xe1rbol filogen\xf3tico que ilustra la clasificaci\xf3n y la relaci\xf3n existente entre diez receptores de los factores de crecimiento fosfolip\xf3dicos, incluidos los receptores del LPA: EDG-2, EDG-4, EDG-7, y PSP-24 (α,β).

La Figura 2 ilustra el esquema de s\xfntesis empleado para preparar los compuestos de serina amida 35-43.

60 La Figura 3 ilustra el esquema de s\xfntesis empleado para preparar los compuestos de fosfato de serina amida 55-59.

La Figura 4 ilustra el esquema de s\xfntesis empleado para preparar los compuestos difosfato 66-68.

65 Las Figuras 5A-B ilustran la s\xfntesis de los compuestos difosfato. La Figura 5A ilustra el esquema de s\xfntesis empleado para preparar los compuestos 1,2-difosfato 85-92. La Figura 5B ilustra el esquema de s\xfntesis empleado para preparar los compuestos 1,3-difosfato.

ES 2 298 227 T3

Las Figuras 6A-B ilustran los esquemas de síntesis empleados para preparar los compuestos pirofosfato.

Las Figuras 7A-C ilustran los esquemas de síntesis empleados para preparar monofosfatos y monofosfonatos sustituidos a partir de un compuesto intermedio diéter protegido con tosilato.

5 La Figura 8 ilustra el esquema de síntesis empleado para preparar los compuestos fosfato con ácido graso de cadena lineal 106-110.

10 La Figura 9 ilustra la síntesis de ésteres de monoalquilo y ácido tiofosfórico, de cadena lineal.

15 La Figura 10 ilustra la síntesis de alquiloamido de cadena lineal-ácido fosfórico.

La Figura 11 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos fosfato cíclico de conformación restringida.

15 La Figura 12 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos fosfato cíclico de conformación restringida.

20 La Figura 13 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos fosfato cíclico de conformación restringida.

La Figura 14 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos de conformación restringida y con un grupo fosfato libre.

25 La Figura 15 ilustra un esquema de síntesis alternativo empleado para preparar 2-monofosfatos.

La Figura 16 ilustra un esquema de síntesis alternativo empleado para preparar compuestos 1,3-difosfato.

30 La Figura 17 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos que tienen como X³ un grupo -N(H)-acilo.

La Figura 18 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos que tienen como X³ un grupo -N(H)-imidazol.

35 La Figura 19 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos que tienen como X³ un grupo -N(H)-C(O)-O-R⁷.

40 La Figura 20 ilustra un esquema de síntesis empleado para preparar compuestos que tienen como X³ un grupo -N(H)-C(S)-O-R⁷.

45 La Figura 21 es un gráfico que ilustra la inhibición, proporcional a la dosis, de las corrientes de cloruro inducidas por el LPA en oocitos de *Xenopus*, mediante aplicación extracelular de 56 (SAP [fosfato de serina amida], 14:0).

La Figura 22 es un gráfico que ilustra la inhibición, proporcional a la dosis, de las corrientes de cloruro inducidas por el LPA en oocitos de *Xenopus*, mediante aplicación extracelular de 57 (SAP, 18:0).

50 Las Figuras 23A-B son gráficos que ilustran la inhibición, proporcional a la dosis, de las corrientes de cloruro inducidas por el LPA en oocitos de *Xenopus*, mediante aplicación extracelular de 66 (MAGDP, 18:0). La flecha indica el momento de la inyección de 5 μM de 66, seguida por la aplicación extracelular de LPA.

55 La Figura 24 es un gráfico que ilustra el efecto inhibidor, proporcional a la dosis, de 66 (MAGDP, 18:0). Se aplicó a los oocitos una corriente constante de LPA (5 nM), junto con cantidades crecientes de 66. Los puntos de datos representan la amplitud de los picos de las corrientes de cloruro medidas.

60 La Figura 25 es un gráfico que ilustra la inhibición, proporcional a la dosis, de las corrientes de cloruro inducidas por el LPA en oocitos de *Xenopus*, mediante aplicación extracelular de 92 (MAGDP, 22:0).

65 La Figura 26 es un gráfico que ilustra el efecto, proporcional a la dosis, de 56a (SDAP, 14:0/2:0) sobre los oocitos de *Xenopus*.

La Figura 27 es un gráfico de barras que describe los efectos de 56 (SAP, 14:0), 56a (SDAP, 14:0/2:0) y 66 (MAGDP, 18:0) sobre la migración de las células HEY inducida por el LPA. La concentración de los compuestos de la prueba fue 1 μM y la concentración de LPA fue 0,1 μM.

70 Las Figuras 28A-C son gráficos que ilustran la relación existente con la dosis en los incrementos del Ca²⁺ en células RH7777 que expresan heterólogamente el EDG-2 (28A), el EDG-4 (28B) o el EDG-7 (28C). Cada punto de los datos representa el promedio de al menos tres mediciones ± S.D. (desviación estándar).

ES 2 298 227 T3

Las Figuras 29A-D son gráficos que ilustran la inhibición, por parte del diacilglicerol pirofosfato (DGPP) 8:0, de los incrementos del Ca^{2+} provocados por el LPA en las células RH7777 que expresan el EDG-2 y el EDG-7, pero no el EDG-4. Se expusieron células RH7777 que expresaban el EDG-2, el EDG-4 o el EDG-7 a una mezcla de LPA 18:1 100 nM y DGPP 8:0 1 μM . Las células de control fueron expuestas a LPA 18:1 100 nM. En estos gráficos, se ilustran 5 los incrementos de Ca^{2+} representativos en células RH7777 estables que expresan el EDG-2 (Figura 29A), el EDG-4 (Figura 29B) y el EDG-7 (Figura 29C), o de células RH7777 que expresan de manera transitoria el EDG-4 (Figura 29D).

10 Las Figuras 30A-C son gráficos que ilustran la caracterización farmacológica de la inhibición de la respuesta al LPA 15 por parte del DGPP 8:0 en células RH7777 que expresan el EDG-7 (“células EDG-7”). Dichas células fueron expuestas a una concentración 250 nM de LPA 18:1 mezclada con concentraciones crecientes de DGPP 8:0, y se midió el área 20 pico de los incrementos del Ca^{2+} resultantes (Figura 30A). Además, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de LPA 18:1 mezclada con una concentración 500 nM de DGPP 8:0 (Figura 30B). Asimismo, las “células 25 EDG-7” fueron expuestas a una concentración 250 nM de LPA 18:1 mezclada con una concentración 500 nM del lípido indicado (Figura 30C). Las áreas pico de los incrementos del Ca^{2+} se representan como los valores promedio, con un mínimo de tres mediciones \pm S.D. (desviación estándar).

20 Las Figuras 31A-C son gráficos que ilustran la caracterización farmacológica de la inhibición de la respuesta al LPA 25 por parte del DGPP 8:0 en células RH7777 que expresan el EDG-2 (“células EDG-2”). Se expusieron “células EDG-2” estables a una concentración 250 nM de LPA 18:1 mezclada con concentraciones crecientes de DGPP 8:0, y se midió el área pico de los incrementos del Ca^{2+} resultantes (Figura 31A). Además, se expusieron “células EDG-2” a concentraciones crecientes de LPA 18:1 mezclada con una concentración 10 μM de DGPP 8:0 (Figura 31B). Asimismo, se expusieron “células EDG-2” a una concentración 250 nM de LPA 18:1 mezclada con una concentración 10 μM del lípido indicado (Figura 31C). Las respuestas (los incrementos) se representan como los valores promedio 25 de un mínimo de tres mediciones \pm S.D. (desviación estándar).

30 Las Figuras 32A-B son gráficos que ilustran la relación estructura-actividad en relación con el DGPP en células RH7777 que expresan el EDG-4 (“células EDG-4”). Se expusieron “células EDG-4” estables a una concentración 500 nM de LPA 18:1 mezclada con una concentración 5 μM de los lípidos indicados (Figura 32A). Se expusieron células RH7777 que expresaban transitoriamente el EDG-4 a una concentración 100 nM de LPA 18:1 mezclada con una concentración 1 μM de los lípidos indicados (Figura 32B). Se midieron las áreas pico de los incrementos del Ca^{2+} , que se representan como los valores promedio de un mínimo de tres mediciones \pm S.D. (desviación estándar).

35 Las Figuras 33A-C son gráficos que ilustran la caracterización farmacológica del DGPP 8:0 en relación con las corrientes de cloruro provocadas por el LPA en oocitos de *Xenopus*. Se expusieron dichos oocitos a una concentración 5 nM de LPA 18:1 mezclada con concentraciones crecientes de DGPP 8:0, y se midieron las amplitudes pico de las 40 corrientes de cloruro oscilatorias resultantes (Figura 33A). Se expusieron oocitos a concentraciones crecientes de LPA 18:1 mezclada con una concentración 200 nM de DGPP (Figura 33B). Los puntos de datos representan los valores promedio de un mínimo de tres mediciones \pm S.D. (desviación estándar). Se trataron oocitos con LPA 18:1 5 nM, o con una mezcla de LPA 18:1 5 nM y DGPP 8:0 1 μM , de la manera indicada (Figura 33C). La flecha indica la 45 inyección intracelular de DGPP 8:0 1 μM .

45 Las Figuras 34A-D son gráficos que ilustran cómo el DGPP 8:0 inhibe los incrementos del Ca^{2+} provocados por el LPA en fibroblastos NIH3T3 y en células de cáncer ovárico HEY. La Figura 34A refleja la detección mediante TI-PCR (TI = transcriptasa inversa; PCR = reacción en cadena de la polimerasa) de transcritos para los receptores EDG 50 y PSP24 en las células NIH3T3. Las células NIH3T3 fueron expuestas a una concentración 100 nM de LPA 18:1, o S1P, mezclada con una concentración 10 μM de DGPP 8:0 (Figura 34B). La Figura 34C refleja la detección mediante TI-PCR de la presencia de transcritos para los receptores EDG y PSP24 en las células HEY. Las células HEY fueron expuestas a una concentración 100 nM de LPA 18:1, o S1P, mezclada con una concentración 1 μM de DGPP 8:0 (Figura 34D). Se midieron las áreas pico de los incrementos del Ca^{2+} resultantes, que se representan como promedio 50 de un mínimo de tres mediciones \pm S.D. (desviación estándar).

55 La Figura 35 es un gráfico que ilustra la inhibición, por parte del DGPP 8:0, de la proliferación de las células NIH3T3 promovida por el LPA. Se privó de suero a las células NIH3T3 durante 6 horas, y se las expuso a una concentración 5 μM de LPA 18:1 mezclada con una concentración 10 μM de los lípidos indicados. Las células de control recibieron, en vez de LPA 18:1, un disolvente (seroalbúmina bovina [BSA]). Se incubaron las células con los lípidos durante 24 horas y se contaron las células. Los datos son representativos de tres experimentos.

60 La Figura 36 es un gráfico que ilustra la caracterización farmacológica de la inhibición de la respuesta al LPA por parte de los compuestos fosfato con ácido graso de cadena lineal 106-110 en oocitos de *Xenopus*.

La Figura 37 es un gráfico que ilustra la caracterización farmacológica de la inhibición de la respuesta al LPA por parte del compuesto fosfato con ácido graso de cadena lineal 108 en oocitos de *Xenopus*.

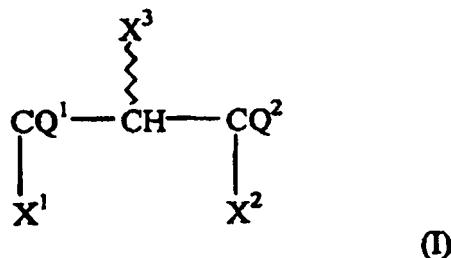
65 La Figura 38 es un gráfico que ilustra la caracterización farmacológica de la respuesta, inducida por antagonistas o agonistas, que se daba en células RH7777 que expresaban el receptor EDG-2, EDG-4 o EDG-7 tras la exposición de dichas células al compuesto fosfato con ácido graso de cadena lineal 108. Se midieron las áreas pico de los incrementos del Ca^{2+} .

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto según la fórmula (I)

5

10



15

donde

X¹ es $(HO)_2PO-Z^1-$ o $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$;

20

X² y X³ son R¹-NR²-A-, cada uno siendo igual o diferente;

A es un enlace directo, $(CH_2)_k$, siendo k un número entero comprendido entre 0 y 30, o es O;

25

Z¹ es $-O(CH_2)_m-$, siendo m un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Z² es $-O(CH_2)_n-$, siendo n un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Q¹ y Q² son, independientemente, H₂ o =O;

30

R¹ es, independientemente, hidrógeno; un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30; un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, seleccionadas del grupo de los alquilos, los alcóxidos, los ácidos y los alcoholes; un acilo que incluye un anillo aromático; un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; -C(O)-O-R⁷; y

35

R² es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

40

R⁷ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

45

y donde cuando X¹ es $(HO)_2PO-O-$, X² es NHCH₃, Q¹ es H₂ y Q² es =O, entonces X³ no es -NHR₂, donde R₂ es hidrógeno o un acilo sustituido por metilo o fenilo.

50

Para cada uno de los grupos R indicados anteriormente (por ejemplo, R¹, R², R⁷), se pretende que los alquilos de cadena lineal tengan la fórmula $(CH_2)_x(CH_3)$, donde x es un número entero comprendido entre 0 y 29; los alquilos de cadena ramificada tengan la fórmula definida para los alquilos de cadena lineal, a excepción de que uno o más grupos CH₂ estén reemplazados por grupos CHW, donde W es la cadena lateral de un alquilo; los alquenilos de cadena lineal tengan la fórmula $(CH_2)_{xa}CH=CH(CH_2)_{xb}CH_3$, donde xa y xb son, cada uno, un número entero comprendido entre 0 y 27 y (xa + xb) no es superior a 27; y los alquenilos de cadena ramificada tengan la fórmula definida anteriormente para los alquenilos de cadena lineal, a excepción de que uno o más grupos CH₂ estén reemplazados por grupos CHW o de que un grupo CH esté reemplazado por un grupo CW, donde W es la cadena lateral de un alquilo.

55

Los anillos aromáticos pueden ser, entre otros, fenilos, indenos, naftalenos y bifenilos. El anillo aromático puede incluir monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, situadas en las posiciones *ortho*, *meta* o *para* de los anillos, respecto de la posición en que el anillo se une al grupo NR₂ de la cadena R¹-NR²-A-. Las sustituciones de los anillos pueden ser, entre otras: alquilo, alcoxi, ácidos, alcoholes.

60

Los grupos acilo pueden incluir un alquilo, un alquenilo o anillos aromáticos como los descritos anteriormente.

65

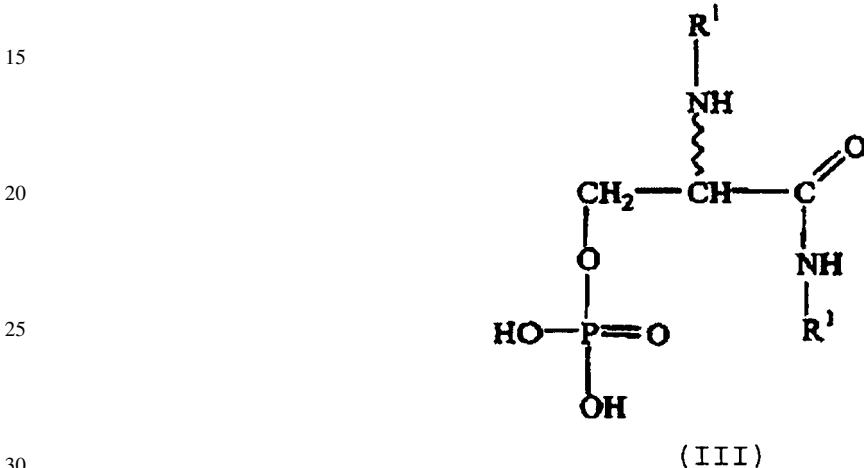
Los grupos arilalquilo y ariloxialquilo pueden incluir, entre otros, grupos alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30 como los descritos anteriormente, y el grupo alquilo se une al grupo NR₂ de la cadena R¹-NR²-A-.

ES 2 298 227 T3

Se excluyen específicamente de la definición indicada del compuesto según la fórmula (I) los siguientes compuestos endógenos o sintéticos que ya eran conocidos: ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, ácido ciclofosfatídico, alquenil glicerolfosfato, dioctil-glicerol pirofosfato, y N-palmitoil-L-serina.

5 Los compuestos de ejemplo según la fórmula (I) son los compuestos subclase según la fórmula (III) siguientes.

En las estructuras de la fórmula (III), Q¹ es H₂; Q² es =O, X¹ es (HO)₂PO-Z¹-, Z¹ es O; X² y X³ son R¹-NR²-A-, A es un enlace directo y NR² es -NH-. Cada R¹ se define independientemente tal como se ha indicado anteriormente para la fórmula (I). Las especies preferidas dentro del ámbito de la fórmula III son aquellas en las que X³ es -NH₂ y 10 X² es -NHR¹, donde R¹ es un alquilo de C14 a C18, y más preferiblemente un alquilo C14 o un alquilo C18; o en las que X³ es -NHR¹, donde R¹ es un grupo acetilo y X² es -NHR¹, donde R¹ es un alquilo C14.



Los compuestos según la fórmula (I), así como los compuestos subgénero según la fórmula (III), se pueden preparar empleando los esquemas de síntesis que se describen a continuación.

35 Para sintetizar las series de la serina amida (SA) y del fosfato de serina amida (SAP) (fórmula (III)), primero se sintetizó el precursor β -lactona (25) protegida con *t*-Boc (*ter*-butoxicarbonilo). Partiendo de una *t*-Boc-L-serina (Figura 2, 24) disponible en el mercado, se introdujeron trifenil fosfina (PPh₃) y dietilazidodicarboxilato (DEAD) en condiciones de Mitsunobo, obteniéndose el compuesto 25 aproximadamente al 50% (Sun *et al.*, 1996). Los intentos que se llevaron a cabo, empleando el procedimiento desarrollado por Sun *et al.*, para abrir la altamente lábil β -lactona 40 25 con diversas aminas primarias a fin de obtener hidroxiamidas, fracasaron a pesar de usar diversos reactivos (trietilamina, etc.). A continuación, en lugar del procedimiento de Sun *et al.*, se hizo refluir las aminas primarias con la β -lactona en tetrahidrofurano (THF), y de este modo se obtuvieron las hidroxiamidas 26-34, protegidas con *t*-Boc. Se purificaron los compuestos 26-34 mediante cromatografía en columna flash. Mediante la retirada del grupo protector *t*-Boc, mediada por ácido trifluoroacético (TFA), se obtuvieron los compuestos 35-43 en forma de sales de TFA.

45 Para sintetizar los compuestos 55-59, se fosforilaron las hidroxiamidas 26-30 protegidas por *t*-Boc. Tras estudiar detenidamente el compuesto final, se pensó que dicho compuesto final presentaría una región altamente hidrófoba y una región altamente hidrófila. Dichas regiones podrían ocasionar problemas durante el proceso de extracción o fijarse a la columna durante la fase de purificación. Para evitar estos posibles problemas, se empleó un procedimiento 50 basado en el fosforamidato. La hipótesis era que, empleando este procedimiento basado en el fosforamidato, se podrían proteger los grupos hidroxil-fosfato, con lo que la molécula se volvería completamente hidrófoba y ello facilitaría su purificación.

Esencialmente, se empleó una combinación de procedimientos con el fin de obtener los productos deseados (55-59) (Lynch *et al.*, 1997; Bitman *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999). Las hidroxiaminas de partida (26-30) fueron lavadas repetidamente con una piridina anhidra, y luego fueron secadas en condiciones de alto vacío durante más de 48 horas. Se mantuvo a las hidroxiaminas lavadas con piridina en una atmósfera compuesta de argón. Después, se añadió 1H-tetrazol y una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados. Se añadió asimismo el compuesto fosforilador dibencildisopropil fosforamidato. Tras monitorizar la reacción mediante cromatografía en capa fina (TLC), se oxidó el fosfonato a fosfato *in situ* empleando ácido peracético. La mezcla de reacción fue purificada mediante cromatografía en columna, obteniendo los compuestos 50-54 en forma de fosfatos protegidos por bencilo. La retirada de los grupos protectores bencilo se llevó a cabo en etanol, sometiendo los compuestos 50-54 a una reducción catalítica empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ a 60 psi (4,13 bares), obteniendo como resultado los compuestos 55-59 (Figura 3). Haciendo reaccionar el compuesto 56 con anhídrido acético se obtuvo el compuesto 65 56a (Figura 3).

Una vez determinada la técnica de fosforilación adecuada para la síntesis de la serie de la SAP (compuestos 55-59), se empleó un procedimiento similar para la síntesis de los biofosfatos (Figuras 4 y 5A-B). Se lavaron los dioles

60-62 (disponibles en el mercado) con piridina anhidra, y luego se los secó durante 48 horas en condiciones de alto vacío. Estos dioles secados (60-62) fueron disueltos en una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados, y luego se añadió 1H-tetrazol. A esta mezcla, agitada, se le añadió dibencildiisopropil fosforamido. La mezcla de reacción fue monitorizada mediante cromatografía en capa fina, y en el momento adecuado se oxidó el fosfonato a fosfato *in situ* empleando ácido peracético. La mezcla de reacción fue purificada mediante cromatografía en columna, obteniendo los compuestos 63-65 en forma de difosfatos protegidos por bencilo. La retirada de los grupos protectores bencilo se llevó a cabo en etanol, sometiendo los compuestos 63-65 a una reducción catalítica empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ a 60 psi (4,13 bares), obteniendo como resultado los compuestos 66-68 en forma de difosfatos. Se empleó un procedimiento similar al descrito para la síntesis de los compuestos 66-68 con el fin de obtener los compuestos 85-92.

Aunque los compuestos 85-92 son 1,2-difosfatos, la Figura 5B ilustra la síntesis de 1,3-difosfatos. Como material de partida se empleó 2-fenoxi-1,3-propano-diol disponible en el mercado. Primero se protegió el compuesto de partida con *t*-BuOK en presencia de yoduro de metilo, y después se realizó una hidrogenación catalítica para obtener un compuesto intermedio que posteriormente se hizo reaccionar con un haluro (RX, donde R es lo definido anteriormente para R¹). Posteriormente, el compuesto intermedio recuperado fue tratado con AlCl₃ en presencia de etil-SH, obteniendo un 1,3-diol que presenta el grupo RO unido al C2 del esqueleto. El 1,3-diol recuperado fue disuelto en una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados, y luego se añadió 1H-tetrazol. A esta mezcla, agitada, se le añadió dibencildiisopropil fosforamido. La mezcla de reacción fue monitorizada mediante cromatografía en capa fina, y en el momento adecuado se oxidó el fosfonato a fosfato *in situ* empleando ácido peracético. La mezcla de reacción fue purificada mediante cromatografía en columna, obteniendo compuestos difosfato protegidos por bencilo. La retirada de los grupos protectores bencilo se llevó a cabo en etanol, sometiendo los compuestos a una reducción catalítica empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ a 60 psi (4,13 bares), obteniendo como resultado los compuestos 1,3-difosfato.

Para sintetizar los pirofosfatos, como material de partida se empleó tosilato glucídico ((2R)(-) o (2R)(+)) (Figuras 6A-B). La apertura del anillo fue catalizada por un ácido de Lewis, por ejemplo, BF₃, en presencia de un alcohol, obteniéndose un compuesto intermedio protegido por tosilato en la posición C1. En el paso siguiente, el alcohol de la posición C2 fue reemplazado por un grupo R (por ejemplo, R¹ tal como se ha descrito anteriormente) empleando un exceso de R-triflato y 2,6-di-*tert*-butil-4-metilpiridina, obteniéndose el compuesto intermedio diéter. Tratando el compuesto intermedio diéter con tris(tetra-n-butilamonio) hidrógeno pirofosfato se provocó un ataque nucleofílico al tosilato, de manera que el tosilato fue reemplazado por su sustituyente pirofosfato en la posición C1.

Para producir un pirofosfato, el compuesto intermedio protegido por tosilato fue tratado con alcohol bencílico en presencia de anhídrido trifílico y de 2,6-di-*tert*-butil-4-metilpiridina, que bencila el compuesto intermedio en la posición C2. Primero se retiró el grupo protector tosilato del compuesto intermedio bencilato mediante la acción de superóxido potásico en presencia de 18-corona-6, obteniéndose un grupo hidroxilo en la posición C1 que fue reemplazado por un grupo R (por ejemplo, R¹ tal como se ha descrito anteriormente) empleando un exceso de R-triflato y 2,6-di-*tert*-butil-4-metilpiridina. El compuesto intermedio diéter resultante seguía presentando el grupo protector bencilo en la posición C2. El grupo protector bencilo fue retirado mediante hidrogenación y el grupo hidroxilo resultante fue tosillado por acción de la piridina y del cloruro de *p*-toluensulfonilo, obteniéndose un diéter que presentaba un grupo tosilo en la posición C2. El grupo tosilo fue retirado por ataque nucleofílico mediante tratamiento con tris(tetra-n-butilamonio) hidrógeno pirofosfato, de manera que el tosilato fue reemplazado por un sustituyente pirofosfato en la posición C2.

Las Figuras 15 y 16 ilustran esquemas alternativos para la preparación de fosfatos y difosfatos (así como pirofosfatos, fosfonatos, etc.).

En la Figura 15, como material de partida se empleó bromuro glucídico, junto con un alcohol (ROH). Las condiciones de reacción incluyeron un tratamiento con K₂CO₃, seguido de un tratamiento con la sal amónica de C₆H₆CH₂N⁺(C₂H₅)₃Cl⁻, que provocaron el desplazamiento del bromuro por parte del grupo R. Después, se abrió el anillo del compuesto intermedio glucídico tras un tratamiento con HCl 1M en éter y un alcohol (R¹OH), obteniéndose un compuesto intermedio diéter que presentaba un grupo hidroxi en la posición C2. Se mezcló el diéter con 1H-tetrazol, y a la mezcla, agitada, se le añadió dibencildiisopropil fosforamido. La mezcla de reacción fue monitorizada mediante cromatografía en capa fina, y en el momento adecuado se oxidó el fosfonato a fosfato *in situ* empleando ácido peracético. La mezcla de reacción fue purificada mediante cromatografía en columna, obteniendo fosfatos protegidos por bencilo. La retirada de los grupos protectores bencilo se llevó a cabo en etanol, sometiendo los fosfatos protegidos por bencilo a una reducción catalítica empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ a 60 psi (4,13 bares), obteniendo como resultado compuestos monofosfato.

En la Figura 16 se empleó un esquema de reacción similar, salvo que en vez de hacer reaccionar el bromuro glucídico con un alcohol (ROH), se empleó BnOH para proteger la posición C3. Las condiciones de reacción incluyeron un tratamiento con K₂CO₃, seguido de un tratamiento con la sal amónica de C₆H₆CH₂N⁺(C₂H₅)₃Cl⁻, que provocaron el desplazamiento del bromuro por parte del grupo Bn. A continuación se abrió el anillo del compuesto intermedio glucídico tras un tratamiento con HCl 1M en éter y BnOH anhidro, que protegía la posición C1. El compuesto intermedio diéter resultante presentaba un grupo hidroxi en la posición C2. El diéter fue mezclado con una sal de haluro (RX) en solución acuosa de K₂CO₃, obteniéndose un compuesto intermedio que presentaba un grupo R unido por un enlace éter en la posición C2. Se desprotegió este compuesto intermedio mediante reducción catalítica empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ a 60 psi (4,13 bares), obteniendo como resultado un 1,3-diol.

El 1,3-diol fue combinado con 1H-tetrazol, y a esta mezcla, agitada, se le añadió dibencildiisopropil fosforamidato. La mezcla de reacción fue monitorizada mediante cromatografía en capa fina, y en el momento adecuado se oxidó el fosfonato a fosfato *in situ* empleando ácido peracético. La mezcla de reacción fue purificada mediante cromatografía en columna, obteniendo compuestos difosfato protegidos por bencilo. La retirada de los grupos protectores bencilo se llevó a cabo en etanol, sometiendo los fosfatos protegidos por bencilo a una reducción catalítica empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ a 60 psi (4,13 bares), obteniendo como resultado 1,3-difosfatos.

Empleando el compuesto intermedio diéter preparado como se ilustra en la Figura 6A (por ejemplo, presentando dicho compuesto intermedio diéter los sustituyentes R y R¹), es posible unir una serie de fosfatos y fosfonatos modificados a la posición C1 tras retirar el grupo tosilo. Como se ilustra en la Figura 7A, se hace reaccionar el compuesto intermedio, en condiciones de basicidad (pH básico), con X⁴-Z¹-PO(O-grupo protector)₂, donde Z¹ es -(R³)CH- y X⁴ es H. Las condiciones de basicidad eliminan el grupo protector tosilato y permiten que el fosfato modificado -Z¹-PO(O-grupo protector)₂ forme un enlace único con la posición C1. Los grupos protectores son retirados tras un tratamiento con TMSBr, obteniéndose un grupo -(R³)CH-PO(OH)₂ en la posición C1. Como se ilustra en la Figura 7B, se hace reaccionar el compuesto intermedio, en condiciones de basicidad, empleando tris(tetra-n-butilamonio), con X⁴-Z¹-PO(OH)-Z²-PO(OH)₂, donde Z¹ es -O-, Z² es CH₂, y X⁴ es H. Las condiciones de basicidad eliminan el grupo protector tosilato y permiten que el fosfonato modificado -Z¹-PO(OH)-Z²-PO(OH)₂ forme un enlace único con la posición C1. Tras tratamiento con condiciones acídicas y CH₃CN, en posición C1 se instala el grupo -O-PO(OH)-CH₂-PO(OH)₂. Como se ilustra en la Figura 7C, se hace reaccionar el compuesto intermedio, en condiciones de basicidad, con X⁴-Z¹-PO(O-grupo protector)₂, donde Z¹ es -OCH₂CH₂- y X⁴ es H. Las condiciones de basicidad eliminan el grupo protector tosilato y permiten que el fosfato modificado -Z¹-PO(O-grupo protector)₂ forme un enlace único con la posición C1. Los grupos protectores son retirados tras un tratamiento con TMSBr en colidina y un lavado con agua, obteniéndose un grupo -OCH₂CH₂-PO(OH)₂ en la posición C1.

Para preparar el compuesto fosfato cíclico de conformación restringida de la fórmula (III), como materiales de partida se emplearon los compuestos 26-30 en el esquema de síntesis que se ilustra en la Figura 11. Se hizo reaccionar los compuestos 26-30 con 1H-tetrazol, y el producto resultante se trató con di-*ter*-butil diisopropilfosforamidato, lo que causó una ciclación intramolecular. La oxidación *in situ* del fosfonato con ácido peracético produjo un compuesto intermedio fosfato cíclico. La reducción con TFA produjo los compuestos de la fórmula (III).

También es posible preparar otros compuestos de conformación restringida.

Como se ilustra en la Figura 12, se muestra un esquema alternativo para la preparación de fosfato cílicos, en el que X¹ y X² juntos son -O-PO(OH)-O-. Se hace reaccionar un compuesto intermedio 1,3-diol, protegido por bencilo, con POCl₃, y esto produce una ciclación intramolecular. Mediante tratamiento con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (como se ha descrito anteriormente) se obtiene un fosfato cíclico que presenta un grupo hidroxilo unido al carbono C2. Después, el compuesto intermedio cíclico se trata con un exceso de R-triflato y 2,6-di-*ter*-butil-4-metilpiridina, obteniéndose el compuesto definitivo.

Como se ilustra en la Figura 13, se muestra un esquema para la preparación de un fosfato cíclico, en el que X¹ y X² juntos son -O-PO(OH)-NH-. Empleando como material de partida los compuestos intermedios 35-43 preparados anteriormente, éstos son tratados con tris(1,2,4-triazol)fosfato, y luego con un lavado de HCl al 2%, lo que produce una ciclación intramolecular.

Como se ilustra en la Figura 14, se muestra un esquema para la preparación de un compuesto cíclico en el que el grupo fosfato no forma parte del anillo; concretamente, X² y X³ juntos son -N(H)-C(O)-N(R¹). Empleando como material de partida los compuestos intermedios 50-54 preparados anteriormente, éstos son tratados con COCl₂, que inserta un carbonilo entre las aminas unidas a los carbonos C2 y C3 durante la ciclación. Los grupos protectores bencilo son retirados del fosfato empleando paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente).

Otra clase de compuestos que pueden emplearse como agonistas o antagonistas de los receptores del LPA son compuestos fosfato con ácido graso o compuestos fosfatados de cadena lineal. Como se ilustra en la Figura 8, el n-alcanol anhídrico y el 1H-tetrazol pueden ser disueltos en cloruro de metileno anhídrico. Se puede añadir una solución de dibencil-N,N-diisopropil fosforamidito en cloruro de metileno anhídrico. Despues se puede añadir ácido peracético en cloruro de metileno anhídrico, gota a gota, para obtener los compuestos fosfato con ácido graso, protegidos por bencilo, 101-105. Los grupos protectores bencilo son retirados tras tratamiento en metanol anhídrico con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente), obteniéndose los compuestos fosfato con ácido graso 106-110.

Como alternativa para preparar compuestos fosfato con ácido graso, se pueden preparar también tiofosfatos y amiodofosfatos. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 9, se pueden disolver n-mercaptopalcanos y 1H-tetrazol en cloruro de metileno anhídrico. Se puede añadir una solución de dibencil-N,N-diisopropil fosforamidito en cloruro de metileno anhídrico. Despues se puede añadir ácido peracético en cloruro de metileno anhídrico, gota a gota, para obtener compuestos tiofosfato con ácido graso, protegidos por bencilo. Los grupos protectores bencilo son retirados tras tratamiento en metanol anhídrico con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente), obteniéndose los compuestos tiofosfato con ácido graso. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura

ES 2 298 227 T3

10, se pueden disolver una n-alquilamina y 1H-tetrazol en cloruro de metileno anhídrico. Se puede añadir una solución de dibencil-N,N-diisopropil fosforamidito en cloruro de metileno anhídrico. Después se puede añadir ácido peracético en cloruro de metileno anhídrico, gota a gota, para obtener compuestos amidofosfato con ácido graso, protegidos por bencilo. Los grupos protectores bencilo se eliminan tras tratamiento en metanol anhídrico con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente), obteniéndose los compuestos tiofosfato con ácido graso.

5 Cada uno de los esquemas de reacción identificados anteriormente se pueden modificar adicionalmente atacando un grupo amina primaria, como se ilustra en las Figuras 17-20. El compuesto intermedio se prepara, por ejemplo, a partir de los compuestos 50-54 que se trataron con TFA para eliminar el grupo protector *t*-Boc, obteniéndose la amina primaria en la posición C2 a la vez que se deja protegido el fosfato.

10 En la Figura 17, el compuesto intermedio (que presenta una amina primaria en la posición C2) se ataca con un haluro de ácido (por ejemplo, R¹COCl), que convierte la amina primaria en una amida (-N(H)-C(O)-R¹). Después, 15 el fosfato protegido por bencilo puede desprotegerse mediante tratamiento con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente).

15 En la Figura 18, el compuesto intermedio (que presenta una amina primaria en la posición C2) se ataca con N-acetil imidazolina en POCl₃, y esto convierte la amina primaria en una amina secundaria (-N(H)-imidazol). También 20 se pueden emplear imidazolinas sustituidas. Después, el fosfato protegido por bencilo puede desprotegerse mediante tratamiento con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente).

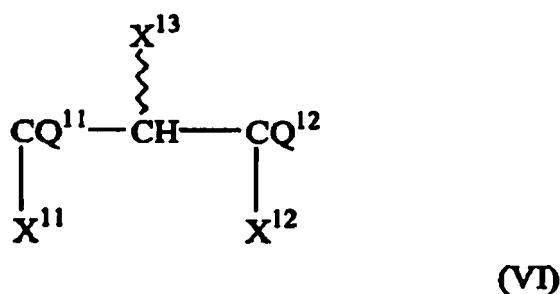
20 En la Figura 19, el compuesto intermedio (que presenta una amina primaria en la posición C2) se ataca con R¹CO (O)Cl, que convierte la amina primaria en un carbamato (-N(H)-C(O)-O-R¹). Después, el fosfato protegido por bencilo 25 puede desprotegerse mediante tratamiento con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente).

25 En la Figura 20, el compuesto intermedio (que presenta una amina primaria en la posición C2) se ataca con R¹NCO o R¹NCS, 30 y esto convierte la amina primaria en una uramida (-N(H)-C(O)-N(H)-R¹) o en una tiouramida (-N(H)-C(S)-N(H)-R¹). Después, el fosfato protegido por bencilo puede desprotegerse mediante tratamiento con paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) en una atmósfera de H₂ (de la manera descrita anteriormente).

30 Así, los compuestos no cíclicos de la presente invención se pueden preparar haciendo reaccionar (Y²O)₂PO-Z¹¹-Z¹³ o (Y²O)₂PO-Z¹²-P(OH)O-Z¹¹-Z¹³ [donde Z¹¹ es -O(CH₂)_m- siendo m un número entero comprendido entre 1 y 50, 35 o es -O-; Z¹² es -O(CH₂)_n- siendo n un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-; Z¹³ es H o es un primer grupo saliente o -Z¹²-Z¹³ juntos forman el primer grupo saliente, e Y² es H o un grupo protector; con un compuesto intermedio conforme con la fórmula (VI), y después, si es necesario, llevando a cabo una etapa de desprotección. 40 Ambas etapas (reacción y desprotección) se llevan a cabo en condiciones eficaces para la obtención de un compuesto según la fórmula (I), en el que X¹ es (HO)₂PO-Z¹- o (HO)₂PO-Z²-P(OH)O-Z¹-, donde Z¹ y Z² son lo que se ha definido anteriormente.

45 El compuesto intermedio de la fórmula (VI) tiene la siguiente estructura:

45



donde

60 X¹² y X¹³ son ambos R¹¹-NR¹²-A-, siendo cada uno iguales o diferentes entre sí;

X¹¹ es OH, NH₂, SH o un segundo grupo saliente;

65 A es o bien un enlace directo, o bien (CH₂)_k, siendo k un número entero comprendido entre 0 y 30, o es O;

Q¹¹ y Q¹² son, independientemente, H₂ o =O;

ES 2 298 227 T3

5 R¹¹ es, independientemente, hidrógeno; un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30; un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, seleccionadas del grupo de los alquilos, los alcóxidos, los ácidos y los alcoholes; un acilo que incluye un anillo aromático; un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30; -C(O)-O-R¹⁶; y

10 R¹² es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

15 R¹⁶ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

20 si es necesario, después se lleva a cabo una etapa de desprotección, realizándose tanto dicha etapa de reacción como dicha etapa de desprotección en condiciones que resultan eficaces para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde X¹ es (HO)₂PO-Z¹- o (HO)₂PO-Z²-P(OH)O-Z¹-.

25 Tras preparar los agonistas y antagonistas de los receptores del LPA de la presente invención, tales compuestos pueden emplearse para preparar composiciones farmacéuticas adecuadas para tratar pacientes, de las maneras que se describen de aquí en adelante. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de los descritos en la presente invención. Además, la composición farmacéutica puede incluir excipientes adecuados, o estabilizantes, y puede tener forma sólida o líquida, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Habitualmente, la composición farmacéutica contendrá de un 0,01 a un 99 por ciento (preferiblemente, de un 20 a un 75 por ciento) del compuesto o compuestos activos, y además contendrá el portador, el excipiente, el estabilizante, etc.

30 Las formas de administración de unidades sólidas pueden ser del tipo convencional. La forma sólida puede ser una cápsula, como las ordinarias de tipo gelatina, que contenga los compuestos de la presente invención y un portador, por ejemplo, lubricantes y sustancias de relleno inertes, tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz. En otra forma de realización, los compuestos de la presente invención se incluyen en comprimidos, con bases convencionales para comprimidos, tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz, junto con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, y sustancias desintegrantes tales como almidón de maíz, fécula de patata o ácido algínico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio.

35 40 Los compuestos de la presente invención pueden asimismo tener una forma de administración inyectable o tópica, que se consigue mediante la disolución o suspensión de estos materiales en un diluyente fisiológicamente aceptable y un portador farmacéutico. Los portadores farmacéuticos pueden ser, entre otros, líquidos estériles, por ejemplo, agua y aceites, añadiendo o no un tensoactivo y otro portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable, incluidos, entre otros, adyuvantes, excipientes o estabilizantes. Aceites ilustrativos son los aceites de petróleo y los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, como portadores líquidos se prefieren, especialmente para las soluciones inyectables, agua, solución salina, solución acuosa de dextrosa y soluciones azucaradas similares, y glicoles, por ejemplo, propilenglicol o polietilenglicol.

45 50 Para el uso como aerosol, se pueden empaquetar los compuestos de la presente invención, en forma de solución o suspensión, en un aerosol presurizado junto con los propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes hidrocarbonados tales como propano, butano o isobutano, y con adyuvantes convencionales. Asimismo, es posible administrar los materiales de la presente invención en forma no presurizada, por ejemplo, en forma de nebulizador o atomizador.

55 En función del tipo de tratamiento que se lleve a cabo, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por instilación nasal, por instilación intracavitoria o intravesical, o por vía intraocular, intrarterial, intralesional, o por aplicación en las membranas mucosas, por ejemplo, las de la nariz, la garganta o los bronquios.

60 Son composiciones cubiertas por el ámbito de la presente invención todas aquellas que contienen el compuesto de la presente invención en una cantidad eficaz para lograr el objetivo que se persigue con ellas. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de cada componente están al alcance de aquellos cualificados en la materia. Las dosificaciones habituales están comprendidas entre unos 0,01 y unos 100/mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones preferidas están comprendidas entre unos 0,1 y unos 100 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones que más se prefieren están comprendidas entre unos 1 y unos 100 mg/kg de peso corporal. La pauta de tratamiento para la administración de los compuestos de la presente invención también puede ser determinada fácilmente por los expertos en la materia.

ES 2 298 227 T3

Se ha descubierto que ciertos compuestos de la presente invención son útiles como agonistas de los receptores del LPA, y que otros compuestos de la presente invención son útiles como antagonistas de los receptores del LPA. Debido a las diferencias en su actividad, los diversos compuestos tienen aplicaciones diferentes. El sujeto animal preferido para la presente invención es un mamífero, es decir, un individuo perteneciente a la clase *Mammalia*. La invención es particularmente útil en el tratamiento de sujetos humanos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para modular la actividad del receptor del LPA *in vitro*, que incluye proporcionar un compuesto de la presente invención y que tiene actividad como agonista del receptor del LPA o como antagonista del receptor del LPA, así como poner en contacto un receptor del LPA *in vitro* con el compuesto en condiciones eficaces para modular la actividad del receptor del LPA.

El receptor del LPA está presente en una célula que expresa normalmente el receptor del LPA, o que ha sido transformada de algún modo para que exprese un receptor concreto del LPA. Los receptores del LPA adecuados son, entre otros, los receptores EDG-2, EDG-4, EDG-7 y PSP-24. En la Tabla 1 expuesta anteriormente en la presente invención se indican los tejidos que contienen células que expresan normalmente estos receptores. Cuando se pone en contacto una célula con el agonista del receptor del LPA o con el antagonista del receptor del LPA descritos en la presente invención, el contacto puede llevarse a cabo estando la célula *in vitro*.

Para expresar heterólogamente estos receptores en células anfitrionas que normalmente no los expresan, puede insertarse una molécula de ácido nucleico que codifique uno o más de tales receptores, en orientación "de sentido" en un vector de expresión que incluya las adecuadas regiones reguladoras de la transcripción y la traducción (es decir, promotor y señales de detención de la transcripción), y a continuación las células anfitrionas se pueden transformar mediante el vector de expresión. El vector de expresión puede integrarse en el genoma celular o simplemente estar presente como material nuclear extracromosómico. La expresión puede ser constitutiva o inducible, aunque la expresión constitutiva resulta adecuada para la mayoría de los propósitos.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del EDG-2 son conocidas y han sido descritas en An *et al.* (1997b) y en el Genbank Accession No. U80811 (Número de acceso U80811 a Genbank), que se incorporan en la presente por referencia. Una molécula de ácido nucleico que codifica el EDG-2 tiene una secuencia de nucleótidos según el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia N° 1):

	atggctgcca tctctacttc catccctgtt atttcacagg cccagttcac agccatgaat	60
35	gaaccacagt gcttctacaa cgagtccatt gccttctttataaccgaag tggaaagcat	120
	cttgcacag aatggAACAC agtcagcaag ctggtgatgg gacttggaat cactgtttgt	180
	atcttcatca tggtggccaa cctattggtc atggggcaa tctatgtcaa ccgcgccttc	240
	catttecta ttattacat aatggctaatt ctggctgtcg cagacttctt tgctgggttg	300
	gcctacttct atctcatgtt caacacagga cccaaacttgggactgtgac tgtracaca	360
40	tggctctgc gtcaggggctt cattgacacc agccgtacgg catctgtggc aaacttactg	420
	gcattgtcaa tcgagaggca cattaegtt ttcggcatgc agtccacac acggatgagc	480
	aaccggcggt tagtgggtgtt cattgtggtc atctggacta tggccatgt tatgggtgt	540
	ataccaggta tgggctggaa ctgtatctgt gatattggaaa attgttccaa catggcaccc	600
	ctctacagtg actcttaattt agtcttctgg gccatttca acttgggtgac ctttgtggta	660
45	atgggtgttc tctatgtotca catctttggc tatgttgc agaggactat gagaatgtct	720
	cgccatagtt ctggaccccg gccggaaatgg gataccatga tgagtcttc gaagactgtg	780
	gtcattgtgc ttggggcctt tatacatgtc tggactcctg gatgggtttt gttacttcta	840
	gacgtgtgtct gtccacagtg cgacgtgtcg gcctatgaga aattttctt tctctgtct	900
50	gaattcaact ctgcoatgaa cccoaatcatt tactcttacc ggcacaaaga aatgagcgcc	960
	accttttaggc agatcccttg ctgccagcgc agtgagaaacc ccacggggccc cacagaaagc	1020
	tcaagacgtctt cggcttccttc cctcaaccac accatcttgg ctggagttca cagcaatgac	1080
	cactctgtgg tttag	1095

55 El receptor EDG-2 codificado tiene una secuencia de aminoácidos según el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia N° 2):

	MAAISTSIPIV ISQPQFTAMN EPQCIFYNESI AFFYNRSGKIH LATEWNTVSK LVMGLGITVC	60
60	IFIMLANLLV MVAIYVNRRF HFPIIYILMAN LAAADFFAGL AYFYLMFNTG PNTRRLTVST	120
	WLLRQGLIDT SITASVANILL AIAIERHITV FRMQLHTRMS NRREVVVIVV IWTMAIVMGA	180
	IPSVGWNICIC DIENCSXMAP LYSDSYLVFW AIFNLVTFVV MVVLYAHIFG YVRQRTMRMS	240
	RHSSGPRRNR DTMMSSLKTV VIVLGAFIIC WTPGLVLLL DVCCPQCDVL AYERPFLLL	300
	EFWNSAMNPII YSYRDKEMSA TFRQILCCQR SENPTGPTES SDRSASSLNH TILAGVHSND	360
65	HSV	364

ES 2 298 227 T3

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del EDG-4 son conocidas y han sido descritas en An *et al.* (1998b) y en el Genbank Accession No. NM_004720 (Número de acceso NM_004720 a Genbank), que se incorporan en la presente invención por referencia. Una molécula de ácido nucleico que codifica el EDG-4 tiene una secuencia de nucleótidos según el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia N° 3):

5

atggtcata	tggcccaagt	ctactacaac	gagaccatcg	gtttcttcta	taacaacagt	60
ggcaaagage	tcatgtccca	ctggcgccc	aaggatgtgg	tctgtggcgc	actggggctg	120
accgttgcg	tgttgtgtct	gttgaccaat	ctgttgtca	tagcagccat	cgcctccaac	180
cggcgottco	accatggccat	ctactacctg	ctggcaatc	tggcggggc	tgacatottc	240
gcggggcggtgg	cctacctttt	cctcatgttc	cacactggtc	ccgcacacgc	ccgactttca	300
cttgagggtct	ggttcttgcg	gcagggttgc	ctggacacaa	gcctcaotgc	gtgggtggcc	360
<hr/>						
acactgtctgg	ccatcgccgt	ggagcgccac	cgcaagtgtga	tggccgtgca	gtgcacacgc	420
cgccctggcccc	gtggcccggt	ggtcatgttc	attgtggggcg	tgtgggtggc	tgccctgggc	480
ctgggggtgtc	tgcctgcaca	ctcttggcac	tgccctgtgt	ccctggaccc	ctgtcaacgc	540
atggcaccccc	tgctcagccg	ctccctatgg	gccgtctggg	ctctgtcgag	cctgtttgtc	600
ttccctgtca	tgggggtgt	gtacacccgc	attttttttt	acgtgeggcg	gcgagtgcag	660
cgcacatggcag	agcatgtcag	ctgcccacccc	cgataccggag	agaccacgt	caggctggtc	720
aagactgttg	tcatcatect	gggggggttc	gtggctctgt	ggacaccagg	ccaggtggta	780
ctgttcctgg	atggtttagg	ctgtgagttc	tgcaatgtcc	tggctgtaga	aaagtacttc	840
ctactgttgg	ccgaggccaa	ctcaactggtc	aatgtgtgt	tgtacttttgc	cogagatgt	900
gagatgcgcgc	gcaccttccg	ccgccttctc	tgttgtggcg	gccttcggca	gtccacccgc	960
gagttgttcc	actatacatac	ctctgccccag	ggaaqgtgcca	gcactcgcat	catgtttttcc	1020
gagaacccggcc	accacactgtat	ggactccacc	cttttag			1056

30

El receptor EDG-4 codificado tiene una secuencia de aminoácidos conforme con el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia Nº 4):

25

MVIMGQCYYN	ETIGFFYNNNS	GKELSSHWRP	KDVVVVALGL	TVSVLVLLTN	LLVIAAIASN	60
RRFHQPIVYL	LGNLAAADLP	AGVAYLFLMF	HTGPRTARLS	LEGWPLRQGL	LDTSLTASVA	120
TLLAIAPERH	RSVMAVQLHS	RLPRGRVVML	IVGVWVVAALG	LGLLPAAHSH	CICCALDRCSR	180
MAPLLSRSYLV	AVWALSSLLV	FLLMVAVYTR	I FFYVRRRVQ	RMAEHVSCHP	RYRETTTLSV	240
KTVVIIILGAF	VVCWTGQVV	LLLLDGLGCES	CNVLAKEYF	LLLAEANSLV	NAAVYSCRDA	300
EMBRTERILL	CCACILOSTR	ESVHYTSSAO	GGASTRIMLP	ENGHPLMDST	L	351

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del EDG-7 son conocidas y han sido descritas en Bandoh *et al.* (1999) y en el Genbank Accession No. NM_012152 (Número de acceso NM_012152 a Genbank), que se incorporan en la presente invención por referencia. Una molécula de ácido nucleico que codifica el EDG-7 tiene una secuencia de nucleótidos conforme con el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia Nº 5):

43

atgaaatggat	gtcaactatga	caagcacatg	gactttttt	ataataggag	caacactgat	60
actgtcgatg	actggacagg	aacaagctt	tgattgttt	tgtgtgtgg	gacgttttc	120
tgcctgttta	tttttttttc	taatttcctg	gtcatcgccc	cagtatcaa	aaacagaaaa	180
tttcatatcc	ccttctacta	ctgttggct	aatttagctg	ctgccgattt	cttcgtctgg	240
attgcctatg	tattcctgat	gtttaacaca	ggcccagtt	caaaaacttt	gactgtcaac	300
cgctgggttc	tccgtcaggg	gttctggac	atgtacttga	ctgttccct	caccaacttg	360
ctgggtatcg	ccgtggagag	gcacatgtca	atcatgagga	tgcgggtcca	tagcaacctg	420
accaaaaaga	gggtgacact	gtttoattttg	tttgtctggg	ccatcgccat	tttatgggg	480
goggtccccca	cactgggctg	gaattgcctc	tgcaacatct	ctgcctgtc	tccccggcc	540
cccatttaca	gcaggagtt	ccttgttttc	tggacagtgt	ccaaacctcat	ggccttcccte	600
atcatgttg	tgggtgtacct	gcggatctac	gtgtacgtca	agaggaaaac	caacgttttg	660
tctccgcata	caagtgggtc	cateagccgc	cgaggagacac	ccatgaagct	aatgaagaacg	720
gtgatgactg	tcttaggggc	gtttgtgtt	tgtgtggaccc	egggcctgggt	ggttctgttc	780
ctcgacggcc	tgaactgcag	gcagtgtggc	gtgcagcatg	tgaasaggtg	gttctgtctg	840
ctggcgctgc	tcactactgt	cgtgaacccc	atcatctact	cctacaagga	cgaggacatg	900
tatggcacca	tgaagaagat	gatctgtgc	ttcttotcagg	agaacccaga	gaggcgcccc	960
tctcgatccc	cctcoacagt	cctcagcagg	atgtacacag	gcagccagta	cataaggat	1020
agtattagcc	aagggtgcagt	ctgcataaaa	aqcacttct	aa		1062

ES 2 298 227 T3

El receptor EDG-7 codificado tiene una secuencia de aminoácidos conforme con el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia Nº 6):

5 MNECHYDGHM DPFYNRSMND TVDDWTGTL VIVLCVGTFF CLPIPPSNSL VIAAVIKNRK 60
EHPFPFYLLA NLAADPFG IAYVFLMNT GEVSKTLTVN RWFLROGLLD SSLTASLTNI. 120

10	LVI AVERHMS IMRMRVHSNL TKR VTL LIL LVWAIAIFMG AVPTLGWNCL CNISACSSL A	180
	PIYSRSYLVF NTVSNLMAFL IMVVYLYRIY VVVKRKTNVL SPHTSGSISR RRTPM KLM KT	240
	VMTVLGAFVV CWT PGL VVLL LDGLNCRQCG VQHV KRN FLL LALLNSVVP I I I YSYKD E DM	300
	YGTMKKMICC FSOENPERRP SRIPSTVLSR SDTGSOYIED SISOQAVCNK STS	353

15 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del PSP-24 son conocidas y han sido descritas en Kawasawa *et al.* (2000) y en el Genbank Accession No. AB030566 (Número de acceso AB030566 a Genbank), que se incorporan en la presente invención por referencia. Una molécula de ácido nucleico que codifica el PSP-24 tiene una secuencia de nucleótidos según el siguiente Número identificador de secuencia (Secuencia Nº 7):

20	atggtottctt cggcagtgtt gactgcgttc cataccggga catccaacac aacatttgc gtgtatgaaa acacctacat gaatattaca ctcccccac catccagca tcctgaccc agtcoatgtc ttagatatacg ttttggaaacc atggcttcca ctggggtag ttcccttgacc gtgaatagta cagctgtgcc cacaacacca gcagcattt agagoctaaa cttgcctctt cagatccaccc ttctgttat aatgtatcc attctgtttg tgcttttctt tggaacttg gttgggttgc ccatggttt caaaaagct gccatgagggt ctgcaattaa catectcatt gccagccatg ctttgcaga catgtgttgc gcagtgctt acatggccctt tgccctgtt actatttcta ctaccogatg gatttttggg aaattttttt gttaggttac tgctatgttt ttctggttat ttgtataga aggagtagcc atctgtctca tcatttagcat agataggcc cttattatag tccagaggca ggataagota aacccatata gagctaagggt tctgatttca gtttcttggg caacttcctt ttgtgtatgtt tttcttttag ccgtaggaaa ccccgaccc cagataccctt cccgagctcc ccagtggttgc ttgggttaca caaccaatcc aggttaccag gtttatgtga ttttggatttc ttcatttttctt ttottoatac ctttctgtt aataactgtac tcattttatgg gcatactcaa cacccttggg cacaatgcct tgaggatcca tagctaccc gaaggatatac gcttcagccaa ggccagcataa ctgggttca tgagtcttgoa gagacccctt cagatgagca ttgacatggg cttaaaaaca cgtgccttca ccactatccc gatttttttctt gtgtcttca ttgtctgttgc ggccccatcc accacttaca gcttgcggc aacatttca aaggactttt actatcagca caactttttt gagatttgc cctggctact gttggctcttgc tacctcaagt ctgcattgaa tccgctgttcc tactacttgc ggatttayaa attccatgtt gttgccttgg acatgtatgccc taagtcccttca aagtttttgc cgcagctccc tggtcacaca aaggcagccga tacgttcttgc tgctgttcat gtgtgtgggg aacatccqac qtttgttqta	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260
25		
30		
35		
40		

45 El receptor PSP-24 codificado tiene una secuencia de aminoácidos conforme con el siguiente Número identificador
46 [\(Savchenko, N8 89\)](#)

50	MVPSAVLTAF HTGTSENTTFV VYENTYMNIT LPPPFQHPDL SPLLRYSFET MAPTGLSSLT VNSTAVPTTP AAPKSLNLPL QITLSAIMIF ILFVSFLGNL UVCLMVYQKA AMRSAINILL ASLAFAOMLL AVLNMPFPALV TILTTRWIFG KFFCRVSAMP PWLFVIEGVA ILLIISIDRP LIIVQRQDKL NPYRAKVLIA VSWATSFCAV FPLAVGNPDL QIPSRAPOCV FGTTTNPGYQ AYVILISLIS FFIPFLVILY SFMGILNTRL HNALRIHSYP EGICLSQLASK LGILMSLQRPF QMSIDMGFKT RAFTTILILF AVFIVCWAPP TTYSLVATFS KEFYTYQHNFF EISTWLLWLC YLKSALNPLI YYWRIKKFHD ACLODMMPKSP KELPOLPGHT KRRIRPSAVV VCGGRHRTVV	60 120 180 240 300 360 419
55		

Característicamente, los agonistas de los receptores del LPA inducirán actividad similar a la del LPA en un receptor del LPA; dicha actividad se puede medir químicamente, por ejemplo, midiendo la corriente de Ca^{2+} o de Cl^- en los oocitos, o bien, se pueden examinar los cambios en la morfología, motilidad o proliferación celular, etc. Por contra, los antagonistas de los receptores del LPA bloquean la actividad similar a la del LPA en los receptores del LPA. Este bloqueo también se puede medir químicamente, por ejemplo, midiendo la corriente de Ca^{2+} o de Cl^- en los oocitos, o examinando los cambios en la morfología, motilidad o proliferación celular, etc.

Como se ha expuesto anteriormente, el LPA es una molécula señalizadora que participa en una serie de rutas celulares diferentes en las que se produce señalización mediante receptores del LPA, incluidos los receptores del LPA que se han descrito anteriormente en la presente invención. Por lo tanto, se espera que los compuestos de la presente

ES 2 298 227 T3

invención modulen los efectos del LPA sobre el comportamiento celular, actuando bien como antagonistas de los receptores del LPA, bien como agonistas de los receptores del LPA.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso, en el tratamiento del cáncer, de un compuesto de la presente invención, y a la administración de una cantidad eficaz del compuesto a un paciente, de una manera eficaz para tratar el cáncer. Entre los tipos de cáncer que se pueden tratar con los compuestos de la presente invención figuran los caracterizados por presentar células cancerosas cuyo comportamiento es atribuible, al menos en parte, a la actividad mediada por el LPA. Habitualmente, estos tipos de cáncer se caracterizan por presentar células cancerosas que expresan uno o más tipos de receptores del LPA. Formas representativas de estos tipos de cáncer son, entre otras, el cáncer de próstata y el cáncer de ovario.

Los compuestos de la presente invención que resultan particularmente útiles en el tratamiento del cáncer son los antagonistas de los receptores del LPA.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar sistémicamente o directamente en un lugar concreto del cuerpo en el que haya células cancerosas presentes. La administración de dichos compuestos se puede realizar de cualquier manera que sea eficaz para hacer llegar el compuesto concreto a las células cancerosas. Sin limitarnos a la teoría, podemos decir que se cree que los antagonistas de los receptores del LPA, al unirse a los receptores del LPA, inhibirán la proliferación o la metástasis de las células cancerosas, o que destruirán dichas células cancerosas. Como se indica en el Ejemplo 12 (véase más adelante), varios compuestos antagonistas de los receptores del LPA de la presente invención resultaron citotóxicos para líneas celulares de cáncer de próstata que expresan uno o más receptores del LPA del tipo que se ha descrito anteriormente.

A la hora de administrar los compuestos antagonistas de los receptores del LPA o las composiciones farmacéuticas de la presente invención para tratar el cáncer, la composición farmacéutica puede también contener otros principios activos terapéuticos o incluir otros tratamientos, o puede administrarse junto con otros principios activos terapéuticos o tratamientos, ya sea conocidos actualmente o desarrollados en un futuro para el tratamiento de los diversos tipos de cáncer.

La invasión cancerosa es un proceso complejo, integrado por varios pasos, en el que células o conjuntos de células se desprenden del tumor primario, alcanzan la circulación sistémica o el sistema linfático, y se distribuyen o difunden a distintos órganos (Liotta *et al.*, 1987). Durante este proceso, las células tumorales deben detenerse en los capilares, extravasarse y migrar hasta el estroma del tejido con el fin de establecer focos secundarios. En primer lugar, las células tumorales deben reconocer señales de una célula endotelial que las haga desviarse de la circulación. En segundo lugar, las células tumorales deben fijarse a la glicoproteína laminina de la membrana basal mediante los receptores de la laminina presentes en la superficie celular. Tras fijarse a la membrana basal, las células tumorales secretan proteasas que degradan la membrana basal. Tras la fijación y la proteólisis local, el tercer paso de la invasión es la migración de las células tumorales. La motilidad celular desempeña una función crucial en la invasión y metástasis tumoral. La relación existente entre la motilidad de las células tumorales *in vitro* y el comportamiento metastásico en los experimentos llevados a cabo en animales indica que existe una fuerte correlación directa (Hoffman-Wellenhof *et al.*, 1995). Es un hecho bien documentado que los PLGFs promueven la proliferación y aumentan la invasividad de las células cancerosas *in vitro*. Imamura y otros demostraron que las células cancerosas necesitan factores del suero para llevar a cabo sus invasiones (Imamura *et al.*, 1991), y a continuación identificaron el LPA como el componente sérico más importante que es plenamente capaz de restaurar la invasión por parte de las células tumorales en sistemas en los que no hay suero (Xu *et al.*, 1995a; Imamura *et al.*, 1993; Mukai *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que los PLGFRs se expresan en líneas celulares de cáncer de ovario, concretamente, en las células OCC1 y HEY. Específicamente, los análisis mediante TI-PCR demuestran la presencia de receptores EDG-2 y EDG-7 en dichas líneas celulares. Recientemente, Im *et al.* (2000) demostraron que el EDG-7 se expresa en líneas celulares de cáncer de próstata, concretamente, en las células PC-3 y LNCaP. Los análisis mediante TI-PCR de las líneas celulares de cáncer de próstata DU-145, PC-3 y LNCaP demostraron que el EDG-2, el EDG-4, el EDG-5 y el EDG-7 están presentes en esas tres líneas celulares de cáncer de próstata, y que el EDG-3 está presente en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y DU-145.

Como se indica en los Ejemplos, varios antagonistas de los receptores del LPA de la presente invención son capaces de dirigirse contra líneas celulares de cáncer de próstata concretas y líneas celulares de cáncer de ovario concretas. Por lo tanto, los antagonistas de los receptores del LPA de la presente invención brindan un procedimiento alternativo para el tratamiento de los cánceres mediados por el LPA, incluidos el cáncer de próstata y el cáncer de ovario.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso, para el aumento de la proliferación celular, de los compuestos de la presente invención. Con el fin de poder usar dichos compuestos para aumentar la proliferación celular, hay que llevar a cabo dos pasos: proveer un compuesto de la presente invención que tenga actividad como agonista de un receptor del LPA, y poner en contacto un receptor del LPA en una célula con el compuesto, de una manera eficaz para aumentar la proliferación, inducida por el receptor del LPA, de la célula.

Además de las funciones que el LPA desempeña en la modulación de la actividad de las células cancerosas, existen pruebas firmes que sugieren que el LPA también desempeña una función fisiológica en la cicatrización natural de las heridas. Se cree que el LPA derivado de las plaquetas activadas es responsable, al menos en parte, de la estimulación

de la proliferación celular en los lugares de las heridas, así como de la inflamación, posiblemente en sincronía con otros factores derivados de las plaquetas (Balazs *et al.*, 2000). Además, el LPA por sí mismo induce la agregación plaquetaria, que a su vez puede ser el factor que inicia un elemento de retroalimentación positiva sobre la respuesta agregadora inicial (Schumacher *et al.*, 1979; Tokumura *et al.*, 1981; Gerrard *et al.*, 1979; Simon *et al.*, 1982).

5

Dada la función que el LPA desempeña en la proliferación celular, los compuestos que tienen actividad agonista de los receptores del LPA se pueden utilizar de manera eficaz para promover la cicatrización de las heridas.

El objetivo principal del tratamiento de las heridas es lograr el cierre de éstas. Las heridas cutáneas abiertas constituyen una categoría importante de heridas, y son, entre otras, las heridas por quemadura, las úlceras neuropáticas, las úlceras por presión, las úlceras por insuficiencia venosa y las úlceras diabéticas. Las heridas cutáneas abiertas suelen cicatrizar mediante un proceso que consta de seis componentes principales: i) inflamación, ii) proliferación de fibroblastos, iii) proliferación de vasos sanguíneos, iv) síntesis de tejido conjuntivo, v) epitelización y vi) contracción de la herida. Cuando estos componentes, ya sea cada uno por su cuenta o de forma conjunta, no funcionan correctamente, la cicatrización de las heridas se ve alterada. Hay numerosos factores que pueden afectar a la cicatrización; entre otros, la malnutrición, las infecciones, los fármacos (por ejemplo, la actinomicina y los corticoesteroides), la diabetes o la edad avanzada (véase Hunt y Goodson, 1988).

Se ha demostrado que los fosfolípidos son importantes reguladores de la actividad celular, incluida la mitogénesis (Xu *et al.*, 1995b), la apoptosis, la adhesividad celular y la regulación de la expresión de los genes. En concreto, por ejemplo, el LPA produce efectos similares a los de los factores de crecimiento sobre la proliferación celular (Moolenaar, 1996) y sobre la migración celular (Imamura *et al.*, 1993). Además, se ha sugerido que el LPA desempeña una función en la regeneración y la cicatrización de las heridas (Tigyi y Miledi, 1992).

En general, las sustancias que promueven una afluencia más rápida de fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales hacia las heridas deberían aumentar la velocidad de cicatrización de las heridas. Es posible identificar y probar, en una serie de modelos *in vitro* e *in vivo*, compuestos que resulten útiles como tratamiento para la cicatrización de las heridas.

Los sistemas *in vitro* constituyen un modelo de diferentes componentes del proceso de cicatrización de las heridas, por ejemplo, el retorno de las células a una monocapa confluente "herida" de células de cultivos tisulares, por ejemplo, fibroblastos (Verrier *et al.*, 1986), células endoteliales (Miyata *et al.*, 1990) o células epiteliales (Karthä *et al.*, 1992). Otros sistemas permiten medir la migración o proliferación de las células epiteliales (Muller *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1988).

Los modelos *in vivo* de la cicatrización de las heridas son también bien conocidos para aquellos cualificados en la materia, y son, por ejemplo, la epidermis herida (lesionada) porcina (Ohkawara *et al.*, 1977) o las lesiones de mucosa oral inducidas por fármacos en el abazón de hámster (Cherrick *et al.*, 1974).

Los compuestos que se muestran eficaces para la cicatrización de las heridas se pueden administrar también combinados (es decir, dentro de la misma composición farmacéutica o mediante administración simultánea por vías diferentes) con un medicamento seleccionado de un grupo que consiste en un fármaco antibacteriano, un fármaco antivírico, un fármaco antifúngico, un fármaco antiparasitario, un fármaco antinflamatorio, un fármaco analgésico, un fármaco antipruriginoso, o con una combinación de estos fármacos.

Para la cicatrización de las heridas, un modo de administración preferido es la vía tópica. No obstante, el fármaco se puede administrar, como alternativa o a la vez, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o transdérmica. Asimismo, como alternativa, o a la vez, el fármaco se puede administrar por vía oral. La dosis administrada dependerá de la edad, el estado general de salud y el peso del paciente, del tipo de tratamiento simultáneo que se le esté administrando (si se le está administrando alguno), de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto que se desea lograr.

Para las aplicaciones tópicas preferidas, especialmente a la hora de tratar seres humanos y animales que presentan una herida, se prefiere administrar una cantidad eficaz del compuesto en la zona herida, por ejemplo, superficies cutáneas. Generalmente esta cantidad oscilará entre 0,001 mg y 1 g por aplicación, en función del área que se deba tratar, de la gravedad de los síntomas y de la naturaleza del vehículo tópico empleado. Una preparación tópica preferida es una pomada en la que se usen de unos 0,01 a unos 50 mg del principio activo por ml de base de la pomada, tal como PEG-1000.

60

Ejemplos

Los siguientes ejemplos tienen como intención ilustrar, y de ningún modo limitar, el ámbito de la presente invención, que se expone en las reivindicaciones anexas. Los compuestos que se preparen conforme a los Ejemplos 3, 6, 7, 8 y 9 recaen fuera del ámbito de las reivindicaciones.

ES 2 298 227 T3

Materiales y procedimientos

Para medir todos los puntos de fusión, que no hubo que corregir, se empleó un equipo Thomas-Hoover de medición del punto de fusión en tubos capilares.

5 Se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en disolución de ^1H y ^{13}C en un espectrómetro Bruker AX 300 (300, a 75,5 MHz). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en forma de partes por millón (ppm) en relación con el tetrametilsilano (TMS). Los picos se abrevian de la siguiente manera: s - singlete; d - doblete; t - triplete; c - cuarteto; sa - singlete ancho; m - multiplete; ma - multiplete ancho; dd - doble doblete; etc.

10 Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear del protón, del carbono-13 y del fósforo-31 en un espectrómetro Bruker AX 300. Los desplazamientos químicos para el protón y para el carbono-13 se notifican en forma de partes por millón (δ) en relación con el tetrametilsilano (TMS). Los espectros para el fósforo-31 se notifican en forma de partes por millón (δ) en relación con trifenilfosfato 0,0485 M en acetona-d₆ a $\delta = 0$ ppm.

15 15 Se registraron los espectros de infrarrojos (IR) en un Sistema 200-FTIR de Perkin Elmer.

20 Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Bruker Esquire AG o en un espectrómetro Bruker Esquire LC/MS por infusión directa empleando la Interfaz de Electrospray (ESI) en modo positivo o negativo. Los datos espectrales fueron conformes con las estructuras asignadas.

La empresa Atlantic Microlabs, Inc. (Norcross [Georgia], Estados Unidos) realizó análisis elementales, y los valores hallados estaban dentro de un $\pm 0,4\%$ respecto de los valores teóricos.

25 25 Para llevar a cabo la cromatografía en columna flash se empleó gel de sílice (Merck, malla de 230-400, o malla de 200-425, 60A°).

30 Se llevó a cabo cromatografía en capa fina analítica en láminas (para cromatografía en capa fina) de gel de sílice 60 F 254 de Sigma-Aldrich, con soportes de aluminio (grosor de 200 a 250 micras).

35 Todos los reactivos, disolventes y medios para cromatografía, a menos que se indique lo contrario, fueron comprados a las empresas Aldrich Chemical Company (Milwaukee [Wisconsin], Estados Unidos), Fisher Scientific (Pittsburg [Pennsylvania], Estados Unidos) o Sigma Chemical Co. (Saint Louis [Missouri], Estados Unidos), sin que se realizase ninguna purificación con posterioridad a su compra. Se secó tetrahidrofurano (THF) por destilación sobre sodio metálico, empleando benzofenona como indicador. Se destiló cloruro de metileno anhidro (CH_2Cl_2) sobre hidruro de calcio (CaH_2). Todos los monoglicéridos se obtuvieron de Nu-Check-Prep (Minneapolis [Minnesota], Estados Unidos). La *t*-Boc-L-serina fue comprada a la empresa Fluka.

40 40 Todos los lípidos fueron comprados a la empresa Avanti Polar Lipids (Alabaster [Alabama], Estados Unidos). En lo que se refiere a la seroalbúmina bovina (BSA), se empleó seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos. Antes de su uso, se formó un complejo integrado por LPA en una proporción molar 1:1, con BSA 1 mM disuelta en una solución salina equilibrada de Hanks, libre de Ca^{2+} , que contenía EGTA 1 mM. Se disolvieron alícuotas de todos los demás lípidos en MeOH (metanol) y se mezclaron con LPA antes de su aplicación, o tal como se indique en cualquier otro caso.

45 45 El reactivo de transfección Cytofectene se compró a la empresa Bio-Rad (Hercules [California], Estados Unidos). El Fura-2 AM se compró a la empresa Molecular Probes (Eugene [Oregón], Estados Unidos).

De la empresa Cellgro (Herndon [Virginia], Estados Unidos) se obtuvieron medios de cultivo, suero fetal bovino y G418.

50 50 Las células RH7777, que expresaban de manera estable el EDG-4 humano, fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Kevin Lynch (Universidad de Virginia, Charlottesville [Virginia], Estados Unidos). Los ADNc (etiquetados con marcadores) que codificaban el EDG-4 y el EDG-7 humanos, insertados en el plásmido de expresión pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad [California], Estados Unidos), fueron un generoso regalo del Dr. Juncen Aoki (Universidad de Tokio [Tokio], Japón). Asimismo, se obtuvieron células RH7777 y NIH3T3 de la American Type Culture Collection (Manassas [Virginia], Estados Unidos). Las células HEY fueron proporcionadas por la Dra. Lisa Jennings (Universidad de Tennessee en Memphis [Tennessee], Estados Unidos). Todas las líneas celulares fueron mantenidas en el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), que contenía suero fetal bovino al 10% y glutamina 2 mM. Los oocitos se obtuvieron de ranas *Xenopus laevis* adultas, como se ha descrito anteriormente (Tigyi *et al.*, 1999).

60 Transfección estable

Se transfectaron células RH7777 con los constructos de ADNc que codificaban el EDG-2, EDG-4 o EDG-7 humano, y a continuación fueron subclonadas en el vector de expresión pCDNA3 empleando el reactivo de transfección Cytofectene según el protocolo del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10% y 1 mg/ml de geneticina. Se recogieron las células resistentes y se subclonaron mediante dilución limitante. Después, los clones resultantes fueron evaluados mediante pruebas funcionales y análisis con TI-PCR. Los datos son representativos de tres clones individuales.

ES 2 298 227 T3

Transfección transitoria

Se colocaron células RH7777 en portaobjetos de vidrio recubiertos de polilisina (Bellco, Vineland [Nueva Jersey], Estados Unidos) un día antes de la transfección. Al día siguiente, se transfecaron las células durante toda la noche (un período de 16 a 18 horas) con 1 µg de ADN plásmido, mezclado con 6 µl de Cytofectene. Después, se enjuagaron las células con DMEM y se cultivaron en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%. Al día siguiente, se enjuagaron las células con DMEM y se extrajo el suero durante un mínimo de 2 horas antes de monitorizar el Ca²⁺ intracelular.

Medición del Ca²⁺ intracelular y análisis de datos

Se monitorizaron los cambios en el Ca²⁺ intracelular empleando el indicador (fluorescente) de Ca²⁺ Fura-2 AM descrito anteriormente (Tigyi *et al.*, 1999). Los puntos de datos de las mediciones del Ca²⁺ intracelular representan el área pico total de los incrementos transitorios de Ca²⁺ provocados según lo determinado mediante el software FL WinLab (Perkin-Elmer, Wellesley [Massachusetts], Estados Unidos). Los puntos de los datos representan el promedio de al menos 3 mediciones ± la desviación estándar. La significación estadística de los puntos de los datos se determinó mediante la prueba T de Student y los valores fueron considerados significativos a p < 0,05.

Registro electrofisiológico en oocitos de Xenopus

Se registraron las corrientes de Cl⁻ oscilatorias provocadas por el LPA, empleando un sistema de fijación de voltaje, de dos electrodos, descrito anteriormente (Tigyi *et al.*, 1999).

Análisis mediante TI-PCR del ARNm de EDG y PSP24

Se llevó a cabo, mediante TI-PCR (TI = transcriptasa inversa; PCR = reacción en cadena de la polimerasa), la identificación del ARNm para los receptores EDG y PSP24, de la forma descrita anteriormente (Tigyi *et al.*, 1999), empleando las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

EDG-1

Cebador directo 5'-₈₁TCATCGTCCGGCATTACAACTA-3' (SEC.-ID-Nr. 9);

Cebador inverso 5'-GAGTGAGCTTGTAGGTGGTG₃₅₁-3' (SEC.-ID-Nr. 10);

EDG-2

Cebador directo 5'-₆₅AGATCTGACCAGCCGACTCAC-3' (SEC.-ID-Nr. 11);

Cebador inverso 5'-GTTGGCCATCAAGTAATAAATA₄₂₂-3' (SEC.-ID-Nr. 12);

EDG-3

Cebador directo 5'-₁₃₇CTTGGTCATCTGCAGCTTCATC-3' (SEC.-ID-Nr. 13);

Cebador inverso 5'-TGCTGATGCAGAAGGCAATGTA₅₉₇-3' (SEC.-ID-Nr. 14);

EDG-4

Cebador directo 5'-₆₃₄CTGCTCAGCCGCTCCTATTG-3' (SEC.-ID-Nr. 15);

Cebador inverso 5'-AGGAGCACCCACAAGTCATCAG₁₁₈₅-3' (SEC.-ID-Nr. 16);

ES 2 298 227 T3

EDG-5

Cebador directo 5'-₁₁ATGGGCAGCTTGTACTCGGAG-3' (SEC.-ID-Nr. 17);

Cebador inverso 5'-CAGCCAGCAGACGATAAAGAC₇₂₀-3' (SEC.-ID-Nr. 18);

EDG-6

Cebador directo 5'-₂₈₀TGAACATCACGCTGAGTGACCT-3' (SEC.-ID-Nr. 19);

Cebador inverso 5'-GATCATCAGCACCGTCTTCAGC₇₉₀-3' (SEC.-ID-Nr. 20);

EDG-7

Cebador directo 5'-₉₁AGCAACACTGATACTGTCGATG-3' (SEC.-ID-Nr. 21);

Cebador inverso 5'-GCATCCTCATGATTGACATGTG₄₄₆-3' (SEC.-ID-Nr. 22);

EDG-8

Cebador directo 5'-₈₈ATCTGTGCGCTCTATGCAAGGA-3' (SEC.-ID-Nr. 23);

Cebador inverso 5'-GGTAGATGATAGGATTTCAGCA₁₁₆₁-3' (SEC.-ID-Nr. 24);

PSP24

Cebador directo 5'-₃₂₀CTGCATCATCGTGTACCAGAG-3' (SEC.-ID-Nr. 25); y

Cebador inverso 5'-ACGAACTCTATGCAGGCCTCGC₁₁₈₄-3' (SEC.-ID-Nr. 26).

45 Prueba de proliferación celular

Se determinó, mediante recuento directo de células, la proliferación de las células NIH3T3, de la forma descrita anteriormente (Tigyi *et al.*, 1999). Se colocaron las células NIH3T3 en placas de 24 pocillos, a una densidad de 10000 células/pocillo, en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%. Al día siguiente se lavaron las células y se las privó de suero, en DMEM, durante 6 horas. Luego se añadieron lípidos durante 24 horas. El número de células se determinó realizando recuentos en un contador Coulter (de la empresa Coulter Electronics, Hialeah [Florida], Estados Unidos).

Incorporación de ³H-timidina

55 La incorporación de ³H-timidina a las células RH7777 se determinó de la manera descrita anteriormente (Tigyi *et al.*, 1994).

Ejemplo 1

60 Síntesis de *N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona*

Compuesto intermedio 25

65 Se equipó un matraz de tres bocas de 500 ml de un termómetro para bajas temperaturas y de un embudo de goteo de 100 ml. Todos los utensilios de vidrio se secaron a la llama y se enfriaron hasta que alcanzaron la temperatura ambiente bajo argón (Ar) antes de su uso. Al matraz se le añadió trifenilfosfina (Ph₃P) (10 gr, 38 mmol, secada sobre P₂O₅ en condiciones de vacío durante 72 horas) y THF recién destilado (190 ml). Se enfrió y agitó la solución a -78°C (baño de hielo seco-acetona) bajo argón. Agitando vigorosamente, se añadió dietil azodicarboxilato (DEAD)

ES 2 298 227 T3

(6,2 ml, 39,9 mmol) mediante una jeringuilla a lo largo de un período de 30 minutos. Una vez finalizada la adición, se agitó la mezcla (durante unos 30-40 minutos) hasta obtener una pasta blanca lechosa. A esta mezcla de reacción se le añadió, gota a gota, a lo largo de un período de 45 minutos, una solución de N-(*ter*-butoxicarbonil)-L-serina (24) (7,79 gr, 38 mmol, secada sobre P₂O₅ en condiciones de vacío durante 72 horas) en THF recién destilado (75 ml). La mezcla obtenida fue agitada durante toda la noche a -78°C bajo argón y luego se dejó que se calentase hasta alcanzar 0°C (cuando la temperatura alcanzó -10°C, se colocó el matraz en un baño de hielo). Transcurridos aproximadamente 30 minutos, el baño de hielo se reemplazó con un baño María, se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas, y se concentró dicha mezcla de reacción en un evaporador rotatorio hasta obtener un aceite de color amarillo pálido a 30°C. Después, este aceite fue tratado con hexanos/EtOAc al 25% (100 ml) y el sólido de color blanco resultante fue extraído mediante filtración y lavado con hexanos/EtOAc al 25% (2 x 70 ml); el filtrado combinado fue concentrado, y el aceite residual fue sometido a cromatografía en columna flash sobre gel de sílice con hexanos/EtOAc al 25% (500 ml) y al 30% (1500 ml), sucesivamente.

Se combinaron las fracciones adecuadas para obtener 3,4 g (47%) de 25 en forma de sólido blanco: pf (punto de fusión) 119-121°C dec. (Lit. 119,5-120,5°C dec.); RMN ¹H (CD₂Cl₂) δ 1,44 (s, 9H), 4,38-4,42 (m, 2H), 4,96-5,03 (c, J₁ = 6,1 Hz, J₂ = 12,5 Hz, 1H), 5,39 (s, br 1H); RMN ¹³C (CD₂Cl₂) δ 28,31, 60,01, 66,63, 81,50, 155,01, 169,94; IR (KBr) 3361, 2978, 1843, 1680, 1533, 1370, 1292 cm⁻¹; análisis calculado para C₈H₁₃NO₄: C, 51,33; H, 6,94; N, 7,50. Encontrado: C, 51,41; H, 7,01; N, 7,51.

20 Ejemplo 2

Síntesis de los compuestos 26-34

25 Los utensilios de vidrio que se emplearon se secaron a la llama y se enfriaron hasta que alcanzaron la temperatura ambiente en atmósfera de argón. La reacción se llevó a cabo en atmósfera de argón. Se destiló el THF antes de usarlo.

Compuesto 26

30 ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-(nonilamino)-2-oxoetil]carbamato

Se añadió N-(*ter*-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (300 mg, 1,60 mmol) a una solución de decilamina (490 mg, 3,20 mmol) en THF (60 ml) y se hizo refluir esta mezcla a lo largo de toda la noche bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

35 Se mezclaron las fracciones adecuadas, y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 290 mg (52%) de 26 en forma de polvo ceroso de color blanco: pf 50-52°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,26 (s, 14H), 1,46 (s, 9H), 3,04 (sa, 1H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 4,06-4,15 (m, 2H), 5,53 (sa, 1H), 6,63 (sa, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 1409, 22,65, 26,80, 28,27, 29,24, 29,27, 29,37, 29,50, 29,51, 31,86, 39,43, 54,34, 62,87, 77,20, 80,34, 171,52; IR (KBr) 3282, 3098, 2929, 2856, 1666, 1547, 1467, 1369, 1300, 1248, 1179 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₆H₃₂N₂O₄: C, 62,76; H, 10,53; N, 8,13. Encontrado: C, 63,00; H, 10,46; N, 7,98.

Compuesto 27

45 ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-oxo-2-(tetradecilamino)-etil]carbamato

Se añadió N-(*ter*-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (200 mg, 1,06 mmol) a una solución de tetradecilamina (273 mg, 1,28 mmol) en THF (40 ml) y se hizo refluir esta mezcla a lo largo de toda la noche bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

55 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 245 mg (57%) de 27 en forma de polvo de color blanco: pf 59-62°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,88 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,25 (s, 24H), 1,45 (s, 9H), 3,15-3,36 (m, 3H), 3,63-3,65 (m, 1H), 4,07-4,13 (m, 2H), 5,60-5,63 (m, 1H), 6,72 (sa, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 14,10, 22,66, 26,81, 27,99, 28,27, 29,25, 29,33, 29,37, 29,50, 29,57, 29,62, 29,66, 31,90, 39,47, 54,58, 62,87, 77,20, 80,52, 156,34, 171,37; IR (KBr) 3345, 2920, 2852, 1708, 1688, 1655, 1637, 1572, 1529, 1472, 1248, 1173 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₂H₄₄N₂O₄: C, 65,96; H, 11,07; N, 6,99. Encontrado: C, 66,04; H, 11,17; N, 6,96.

60 Compuesto 28

ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-(octadecilamino)-2-oxoetil]carbamato

65 Se añadió N-(*ter*-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (300 mg, 1,60 mmol) a una solución de octadecilamina (516 mg, 2,08 mmol) en THF (60 ml) y se hizo refluir esta mezcla a lo largo de toda la noche bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

ES 2 298 227 T3

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 300 mg (41%) de 28 en forma de polvo de color blanco: pf 69-71°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,88 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,25 (s, 30H), 1,46 (s, 9H), 3,03 (sa, 1H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 4,05-4,21 (m, 2H), 5,64 (sa, 1H), 6,62 (sa, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 14,10, 22,68, 26,81, 28,28, 29,25, 29,35, 29,51, 29,58, 29,69, 31,91, 39,43, 54,29, 62,87, 77,20, 171,53; IR (KBr) 3345, 2919, 2852, 1687, 1636, 1570, 1528, 1473, 1305, 1173 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₆H₅₂N₂O₄ · 0,2C₄H₈O₂: C, 67,86; H, 11,39; N, 5,91. Encontrado: C, 67,59; H, 11,46; N, 6,1.

Compuesto 29

ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-oxo-2-[4-tetradeciloxi]anilino]etil]carbamato

Se añadió N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (91 mg, 0,490 mmol) a una solución de 4-(tetradeciloxi)anilina (150 mg, 0,490 mmol) en THF (40 ml) y se hizo refluir esta mezcla durante 48 horas bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash (dos veces), eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 110 mg (45%) de 29 en forma de polvo de color blanco: pf 92-94°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,25 (s, 22H), 1,48 (s, 9H), 1,76 (m, 2H), 3,67-3,72 (dd, J₁ = 4,9 Hz, J₂ = 7,2 Hz, 1H), 3,92 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 4,23-4,26 (m, 2H), 5,65 (sa, 1H), 6,83-6,87 (m, J₀ = 8,9 Hz, 2H), 7,36-7,40 (m, J₀ = 8,9 Hz), 8,6 (sa, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 14,10, 22,69, 26,01, 28,28, 29,25, 29,34, 29,39, 29,56, 29,58, 29,64, 31,91, 62,53, 68,30, 77,20, 111,17, 114,81, 121,70, 130,25, 156,22, 169,78; IR (KBr) 3304, 2920, 2852, 1658, 1514, 1472, 1238, 1174 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₈H₄₈N₂O₅ · 0,05CHCl₃: C, 67,56; H, 9,71; N, 5,62. Encontrado: C, 67,80; H, 9,67; N, 5,60.

Compuesto 30

ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-(4-metoxianilino)-2-oxoetil]carbamato

Se añadió N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (151 mg, 0,8 mmol) a una solución de p-anisidina (100 mg, 0,8 mmol) en THF (20 ml) y se hizo refluir esta mezcla a lo largo de toda la noche bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las cristalizó sobre hexanos/CHCl₃, obteniendo 135 mg (54%) de 30 en forma de polvo de color blanco: pf 109-111°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,48 (s, 9H), 3,68-3,73 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 4,24-4,27 (m, 2H), 5,68 (sa, 1H), 6,83-6,88 (m, J₀ = 9 Hz, 2H), 7,37-7,42 (m, J₀ = 9 Hz, 2H), 8,61 (sa, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 28,29, 54,96, 55,47, 62,54, 81,00, 114,18, 121,78, 130,45, 156,64, 156,98, 169,59; IR (KBr) 3340, 2978, 1673, 1603, 1516, 1298, 1238 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₅H₂₂N₂O₅: C, 58,05; H, 7,15; N, 9,03. Encontrado: C, 58,04; H, 7,17; N, 9,06.

Compuesto 31

ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-oxo-2-[3-(tetradeciloxi)anilino]etil]carbamato

Se añadió N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (91 mg, 0,490 mmol) a una solución de 3-(tetradeciloxi)anilina (179 mg, 0,588 mmol) en THF (25 ml) y se hizo refluir esta mezcla durante 48 horas bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 105 mg (43%) de 31 en forma de polvo de color blanco: pf 70-72°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,26 (s, 22H), 1,48 (s, 9H), 1,76 (m, 2H), 3,67-3,73 (dd, J₁ = 5,1 Hz, J₂ = 6,9 Hz, 1H), 3,93 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 4,23-4,26 (m, 2H), 5,66 (sa, 1H), 6,64-6,68 (m, 1H), 6,93-6,96 (m, 1H), 7,19 (t, J₀ = 8,1 Hz, 1H), 7,23 (t, J_m = 2 Hz, 1H), 8,75 (sa, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 14,11, 22,68, 26,02, 28,28, 29,23, 29,35, 29,39, 29,60, 29,66, 31,92, 62,38, 68,07, 77,20, 106,22, 111,10, 111,92, 129,67, 138,54, 159,75; IR (KBr) 3368, 2918, 2851, 1679, 1618, 1498, 1472, 1286 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₈H₄₈N₂O₅ · 0,05CHCl₃: C, 67,56; H, 9,71; N, 5,62. Encontrado: C, 67,44; H, 9,79; N, 5,57.

Compuesto 32

ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-(3-metoxianilino)-oxoetil]carbamato

Se añadió N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β-lactona (200 mg, 1,06 mmol) a una solución de m-anisidina (171 mg, 1,38 mmol) en THF (30 ml) y se hizo refluir esta mezcla a lo largo de toda la noche bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas, obteniendo 154 mg (46%) de 32 en forma de aceite de color amarillo: RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,48 (s, 9H), 3,68-3,73 (dd, J₁ = 4,8 Hz, J₂ = 6,9 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 4,22-4,25 (d, J = 10,23 Hz,

ES 2 298 227 T3

2H), 5,66 (sa, 1H), 6,66-6,69 (m, 1H), 6,96-6,99 (m, 1H), 7,21 (t, $J_o = 8,1$ Hz, 1H), 7,24 (m, 1H), 8,79 (sa, 1H); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 28,28, 29,68, 55,30, 62,39, 77,20, 81,11, 105,67, 110,55, 112,15, 129,73, 138,63, 160,19, 169,89.

Compuesto 33

5 ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-oxo-2-[2-(tetradeciloxi)anilino]etil]carbamato

Se añadió N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β -lactona (102 mg, 0,545 mmol) a una solución de 2-(tetradeciloxi)anilina (200 mg, 0,645 mmol) en THF (25 ml) y se hizo refluir esta mezcla durante 48 horas bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

10 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 33 mg (<10%) de 33 en forma de aceite de color amarillo: RMN 1H ($CDCl_3$) δ 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,26 (s, 22H), 1,48 (s, 9H), 1,76 (m, 2H), 3,67-3,73 (dd, $J_1 = 5,1$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 1H), 3,93 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 4,23-4,26 (m, 2H), 5,66 (sa, 1H), 6,64-6,68 (m, 1H), 6,93-6,96 (m, 1H), 7,19 (t, $J_o = 8,1$ Hz, 1H), 7,23 (t, $J_m = 2$ Hz, 1H), 8,75 (sa, 1H); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 14,10, 22,68, 25,88, 28,30, 29,17, 29,35, 29,58, 29,64, 29,68, 31,91, 55,73, 63,03, 68,71, 77,20, 111,06, 119,86, 119,86, 120,78, 124,21, 127,27, 147,75, 157,22, 169,25.

20 Compuesto 34

ter-butil N-[1-(hidroximetil)-2-(2-metoxianilino)-2-oxoetil]carbamato

25 Se añadió N-(ter-butoxicarbonil)-L-serina β -lactona (200 mg, 1,06 mmol) a una solución de o-anisidina (238 mg, 1,93 mmol) en THF (30 ml) y se hizo refluir esta mezcla durante 48 horas bajo argón. La mezcla de reacción fue concentrada en un evaporador rotatorio. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

30 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las cristalizó sobre hexanos/ $CHCl_3$, obteniendo 150 mg (45%) de 34 en forma de polvo de color amarillo: pf 92-94°C; RMN 1H ($CDCl_3$) δ 1,49 (s, 9H), 3,87 (s, 3H), 3,73-3,83 (m, 1H), 4,21-4,34 (m, 2H), 5,64 (sa, 1H), 6,86-6,97 (m, 2H), 7,03-7,09 (m, $J_o = 7,80$ Hz, $J_m = 1,8$ Hz, 1H), 8,28-8,31 (dd, $J_o = 8,9$ Hz, $J_m = 1,5$ Hz, 1H), 8,9 (sa, 1H); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 28,28, 55,73, 62,87, 80,65, 110,14, 120,03, 120,97, 124,30, 127,13, 148,33, 169,43; IR (KBr) 3525, 3319, 2982, 1672, 1653, 1548, 1528, 1465, 1256, 1160, 1006 cm^{-1} ; análisis calculado para $C_{15}H_{22}N_2O_5$: C, 58,05; H, 7,15; N, 9,03. Encontrado: C, 58,04; H, 7,07; N, 8,85.

35

Ejemplo 3

Síntesis de los compuestos 35-43

40 Compuesto 35

Trifluoroacetato de N-1-nonil-2-amino-3-hidroxipropanamida

45 Se añadió TFA (1 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 26 (20 mg, 0,0580 mmol) en CH_2Cl_2 (1 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 19 mg (95%) de 35 en forma de sólido de color blanco: pf 168-170°C; RMN 1H (CD_3OD) δ 0,88 (t, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,27 (s, 14H), 1,50 (m, 2H), 3,20 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 3,70-3,78 (m, 1H), 3,81-3,88 (m, 2H); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 14,44, 23,74, 27,96, 30,30, 30,42, 30,47, 30,70, 30,73, 30,78, 30,80, 33,10, 40,71, 56,30, 61,77, 167,97; IR (KBr) 3280, 2919, 2850, 1654, 1573, 1464, 1231, 1141, 1089, 1059 cm^{-1} ; análisis calculado para $C_{13}H_{28}N_2O_2\cdot CF_3COOH$: C, 50,27; H, 8,16; N, 7,82. Encontrado: C, 50,15; H, 8,30; N, 7,95.

55

Compuesto 36

Trifluoroacetato de N-1-tetradecil-2-amino-3-hidroxipropanamida

56 Se añadió TFA (1,5 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 27 (50 mg, 0,124 mmol) en CH_2Cl_2 (1,5 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 48 mg (94%) de 36 en forma de sólido de color blanco: pf 168-171°C; RMN 1H (CD_3OD) δ 0,89 (t, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,28 (s, 22H), 3,22 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 3,73-3,80 (m, 1H), 3,84-3,91 (m, 2H); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 14,43, 23,73, 27,95, 30,29, 30,41, 30,47, 30,69, 30,73, 30,78, 30,80, 33,08, 40,71, 56,29, 61,77, 167,99; IR (KBr) 3277, 2919, 2850, 1656, 1573, 1464, 1231, 1141, 1089, 1059 cm^{-1} ; análisis calculado para $C_{17}H_{36}N_2O_2\cdot CF_3COOH$: C, 55,06; H, 9,00; N, 6,76. Encontrado: C, 54,94; H, 8,99; N, 6,58.

ES 2 298 227 T3

Compuesto 37

Trifluoroacetato de N-1-octadecil-2-amino-3-hidroxipropanamida

5 Se añadió TFA (1 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 28 (25 mg, 0,0547 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 23 mg (92%) de 37 en forma de sólido de color blanco: pf 170-172°C; RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,27 (s, 30H), 1,49-1,54 (m, 2H), 3,22 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,74-3,81 (m, 1H), 3,83-3,91 (m, 2H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,43, 23,74, 27,95, 30,30, 30,41, 30,47, 30,69, 30,78, 33,07, 40,71, 56,30, 61,77, 167,97; IR (KBr) 3276, 2919, 2850, 1657, 1468, 1207, 1181, 1138, 1059 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₁H₄₄N₂O₂·CF₃COOH 0,15CH₂Cl₂: C, 57,53; H, 9,45; N, 5,80. Encontrado: C, 57,45; H, 9,55; N, 5,81.

Compuesto 38

15 *Rrifluoroacetato de N-1-[4-(tetradeciloxi)fenil]-2-amino-3-hidroxipropanamida*

Se añadió TFA (0,050 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 29 (54 mg, 0,110 mmol) en CH₂Cl₂ (0,050 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 55 mg (99%) de 38 en forma de sólido de color blanco: pf 135-139°C; RMN ¹H (CD₃OD), δ 0,89 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,28 (s, 21H), 1,43 (m, 2H), 1,74 (m, J = 6,5 Hz, 2H), 3,86-4,03 (m, 5H), 6,84-6,88 (m, J_o = 9,0 Hz, 2H), 7,41-7,47 (m, J_o = 9,0 Hz, 2H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,42, 23,72, 30,41, 30,46, 30,50, 30,67, 30,74, 33,06, 56,81, 61,72, 69,26, 115,71, 122,96, 131,84, 157,80, 166,06; IR (KBr) 3281, 2920, 2852, 1672, 1604, 1559, 1515, 1240, 1210, 1132 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₃H₄₀N₂O₃·CF₃COOH: C, 59,27; H, 8,16; N, 5,53. Encontrado: C, 59,48; H, 8,09; N, 5,49.

Compuesto 39

30 *Trifluoroacetato de N-1-(4-metoxifenil)-2-amino-3 hidroxipropanamida*

Se añadió TFA (0,049 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 30 (50 mg, 0,161 mmol) en CH₂Cl₂ (0,049 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la concentró en 35 condiciones de vacío hasta secarla, obteniéndose 50 mg (96%) de 39 en forma de sólido de color blanco: pf 182-183°C dec.; RMN ¹H (CD₃OD), δ 3,76 (s, 3H), 3,87-3,94 (m, 1H), 3,97-4,04 (m, 2H), 6,85-6,91 (m, J_o = 9,1 Hz, 2H), 7,44-7,49 (m, J_o = 9,0 Hz, 2H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 55,86, 56,80, 61,73, 115,07, 122,95, 131,99, 158,31, 166,10; IR (KBr) 3278, 3099, 2964, 1673, 1562, 1517, 1196, 1131 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₀H₁₄N₂O₃·CF₃COOH: C, 44,45; H, 4,66; N, 8,64. Encontrado: C, 44,31; H, 4,67; N, 8,58.

Compuesto 40

40 *Trifluoroacetato de N-1-[3-tetradeciloxi)fenil]-2-amino-3-hidroxipropanamida*

45 Se añadió TFA (0,062 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 31 (45 mg, 0,091 mmol) en CH₂Cl₂ (0,062 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 45 mg (99%) de 40 en forma de sólido de color verde amarillento: pf 115-119°C; RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (s, J = 6,5 Hz, 3H), 1,28 (s, 21H), 1,43 (m, 2H), 1,75 (m, J = 6,5 Hz, 2H), 3,8-3,93 (m, 4H), 4,01-4,05 (m, 1H), 6,67-6,71 (m, 1H), 7,04-7,07 (m, 1H), 7,20 (t, J_o = 8,1 Hz, 1H), 7,28 (m, J_m = 2,1 Hz, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,14, 23,75, 27,18, 30,38, 30,49, 30,52, 30,73, 30,78, 33,09, 56,96, 61,66, 69,05, 107,71, 111,75, 113,16, 130,72, 140,16, 161,07, 166,36; IR (KBr) 3266, 2920, 2852, 1676, 1608, 1566, 1496, 1438, 1211, 1130, 1045 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₃H₄₀N₂O₃·CF₃COOH: C, 59,27; H, 8,16; N, 5,53. Encontrado: C, 59,49; H, 8,13; N, 5,41.

Compuesto 41

55 *Trifluoroacetato de N-1-(3-metoxifenil)-2-amino-3-hidroxipropanamida*

60 Se añadió TFA (1 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 32 (120 mg, 0,386 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 123 mg (98%) de 41 en forma de sólido de color crema: pf 137-140°C; RMN ¹H (CD₃OD), δ 3,77 (s, 3H), 3,88-3,99 (m, 2H), 4,01-4,06 (m, 1H), 6,68-6,71 (m, 1H), 7,02-7,10 (m, 1H), 7,22 (t, J_o = 8,1 Hz, 1H), 7,29 (t, J_m = 2,1 Hz, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 55,70, 56,94; 61,67, 107,14, 111,11, 113,28, 130,73, 140,22, 161,61, 166,43; IR (KBr) 3265, 1675, 1609, 1566, 1496, 1433, 1268, 1196, 1044 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₀H₁₄N₂O₃·CF₃COOH: C, 44,45; H, 4,66; N, 8,64. Encontrado: C, 44,52; H, 4,59; N, 8,66.

ES 2 298 227 T3

Compuesto 42

Trifluoroacetato de N-1-[2-(tetradeciloxi)fenil]-2-amino-3-hidroxipropanamida

5 Se añadió TFA (1 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 33 (21 mg, 0,044 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 21 mg (95%) de 42 en forma de sólido de color crema: pf 63-66°C; RMN ¹H (CD₃OD), δ 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 1,27 (s, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,83 (m, J = 7,8 Hz, 2H), 3,90-4,07 (m, 4H), 4,18 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 6,87-6,93 (m, 1H), 6,99-7,02 (m, 1H), 7,08-7,14 (m, 1H), 7,96-7,99 (m, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,43, 23,73, 27,70, 30,27, 30,48, 30,57, 30,79, 33,07, 56,198, 61,67, 69,84, 112,93, 121,40, 123,38, 126,80, 127,53, 150,93, 166,74; IR (KBr) 3282, 2925, 2851, 1679, 1556, 1496, 1458, 1213, 750 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₃H₄₀N₂O₃·CF₃COOH 0,5H₂O: C, 58,24; H, 8,21; N, 5,43. Encontrado: C, 58,59; H, 8,09; N, 5,24.

15 Compuesto 43

Trifluoroacetato de N-1-(2-metoxifenil)-2-amino-3-hidroxipropanamida

20 Se añadió TFA (1 ml), gota a gota en atmósfera de argón, a una solución enfriada (0°C, mediante baño de hielo) de 34 (80 mg, 0,257 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml). Concluida la adición, se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se la concentró a presión reducida a temperatura ambiente, y por último se la secó en una bomba de vacío, obteniéndose 81 mg (97%) de 43 en forma de sólido de color crema: pf 131-133°C; RMN ¹H (CD₃OD), δ 3,88 (s, 3H), 3,91-4,02 (m, 2H), 4,18-4,22 (m, 1H), 6,89-6,94 (m, 1H), 7,01-7,04 (m, 1H), 7,10-7,16 (t, J_m = 8,1 Hz, 1H), 8,00-8,03 (t, J_m = 2,1 Hz, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 56,27, 56,34, 56,47, 61,81, 111,94, 121,52, 123,21, 126,71, 127,54, 151,43, 166,80; IR (KBr) 3271, 1675, 1546, 1499, 1465, 1439, 1268, 1207, 1130 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₀H₁₄N₂O₃·CF₃COOH: C, 44,45; H, 4,66; N, 8,64. Encontrado: C, 44,18; H, 4,57; N, 8,59.

Ejemplo 4

30 Síntesis de los compuestos intermedios 50-54

35 Los utensilios de vidrio que se emplearon se secaron a la llama y se enfriaron hasta que alcanzaron la temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se lavó el alcohol de partida con piridina anhidra (tres veces) y luego se lo secó (en condiciones de alto vacío, durante 48 horas). La reacción se llevó a cabo en una atmósfera de argón. El THF y el CH₂Cl₂ fueron recién destilados antes de usarlos.

Compuesto 50

40 ter-butil N-[1-{{[di(benciloxi)fosforil]oxi}metil}-2-(nonilamino)-2-oxoetil]carbamato

Al compuesto 28 de partida (252 mg, 0,551 mmol) lavado con piridina se le añadió 1H-tetrazol (231 mg, 3,31 mmol). A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (50 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (1,14 gr, 3,31 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (acetato de etilo) (70 ml), y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 25 ml), NaHCO₃ (2 x 30 ml), agua (2 x 30 ml) y solución salina saturada (2 x 30 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

55 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 195 mg (49%) de 50 en forma de aceite incoloro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,25 (ma, 29H), 1,34 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 3,17-3,23 (m, 2H), 4,01-4,09 (m, 1H), 4,31-4,43 (m, 2H), 4,96-5,09 (m, 4H), 5,55 (sa, 1H), 6,33 (sa, 1H), 7,31-7,39 (m, 10H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,09, 22,66, 26,79, 28,25, 29,24, 29,27, 29,42, 29,50, 29,53, 31,86, 39,68, 66,98, 69,66, 69,73, 77,20, 128,06, 128,10, 128,70, 128,72, 135,02, 168,50; MS (espectrometría de masas) m/z 603 (M-H)⁻; IR (KBr) 3349, 2919, 2852, 1717, 1685, 1654, 1516, 1470, 1457, 1242, 1163, 1037, 1025, 999 cm⁻¹.

60 Compuesto 51

ter-butil N-[1-{{[di(benciloxi)fosforil]oxi}metil}-2-oxo-2-(tetradecilamino)etil]carbamato

65 Al compuesto 27 de partida (305 mg, 0,761 mmol) lavado con piridina se le añadió 1H-tetrazol (319 mg, 4,56 mmol). A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (1,57 gr, 4,56 mmol) y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto.

ES 2 298 227 T3

Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (70 ml), y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 30 ml), NaHCO₃ (2 x 40 ml), agua (2 x 35 ml) y solución salina saturada (2 x 35 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 451 mg (89%) de 51 en forma de sólido ceroso de color blanco: pf 33-35°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ma, 22H), 1,44 (s, 2H), 1,52-1,55 (m, 2H), 3,16-3,23 (m, 2H), 4,02-4,09 (m, 1H), 4,31-4,43 (m, 2H), 5,00-5,15 (m, 4H), 5,57 (sa, 1H), 6,34 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 7,31-7,40 (m, 10H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,08, 19,03, 22,67, 26,81, 28,27, 29,25, 29,33, 29,44, 29,51, 29,59, 29,62, 29,65, 31,91, 39,69, 46,49, 54,47, 67,00, 67,07, 67,24, 67,32, 69,66, 69,68, 69,74, 76,12, 77,20, 77,84, 80,57, 128,0, 128,05, 128,09, 128,58, 128,64, 128,68, 135,45, 135,54, 135,59, 168,51; análisis calculado para C₃₆H₅₇N₂O₇P · 1H₂O · 0,5C₄H₈O₂: C, 63,14; H, 8,78; N, 3,88. Encontrado: C, 62,80; H, 8,38; N, 4,21.

Compuesto 52

ter-butil N-[1-{{[di(benciloxi)fosforil]oxi}metil}-2-(octadecilamino)-2-oxoetil]carbamato

Al compuesto 26 de partida (270 mg, 0,783 mmol) lavado con piridina se le añadió 1H-tetrazol (329 mg, 4,70 mmol). A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (50 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (1,62 gr, 4,70 mmol) y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (50 ml), y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 25 ml), NaHCO₃ (2 x 25 ml), agua (2 x 25 ml) y solución salina saturada (2 x 25 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 135 mg (28%) de 52 en forma de sólido de color blanco: pf 52-54°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,23 (ma, 14H), 1,44 (s, 9H), 1,63 (m, 2H), 3,17-3,24 (m, 2H), 4,01-4,09 (m, 1H), 4,30-4,44 (m, 2H), 5,00-5,05 (m, 4H), 5,56 (sa, 1H), 6,32 (sa, 1H), 7,29-7,39 (m, 10H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,11, 22,68, 26,80, 28,25, 29,26, 29,35, 29,42, 29,52, 29,60, 29,64, 29,69, 31,91, 39,68, 67,00, 67,07, 69,69, 69,74, 77,20, 127,93, 128,06, 128,10, 128,65, 128,70, 128,73, 135,43, 168,51, 170,07; IR (KBr) 3349, 2919, 2852, 1717, 1685, 1654, 1516, 1242, 1163, 1037, 1025, 999 cm⁻¹; análisis calculado para C₄₀H₆₅N₂O₇P · 0,75H₂O · 1C₄H₈O₂: C, 64,56; H, 9,17; N, 3,42. Encontrado: C, 64,23; H, 9,05; N, 3,78.

Compuesto 53

ter-butil N-[1-{{[di(benciloxi)fosforil]oxi}metil}-2-oxo-2-[4-(tetradeciloxi)anilino]etil]carbamato

Al compuesto 29 de partida (310 mg, 0,647 mmol) lavado con piridina se le añadió 1H-tetrazol (450 mg, 6,42 mmol). A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (2,21 gr, 6,42 mmol) y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo) y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (70 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 25 ml), NaHCO₃ (2 x 35 ml), agua (2 x 35 ml) y solución salina saturada (2 x 35 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 81 mg (17%) de 53 en forma de sólido de color blanco: pf 74-76°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 1,30 (s, 22H), 1,46 (s, 9H), 1,71-1,80 (m, 2H), 3,91 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 4,01-4,16 (m, 1H), 4,42-4,49 (m, 2H), 4,96-5,09 (m, 4H), 5,65 (sa, 1H), 6,80-6,86 (m, J₀ = 9,0 Hz, 2H), 7,31-7,39 (m, 12H), 8,82 (sa, 1H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,10, 22,67, 26,02, 28,26, 29,26, 29,34, 29,40, 29,57, 29,64, 31,91, 68,31, 69,84, 77,20, 114,79, 121,72, 128,07, 128,13, 128,65, 128,74, 130,03, 166,71; IR (KBr) 3340, 2920, 2852, 1717, 1677, 1513, 1457, 1237, 1059, 998 cm⁻¹; análisis calculado para C₄₂H₆₁N₂O₈P · 1H₂O · 0,45C₆H₁₄: C, 66,31; H, 8,63; N, 3,46. Encontrado: C, 65,92; H, 9,02; N, 3,84.

ES 2 298 227 T3

Compuesto 54

ter-butil N-[1-{{(di(benciloxi)fosforil)oxi)metil}-2-(4-metiloxianilino)-2-oxoetil]carbamato

5 Al compuesto 30 de partida (225 mg, 0,725 mmol) lavado con piridina se le añadió 1H-tetrazol (254 mg, 3,625 mmol). A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (20 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiosopropil fosforamido (1,25 gr, 3,625 mmol) y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo) y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en un evaporador rotatorio. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (50 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 15 ml), NaHCO₃ (2 x 25 ml), agua (2 x 25 ml) y solución salina saturada (2 x 25 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

10
15 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 195 mg (47%) de 54 en forma de sólido de color blanco: pf 82-84°C; RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,44 (s, 9H), 4,11 (s, 3H), 4,09-4,18 (m, 1H), 4,43-4,51 (m, 2H), 4,98-5,05 (m, 4H), 5,72 (sa, 1H), 6,78-6,82 (m, J_o = 9,0 Hz, 2H), 7,26-7,33 (m, 10H), 7,36-7,41 (m, J_o = 9,0 Hz, 2H), 8,41 (sa, 1H); ¹³C (CDCl₃) δ 28,26, 55,45, 66,93, 67,00, 69,76, 69,83, 69,90, 77,20, 80,91, 114,11, 121,75, 128,06, 128,12, 128,64, 128,72, 128,73, 130,38, 135,28, 135,42, 156,62, 166,75; RMN ³¹P (CDCl₃) δ 16,72 (1P); IR (KBr) 3337, 2969, 1716, 1689, 1665, 1514, 1457, 1304, 1245, 999 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₉H₃₅N₂O₈P: C, 61,05; H, 6,18; N, 4,91. Encontrado: C, 60,80; H, 6,20; N, 4,88.

Ejemplo 5

Síntesis de los compuestos 55-59

Compuesto 55

2-amino-3-(nonilamino)-3-oxopropil dihidrógeno fosfato

30 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 50 (100 mg, 0,165 mmol) en EtOH (etanol) (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 50 psi (3,44 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 48 mg (90%) de 55 en forma de polvo de color blanco: pf 196-198°C; RMN ¹H (CF₃COOD) δ 0,81-0,82 (m, 3H), 1,26-1,30 (m, 14H), 1,59 (m, 2H), 3,37-3,38 (m, 2H), 4,54-4,59 (m, 1H), 4,72-4,81 (m, 2H); RMN ¹³C (CF₃COOD) δ 14,66, 24,39, 28,60, 28,60, 30,46, 30,94, 31,16, 31,30, 31,39, 33,81, 43,53, 57,21, 66,42, 167,86; MS m/z 323 (M-H)⁻; IR (KBr) 3314, 2920, 2853, 1670, 1575, 1477, 1246, 1063, 1043 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₃H₂₉N₂O₅P·0,5CH₃OH: C, 47,64; H, 9,18; N, 8,23. Encontrado: C, 47,24; H, 8,84; N, 8,02.

Compuesto 56

2-amino-3-oxo-3-(tetradecilamino)propil dihidrógeno fosfato

45 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 51 (145 mg, 0,219 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 3 horas a 45 psi (3,10 bares). Transcurridas 3 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 75 mg (90%) de 56 en forma de polvo de color blanco: pf 189-190°C; RMN ¹H (CF₃COOD) δ 0,81 (sa, 3H), 1,24 (s, 23H), 1,57 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 4,54-4,58 (m, 1H), 4,73-4,78 (m, 2H); RMN ¹³C (CF₃COOD) δ 14,43, 24,16, 28,34, 30,21, 30,69, 31,01, 31,17, 31,22, 31,27, 33,62, 43,27, 56,96, 66,16, 167,60; RMN ³¹P (CF₃COOD) δ 17,93 (1P); MS m/z 379 (M-H)⁻; IR (KBr) 3318, 2923, 2852, 1671, 1657, 1563, 1475, 1242, 1055 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₇H₃₇N₂O₅P: C, 53,67; H, 9,80; N, 7,36. Encontrado: C, 53,40; H, 9,73; N, 7,31.

55 Compuesto 56a

2-(acetilamino)-3-oxo-3-(tetradecilamino)propil dihidrógeno fosfato

60 Se añadió un gran exceso de anhídrido acético a una muestra de 56 (20 mg, 0,052 mmol) en 0,5 ml de piridina. Se dejó que la mezcla se agitase a temperatura ambiente a lo largo de toda la noche. Se retiró el exceso de piridina y de anhídrido acético en un evaporador rotatorio. La mezcla resultante se agitó con 20 ml de solución acuosa de HCl. La mezcla acídica se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (2 x 25 ml) y solución salina saturada (2 x 25 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y filtrada. Se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 15 mg (71%) de 56a en forma de sólido gomoso: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,27 (s, 22H), 1,99-2,02 (m, 3H), 3,15-3,20 (m, 2H), 4,10-4,28 (m, 2H), 4,54-4,62 (m, 1H); RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD) 13,48, 16,19, 22,23, 26,50, 28,91, 29,21, 31,48, 30,21, 31,01, 31,17, 31,22, 31,27, 33,62, 43,27, 56,96, 66,16, 163,02, 174,96; IR (KBr) 3316, 2923, 2853, 1671, 1657, 1560, 1467, 1247, 1059 cm⁻¹.

ES 2 298 227 T3

Compuesto 57

2-amino-3-(octadecilamino)-3-oxopropil dihidrógeno fosfato

5 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 52 (117 mg, 0,164 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 50 psi (3,44 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 70 mg (98%) de 57 en forma de polvo de color blanco: pf 190-192°C; RMN ¹H (CF₃COOD) δ 0,81 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 1,25 (s, 31H), 1,58 (m, 2H), 3,34-3,44 (m, 2H), 4,49-4,59 (m, 1H), 4,71-4,81 (m, 2H); RMN ¹³C (CF₃COOD) δ 14,70, 24,43, 28,60, 30,46, 30,95, 31,28, 31,31, 31,44, 31,48, 31,55, 33,89, 43,53, 57,12, 57,21, 66,35, 167,85; MS m/z 435 (M-H)⁻; IR (KBr) 3325, 2922, 2852, 1674, 1655, 1560, 1472, 1045 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₁H₄₅N₂O₃P: C, 57,77; H, 10,39; N, 6,42. Encontrado: C, 57,61; H, 10,22; N, 6,25.

15 Compuesto 58

2-amino-3-oxo-3-[4-(tetradeciloxi)anilino]propil dihidrógeno fosfato

20 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 53 (40 mg, 0,054 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 50 psi (3,44 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 22 mg (88%) de 58 en forma de polvo de color blanco: pf 187-190°C; RMN ¹H (CF₃COOD) δ 0,80-0,82 (m, 3H), 1,25 (m, 20H), 1,77-1,84 (m, 2H), 4,20 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 4,64-4,74 (m, 1H), 4,90-4,91 (m, 2H), 7,04-7,07 (d, J_o = 9,0 Hz, 2H), 7,32-7,35 (d, J_o = 9,0 Hz, 2H); RMN ¹³C (CF₃COOD) δ 14,81, 24,54, 27,57, 30,62, 31,19, 31,38, 31,46, 31,52, 31,60, 31,65, 33,99, 57,70, 66,35, 73,66, 119,32, 126,55, 131,25, 158,87, 167,06; MS m/z 471 (M-H)⁻; IR (KBr) 3325, 2923, 2852, 1665, 1553, 1515, 1469, 1240, 1046 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₃H₄₁N₂O₆P·0,5CH₃OH·0,5CHCl₃: C, 52,58; H, 8,00; N, 5,11. Encontrado: C, 52,89; H, 7,83; N, 5,29.

30 Compuesto 59

2-amino-3-(4-metoxianilino)-3-oxopropil dihidrógeno fosfato

35 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 54 (125 mg, 0,219 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 2 horas a 45 psi (3,10 bares). Transcurridas 2 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 82 mg (96%) de 59 en forma de polvo de color blanco: pf 199-202°C; RMN ¹H (CF₃COOD) δ 3,93 (m, 3H), 4,65-4,75 (m, 1H), 4,88-4,94 (m, 2H), 7,01-7,04 (d, J_o = 9,0 Hz, 2H), 7,31-7,34 (d, J_o = 9,0 Hz, 2H); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 57,60, 58,00, 66,54, 117,69, 126,64, 131,07, 159,62, 167,07; MS m/z 289 (M-H)⁻; IR (KBr) 3317, 2961, 1680, 1565, 1515, 1478, 1236, 1045 cm⁻¹; análisis calculado para C₁₀H₁₅N₂O₆P: C, 41,39; H, 5,21; N, 9,65. Encontrado: C, 41,25; H, 5,35; N, 9,73.

Ejemplo 6

45 Síntesis de los compuestos intermedios 63-65

50 Los utensilios de vidrio que se emplearon se secaron a la llama y se enfriaron hasta que alcanzaron la temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se lavó el alcohol de partida con piridina anhidra (tres veces) y luego se lo secó (en condiciones de alto vacío) durante 48 horas. La reacción se llevó a cabo en una atmósfera de argón. El THF y el CH₂Cl₂ fueron recién destilados antes de usarlos.

Compuesto 63

55 1,2-(3-octadeciloxipropano)-bis(dibencilfosfato)

Se añadió 1H-tetrazol (229 mg, 3,26 mmol) al alcohol *dl*-batílico de partida (60, 225 mg, 0,652 mmol) lavado con piridina. A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (50 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (1,12 gr, 3,26 mmol) y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (70 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 25 ml), NaHCO₃ (2 x 30 ml), agua (2 x 30 ml) y solución salina saturada (2 x 30 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

ES 2 298 227 T3

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 303 mg (53%) de 63 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,86 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,24 (ma, 28H), 1,33-1,35 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 3,29-3,36 (m, 2H), 3,48-3,50 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 4,04-4,22 (m, 2H), 4,60 (m, 1H), 5,00 (m, 8H), 7,27-7,33 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,05, 18,96, 22,62, 25,95, 29,29, 29,41, 29,49, 29,53, 29,59, 29,63, 31,85, 46,48, 66,58, 69,20, 69,23, 69,28, 69,36, 71,75, 75,37, 127,76, 127,82, 127,86, 127,88, 127,94, 128,36, 128,45, 128,49, 128,61, 128,62, 135,46, 135,54, 135,59, 135,65, 135,68, 135,75, 135,79; MS m/z 866 (M+H)⁺.

Compuesto 64

10 1,2-(3-dodecilogipropano)-bis(dibencilfosfato)

Se añadió 1H-tetrazol (645 mg, 9,2 mmol) al *dl*-3-O-n-dodecil-1,2-propanodiol de partida (61, 400 mg, 1,5 mmol) lavado con piridina. A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (3,18 gr, 9,2 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (80 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 35 ml), NaHCO₃ (2 x 40 ml), agua (2 x 30 ml) y solución salina saturada (2 x 30 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 100 mg (<10%) de 64 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,86 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,23 (ma, 18H), 1,46 (m, 2H), 3,13-3,36 (m, 2H), 3,49-3,51 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 4,03-4,23 (m, 2H), 4,59 (m, 1H), 5,01 (m, 8H), 7,26-7,34 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,11, 22,68, 26,01, 29,35, 29,47, 29,54, 29,59, 29,63, 29,66, 31,91, 69,01, 69,06, 69,26, 69,30, 69,34, 69,42, 69,62, 71,83, 77,21, 127,83, 127,89, 127,94, 127,95, 128,44, 128,52, 128,56, 135,64, 135,74, 135,85; IR (NaCl, puro) 3427, 1276, 1000, 885, 499 cm⁻¹; MS m/z 781 (M+H)⁺, m/z 803 (M+Na)⁺.

30 Compuesto 65

1,2-(3-hexadecilogipropano)-bis(dibencilfosfato)

Se añadió 1H-tetrazol (664 mg, 9,47 mmol) al *dl*-3-O-n-hexadecil-1,2-propanodiol de partida (62, 500 mg, 1,57 mmol) lavado con piridina. A esta mezcla se le añadió una mezcla 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recién destilados (50 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (3,27 gr, 9,47 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiraron el THF y el CH₂Cl₂ en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (80 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 35 ml), NaHCO₃ (2 x 40 ml), agua (2 x 30 ml) y solución salina saturada (2 x 30 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 205 mg (15%) de 65 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,25 (ma, 26H), 1,46 (m, 2H), 3,30-3,42 (m, 2H), 3,49-3,51 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 3,97-4,23 (m, 2H), 4,60 (m, 1H), 5,01 (m, 8H), 7,26-7,35 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,11, 22,68, 26,00, 29,35, 29,47, 29,54, 29,59, 29,64, 29,68, 31,91, 69,00, 69,06, 69,26, 69,29, 69,34, 69,41, 71,82, 71,74, 75,52, 75,60, 77,20, 126,97, 127,82, 127,88, 127,93, 127,95, 127,99, 128,43, 128,51, 128,55, 128,60, 135,63, 135,73, 135,79, 135,83; IR (NaCl, puro) 3423, 1269, 1016, 736 cm⁻¹; MS m/z 837 (M+H)⁺, m/z 859 (M+Na)⁺.

55 Ejemplo 7

Síntesis de los compuestos 66-68

60 Compuesto 66

1,2-(3-octadecilogipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 63 (135 mg, 0,156 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 70 mg (89%) de 66 en forma de cera clara: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,28 (s, 30H), 1,55 (m, 2H), 3,45-

ES 2 298 227 T3

3,50 (m, 2H), 3,62-3,64 (m, 2H), 4,00-4,16 (m, 2H), 4,47 (m, 1H); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 14,43, 19,30, 23,73, 27,20, 30,47, 30,64, 30,78, 33,07, 72,80; MS m/z 503 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 1011 cm^{-1} .

5 Compuesto 67

1,2-(3-dodeciloxypropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 64

(70 mg, 0,089 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 35 mg (94%) de 67 en forma de cera clara: RMN ^1H (CD_3OD) δ 0,79 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H), 1,90 (s, 18H), 1,46 (m, 2H), 3,34-3,41 (m, 2H), 3,49-3,73 (m, 2H), 3,78-4,05 (m, 2H), 4,47 (m, 1H); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 14,43, 23,71, 23,74, 27,20, 30,49, 30,64, 30,76, 30,81, 33,08, 66,80, 72,79; MS m/z 419 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 1008 cm^{-1} .

15 Compuesto 68

1,2-(3-hexadeciloxypropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 65

(138 mg, 0,164 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 75 mg (96%) de 68 en forma de cera de color blanco: RMN ^1H (CD_3OD) δ 0,89 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H), 1,28 (s, 23H), 1,56 (m, 2H), 3,43-3,50 (m, 2H), 3,58-3,65 (m, 2H), 3,89-4,16 (m, 2H), 4,47 (m, 1H); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 14,44, 23,74, 27,20, 30,48, 30,64, 30,80, 33,08, 72,80; MS m/z 475 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 1011 cm^{-1} .

Ejemplo 8

30 Síntesis de los compuestos intermedios 77-84

Los utensilios de vidrio que se emplearon se secaron a la llama y se enfriaron hasta que alcanzaron la temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se lavó el alcohol de partida con piridina anhidra (tres veces) y luego se lo secó (en condiciones de alto vacío) durante 48 horas. La reacción se llevó a cabo en una atmósfera de argón. El THF y el CH_2Cl_2 fueron recién destilados antes de usarlos.

Compuesto 77

1,2-(3-tetradecanoiloxypropano)-bis(dibencilfosfato)

Se añadió 1H-tetrazol (1,01 gr, 14,5 mmol) a la monomiristina de partida (69, 800 mg, 2,6 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (45 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (5,02 gr, 14,5 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml), y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO_3 (2 x 75 ml), agua (2 x 50 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO_4 y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 600 mg (28%) de 77 en forma de aceite claro: RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,25 (ma, 20H), 1,53 (m, 2H), 2,17-2,32 (m, 2H), 3,96-4,24 (m, 4H), 4,61-4,70 (m, 1H), 4,99-5,08 (m, 8H), 7,29-7,35 (m, 20H); ^{13}C (CDCl_3) δ 14,10, 22,67, 24,70, 29,08, 29,23, 29,33, 29,44, 29,59, 29,62, 29,66, 31,90, 33,86, 64,24, 65,82, 69,41, 69,46, 69,48, 69,53, 69,57, 77,20, 127,85, 127,91, 127,98, 127,99, 128,04, 128,57, 128,59, 128,70, 128,71, 135,50, 135,59, 173,09; IR (NaCl, puro) 3422, 1742, 1457, 1274, 1035, 1001 cm^{-1} ; MS m/z 8823 (M+H) $^+$, m/z 845 (M+Na) $^+$.

60 Compuesto 78

1,2-(3-pentadecanoiloxypropano)-bis(dibencilfosfato)

Se añadió 1H-tetrazol (970 mg, 13,9 mmol) a la monopentadecanoína de partida (70, 800 mg, 2,5 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (45 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (4,80 gr, 13,9 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracé-

ES 2 298 227 T3

tico. Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml), y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 100 ml), agua (2 x 50 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

5 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 741 mg (35%) de 78 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,25 (ma, 22H), 1,53 (m, 2H), 2,17-2,32 (m, 2H), 3,96-4,24 (m, 4H), 4,61-4,70 (m, 1H), 4,99-5,07 (m, 8H), 7,29-7,35 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,09, 22,66, 24,69, 29,08, 29,23, 29,33, 29,44, 29,59, 29,62, 29,65, 31,89, 33,85, 64,23, 65,86, 69,40, 69,46, 69,48, 10 69,53, 69,56, 77,20, 127,84, 127,90, 127,97, 127,98, 128,03, 128,56, 128,59, 128,69, 128,71, 135,50, 135,59, 173,09; IR (NaCl, puro) 3421, 1742, 1457, 1275, 1035, 1014, 1001 cm⁻¹; MS m/z 837 (M+H)⁺, m/z 859 (M+Na)⁺.

Compuesto 79

1,2-(3-hexadecanoiloxipropano)-bis(dibencifosfato)

15 Se añadió 1H-tetrazol (1,00 gr, 14,2 mmol) a la monopalmitina de partida (71, 800 mg, 2,4 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (45 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (4,90 gr, 14,2 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La 20 cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se 25 retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 100 ml), agua (2 x 50 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

30 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 786 mg (38%) de 79 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,25 (ma, 24H), 1,53 (m, 2H), 2,17-2,32 (m, 2H), 3,96-4,24 (m, 4H), 4,61-4,70 (m, 1H), 4,99-5,08 (m, 8H), 7,29-7,35 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,09, 22,66, 24,71, 29,09, 29,23, 29,33, 29,45, 29,60, 29,63, 29,67, 31,90, 33,87, 62,23, 62,30, 65,89, 69,43, 69,48, 69,50, 69,55, 69,58, 77,20, 126,96, 127,85, 127,91, 127,98, 128,04, 128,56, 128,59, 128,64, 128,71, 135,52, 135,61, 173,07; IR (NaCl, puro) 3421, 1742, 1457, 1273, 1035, 1016, 1001 cm⁻¹; MS m/z 851 (M+H)⁺, m/z 873 (M+Na)⁺.

Compuesto 80

1,2-(3-heptadecanoiloxipropano)-bis(dibencifosfato)

35 Se añadió 1H-tetrazol (980 mg, 13,9 mmol) a la monoheptadecanoína de partida (72, 800 mg, 2,32 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (4,81 gr, 13,9 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. 45 Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 100 ml), agua (2 x 50 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

50 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 1,48 g (74%) de 80 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ma, 26H), 1,53 (m, 2H), 2,20 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 4,02-4,24 (m, 4H), 4,66 (m, 1H), 4,99-5,05 (m, 8H), 7,29-7,35 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,10, 22,66, 24,69, 29,07, 29,23, 29,33, 29,44, 29,59, 29,63, 29,66, 31,89, 33,84, 62,21, 62,27, 65,85, 69,40, 69,45, 69,47, 69,52, 69,56, 74,04, 74,23, 77,20, 127,83, 127,87, 127,96, 127,97, 128,53, 128,55, 128,57, 128,59, 135,47, 135,56, 55 173,07; IR (NaCl, puro) 3483, 1743, 1457, 1281, 1035, 1013, 1000 cm⁻¹; MS m/z 865 (M+H)⁺, m/z 887 (M+Na)⁺.

Compuesto 81

1,2-(3-octadecanoiloxipropano)-bis(dibencifosfato)

60 Se añadió 1H-tetrazol (1,00 gr, 14,2 mmol) a la monoestearina de partida (73, 800 mg, 2,32 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (4,92 gr, 14,2 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml) y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 100 ml), agua (2 x 50 ml) y solución salina saturada

ES 2 298 227 T3

(2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 870

5 mg (45%) de 81 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ma, 28H), 1,53
(m, 2H), 2,20 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 3,97-4,24 (m, 4H), 4,66 (m, 1H), 4,99-5,07 (m, 8H), 7,29-7,35 (m, 20H); ¹³C
(CDCl₃) δ 14,09, 22,66, 24,69, 29,08, 29,23, 29,33, 29,45, 29,59, 29,63, 29,67, 31,89, 33,85, 62,22, 62,28, 64,23,
65,87, 68,69, 69,23, 69,42, 69,50, 69,54, 69,58, 74,07, 74,25, 127,60, 127,84, 127,90, 127,98, 128,03, 128,54, 128,56,
128,58, 128,60, 128,71, 135,47, 135,57, 173,08; IR (NaCl, puro) 3421, 1742, 1457, 1273, 1251, 1216, 1035, 1016,
1000 cm⁻¹; MS m/z 879 (M+H)⁺, m/z 901 (M+Na)⁺.

Compuesto 82

1,2-(3-nonadecanoiloxipropano)-bis(dibencilfosfato)

15 Se añadió 1H-tetrazol (977 mg, 13,9 mmol) a la monononadecanoína de partida (74, 800 mg, 2,1 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (4,81 gr, 13,9 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue
20 enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml), y luego fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 125 ml), agua (2 x 75 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue
25 sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 1,47
g (78%) de 82 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ma, 30H), 1,53 (m,
2H), 2,20 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 4,02-4,24 (m, 4H), 4,66 (m, 1H), 4,99-5,03 (m, 8H), 7,29-7,36 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ
30 14,08, 22,65, 24,67, 29,06, 29,22, 29,32, 29,43, 29,58, 29,61, 29,66, 31,88, 33,83, 62,25, 65,84, 69,38, 69,46, 69,51,
69,54, 74,03, 74,10, 74,15, 74,22, 77,20, 127,82, 127,88, 127,96, 128,53, 128,56, 135,45, 135,55, 173,06; IR (NaCl,
puro) 3483, 1743, 1457, 1273, 1282, 1216, 1035, 1013 cm⁻¹; MS m/z 893 (M+H)⁺, m/z 915 (M+Na)⁺.

Compuesto 83

1,2-(3-icosanoiloxipropano)-bis(dibencilfosfato)

35 Se añadió 1H-tetrazol (1,00 gr, 14,2 mmol) a la monoaraquidina de partida (75, 800 mg, 2,06 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (4,92 gr, 14,2 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue
40 enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml) y luego
45 fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 125 ml), agua (2 x 75 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

50 Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 1,39
g (74%) de 83 en forma de aceite claro: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ma, 32H), 1,53 (m,
2H), 2,20 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 4,02-4,24 (m, 4H), 4,66 (m, 1H), 4,99-5,05 (m, 8H), 7,29-7,36 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ
55 14,09, 22,65, 24,69, 29,07, 29,23, 29,33, 29,44, 29,59, 29,63, 29,67, 31,89, 33,84, 62,21, 62,27, 65,86, 69,40, 69,45,
69,48, 69,52, 69,56, 74,05, 74,12, 74,16, 74,24, 77,20, 127,83, 127,89, 127,97, 128,53, 128,55, 128,57, 128,59, 135,47,
135,56, 173,07; IR (NaCl, puro) 3483, 1743, 1457, 1273, 1282, 1216, 1035, 1012, 1000 cm⁻¹; MS m/z 907 (M+H)⁺,
m/z 929 (M+Na)⁺.

Compuesto 84

1,2-(3-docosanoiloxipropano)-bis(dibencilfosfato)

60 Se añadió 1H-tetrazol (1,00 gr, 14,2 mmol) a la monobehenina de partida (76, 800 mg, 1,92 mmol) lavada con piridina. A esta mezcla se le añadió THF recién destilado (40 ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió dibencildiisopropil fosforamidato (5,14 gr, 14,8 mmol), y la reacción fue agitada en atmósfera de argón durante 90 minutos. La cromatografía en capa fina realizada a la mezcla de reacción reveló la formación del producto. Esta mezcla fue
65 enfriada hasta que alcanzó 0°C (mediante baño de hielo), y se le añadió un gran exceso de ácido peracético. Se agitó la mezcla durante otros 35 minutos, y luego se añadió metabisulfito sódico para neutralizar el exceso de ácido peracético. Se retiró el THF en condiciones de presión reducida. El concentrado resultante fue tratado con EtOAc (100 ml) y luego
70 fue lavado con metabisulfito sódico (2 x 50 ml), NaHCO₃ (2 x 125 ml), agua (2 x 75 ml) y solución salina saturada

ES 2 298 227 T3

(2 x 50 ml). La porción orgánica fue secada sobre NaSO₄ y concentrada a presión reducida. El residuo fue sometido a cromatografía en columna flash, eluyendo con hexanos/EtOAc de composición diversa.

Se mezclaron las fracciones adecuadas y se las concentró en condiciones de vacío hasta secarlas, obteniendo 1,27 g (71%) de 84 en forma de un compuesto similar a una cera, de color blanco: RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ma, 36H), 1,53 (m, 2H), 2,20 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 4,02-4,24 (m, 4H), 4,66 (m, 1H), 4,99-5,03 (m, 8H), 7,29-7,36 (m, 20H); ¹³C (CDCl₃) δ 14,08, 22,65, 24,68, 29,07, 29,22, 29,32, 29,44, 29,59, 29,62, 29,66, 31,88, 33,84, 62,20, 62,26, 65,85, 69,40, 69,45, 69,48, 69,53, 69,57, 74,05, 74,16, m [sic] 74,24, 77,20, 127,83, 127,88, 127,96, 127,97, 128,30, 128,52, 128,54, 128,57, 128,58, 135,46, 135,55, 173,07; MS m/z 935 (M+H)⁺, m/z 957 (M+Na)⁺.

10

Ejemplo 9

Síntesis de los compuestos 85-92

15

Compuesto 85

1,2-(3-tetradecanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 77 (385 mg, 0,468 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 210 mg (98%) de 85 en forma de cera de color blanco: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,28 (s, 20H), 1,56-1,63 (m, 2H), 2,24-2,38 (m, 2H), 3,93-4,42 (m, 4H), 4,59 (m, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,44, 23,73, 26,09, 30,71, 30,23, 30,43, 30,47, 30,61, 30,75, 33,07, 34,80, 34,94, 61,90, 61,96, 63,96, 63,70, 66,24, 74,33, 77,51, 175,02; MS m/z 461 (M-H)⁻; IR (NaCl, puro) 3386, 1702, 1216, 1019 cm⁻¹.

Compuesto 86

30

1,2-(3-pentadecanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (cantidad catalítica) a una solución del compuesto 78 (451 mg, 0,538 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 250 mg (97%) de 86 en forma de cera de color blanco: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,28 (s, 22H), 1,58 (m, 2H), 2,24-2,38 (m, 2H), 3,97-4,21 (m, 4H), 4,38 (m, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,44, 23,74, 26,05, 30,16, 30,36, 30,48, 30,57, 30,76, 33,08, 35,11, 61,36, 63,70, 63,90, 66,24, 67,77, 70,22, 77,33, 77,40, 77,51, 175,63; MS m/z 475 (M-H)⁻; IR (NaCl, puro) 3380, 1728, 1216, 1031 cm⁻¹.

40

Compuesto 87

1,2-(3-hexadecanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (610 mg) a una solución del compuesto 79 (561 mg, 0,659 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 300 mg (92%) de 87 en forma de cera de color blanco: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,28 (s, 24H), 1,56-1,63 (m, 2H), 2,24-2,38 (m, 2H), 3,95-4,40 (m, 4H), 4,39 (m, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,43, 23,73, 25,89, 26,05, 26,09, 30,15, 30,23, 30,36, 30,44, 30,47, 30,56, 30,61, 30,67, 30,75, 33,07, 34,08, 34,94, 35,11, 61,36, 64,00, 66,22, 67,74, 70,22, 77,33, 77,40, 77,51, 175,03; MS m/z 489 (M-H)⁻; IR (NaCl, puro) 3357, 1729, 1216, 1029 cm⁻¹.

Compuesto 88

55

1,2-(3-heptadecanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (724 mg) a una solución del compuesto 80 (636 mg, 0,736 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 365 mg (98%) de 88 en forma de cera de color blanco: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,28 (s, 26H), 1,56-1,63 (m, 2H), 3,96-4,17 (m, 4H), 4,22-4,42 (m, 1H); RMN ¹³C (CD₃OD) δ 14,54, 23,73, 25,90, 26,10, 30,16, 30,24, 30,36, 30,43, 30,47, 30,56, 30,61, 30,76, 33,07, 34,81, 34,95, 61,37, 61,92, 63,97, 66,26, 67,70, 67,78, 70,06, 74,42, 77,46, 175,04; MS m/z 503 (M-H)⁻; IR (NaCl, puro) 3357, 1710, 1216, 1032 cm⁻¹; análisis calculado para C₂₀H₄₂O₁₀P₂ · 1H₂O: C, 45,97; H, 8,49. Encontrado: C, 46,32; H, 8,73.

ES 2 298 227 T3

Compuesto 89

1,2-(3-octadecanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

5 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (617 mg) a una solución del compuesto 81 (530 mg, 0,603 mmol) en EtOH (15 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 305 mg (97%) de 89 en forma de cera de color blanco: RMN ^1H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,28 (s, 28H), 1,56-1,61 (m, 2H), 10 2,42-2,38 (m, 2H), 3,91-4,17 (m, 4H), 4,24-4,42 (m, 1H); RMN ^{13}C (CD₃OD) δ 14,43, 23,74, 25,90, 26,06, 26,10, 30,16, 30,24, 30,36, 30,47, 30,57, 30,61, 30,67, 30,76, 33,08, 34,81, 34,95, 35,11, 61,37, 63,72, 66,26, 67,68, 67,75, 70,25, 77,48, 175,04; MS m/z 517 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 3388, 1731, 1216, 1020 cm $^{-1}$.

Compuesto 90

1,2-(3-nonadecanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

15 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (1,00 gr) a una solución del compuesto 82 (952 mg, 1,06 mmol) en EtOH (25 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 555 mg (98%) de 90 en forma de cera de color blanco: RMN ^1H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,27 (s, 29H), 1,56-1,63 (m, 2H), 2,24-2,38 (m, 2H), 4,06-4,17 (m, 2H), 4,22-4,42 (m, 2H), 4,59 (m, 1H); RMN ^{13}C (CD₃OD) δ 14,44, 23,74, 25,90, 26,06, 30,16, 30,24, 30,36, 30,48, 30,57, 30,63, 30,76, 30,79, 33,08, 34,81, 35,12, 63,94, 66,25, 175,03; MS m/z 531 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 1735, 1216, 1012 cm $^{-1}$.

Compuesto 91

1,2-(3-icosanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

30 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (813 mg) a una solución del compuesto 83 (711 mg, 0,784 mmol) en EtOH (25 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 419 mg (97%) de 91 en forma de cera de color blanco: RMN ^1H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,28 (s, 32H), 1,58 (m, 2H), 2,24-2,38 (m, 2H), 3,95-4,42 (m, 4H), 4,58 (m, 1H); RMN ^{13}C (CD₃OD) δ 14,44, 23,74, 25,90, 26,06, 30,16, 30,24, 30,36, 30,48, 30,57, 30,63, 30,67, 30,76, 33,08, 34,81, 35,11, 61,37, 61,98, 66,26, 67,69, 67,77, 77,42, 175,03; MS m/z 545 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 3418, 1735, 1261, 1019 cm $^{-1}$.

Compuesto 92

1,2-(3-docosanoiloxipropano)-bis(dihidrógeno fosfato)

40 Se añadió paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C) (710 mg) a una solución del compuesto 84 (663 mg, 0,709 mmol) en EtOH (25 ml). Se llevó a cabo una hidrogenación durante 4 horas a 60 psi (4,13 bares). Transcurridas 4 horas, se determinó, mediante cromatografía en capa fina, que la reacción había concluido. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el eluato en condiciones de presión reducida, obteniéndose 400 mg (98%) de 92 en forma de cera de color blanco: RMN ^1H (CD₃OD) δ 0,89 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 1,27 (s, 36H), 1,58 (m, 2H), 2,24-2,38 (m, 2H), 3,98-4,42 (m, 4H), 4,59 (m, 1H); RMN ^{13}C (CDCl₃/CD₃OD) δ 13,72, 22,40, 24,71, 28,84, 28,97, 29,08, 29,18, 29,41, 31,65, 34,16, 60,15, 60,99, 62,42, 63,17, 65,16, 65,30, 65,98, 73,24, 173,79; MS m/z 573 (M-H) $^-$; IR (NaCl, puro) 3431, 1739, 1254, 1177 cm $^{-1}$.

Ejemplo 10

*Prueba con oocitos de *Xenopus**

55 Se emplearon oocitos de *Xenopus* que expresan endógenamente el PLGFR PSP24 para determinar la actividad inhibidora del LPA de los compuestos recién diseñados y sintetizados.

60 Los oocitos se obtuvieron (en condiciones asépticas) de ranas *Xenopus laevis* adultas (obtenidas de la empresa Carolina Scientific, Burlington [Carolina del Norte], Estados Unidos) anestesiadas con xilazina, y se los preparó para el experimento. Los oocitos de fase V-VI fueron desprovistos de la capa de células foliculares mediante tratamiento con colagenasa de tipo A (obtenida de Boehringer, [Indiana], Estados Unidos), empleada en una concentración de 1,4 mg/ml en una solución de cloruro sódico compuesta (solución de Ringer-2) ovárica libre de Ca²⁺ ((OR-2) NaCl 85,2 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,5, con NaOH). Se mantuvo a los oocitos en una solución de Barth en un incubador a una temperatura de 17 a 20°C, y se los empleó durante 2-7 días tras su aislamiento.

ES 2 298 227 T3

Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos empleando un amplificador con fijación del voltaje de dos electrodos estándar, manteniendo el potencial de membrana en -60 mV (GeneClamp 500, Axon Instruments, California, Estados Unidos). Los compuestos que se deseaba probar fueron disueltos en MeOH, formando un complejo con BSA libre de ácidos grasos, y diluidos con una solución de cloruro sódico compuesta (solución de Ringer-Na⁺) (NaCl 120 nM, 5 KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, HEPES 5 mM; pH 7,0) de rana; los compuestos así preparados fueron aplicados mediante superfusión al oocito a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Las corrientes de membrana fueron registradas mediante un osciloscopio digital NIC-310 (de la empresa Nicolet, Madison [Wisconsin], Estados Unidos). Las aplicaciones se realizaron a intervalos de 15 minutos (mínimo) con el fin de permitir un período de reposo farmacológico adecuado y para que los oocitos se recuperasen de la desensibilización.

10 Las Figuras 21-27 ilustran la inhibición, proporcional a la dosis, de las corrientes de cloruro inducidas por el LPA, por parte de los compuestos 56, 57, 66 y 92.

15 El compuesto 36 fue el mejor inhibidor en el grupo de los derivados no fosforilados. Cuando se injectó el 36 intracellularmente para determinar si sus efectos inhibidores eran consecuencia de sus acciones sobre la superficie celular o si la inhibición se debía a sus acciones dentro de la célula, la aplicación intracellular del 36 no arrojó información alguna sobre su lugar de acción. Por lo tanto, se decidió pasar de emplear los compuestos con grupo hidroxí libre (35-43) a sintetizar los compuestos (55-59) para hacerlos interaccionar con la superficie celular y evitar que los compuestos penetrasen en la célula.

20 Los compuestos 56, 57, 66 y 92 inhibieron la corriente de cloruro inducida por el LPA en el oocito de *Xenopus*. Dichos compuestos 56, 57, 66 y 92 fueron capaces de bloquear las acciones del LPA, de una manera proporcional a la dosis. Además, tras lavar el oocito de *Xenopus*, se recuperó por completo la respuesta al LPA; con este experimento se demostró que los compuestos 56, 57, 66 y 92 eran capaces de inhibir las corrientes de cloruro inducidas por el LPA, de una manera reversible. El compuesto 66, a una concentración 5 μM, abolió por completo el efecto del LPA en los oocitos de *Xenopus*, con una CI₅₀ (concentración inhibitoria media que produce el 50% de inhibición) de unos 1,2 μM (Figuras 23 y 24). Además, cuando se microinyectó el 66 en el interior de la célula (flecha, Figura 23B) y luego se aplicó extracelularmente LPA (10 nM), dicho compuesto 66 no fue capaz de inhibir la respuesta al LPA; de este experimento se desprende que las acciones inhibitorias del compuesto 66 eran de naturaleza extracelular.

25 30 Se probaron los compuestos 35 y 37-43 en oocitos de *Xenopus*, pero los resultados no fueron concluyentes. El compuesto 55, a una concentración 1 μM, mostró una inhibición ligera (38% contra LPA 2nM). De entre los compuestos de la serie de la SAP, no se han probado los compuestos 58 y 59 en oocitos de *Xenopus*. De entre los compuestos de la serie de los difosfatos, el compuesto 89 inhibió la respuesta inducida por el LPA (59% contra LPA 2nM). Los compuestos 67 (umbral ~ 1 μM), 68 (umbral ~ 10 nM) y 85 (umbral ~ 100 nM) fueron capaces de provocar una respuesta por sí mismos; en cuanto a los compuestos 86, 87, 88, 90 y 91, aún están pendientes de evaluación. El compuesto 56a se diseñó y sintetizó para someter a prueba la importancia del grupo amino libre. Cuando se evaluó el compuesto 56a en la prueba de los oocitos de *Xenopus*, el 56a potenció la respuesta al LPA cuando fue aplicado en combinación con el LPA. El compuesto 56a no provocó una respuesta a una concentración 2 μM (no aparece en la figura), pero a una concentración 10 μM fue capaz de provocar una respuesta por sí mismo (Figura 26); de este experimento se desprende que para que haya actividad inhibitoria es necesaria la presencia de un grupo amino libre.

Ejemplo 11

45 *Migraciones de células ováricas HEY*

Es un hecho conocido que los dos receptores del LPA EDG-2 y EDG-7 se expresan en células de cáncer ovárico HEY, de modo que se evaluó la capacidad de los compuestos 56, 56a y 66 para inhibir la motilidad celular inducida por el LPA (concentración del compuesto: 1 μM, frente a una concentración 0,1 μM del LPA).

50 Se mantuvieron células ováricas HEY en el medio RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL), suplementado con suero fetal bovino al 10% (de Hyclone). Se sincronizaron todas las células de modo que estuviesen en la fase G₀/G₁, cultivándolas durante 2 días hasta su confluencia. Cuando alcanzaron un 50-60% de confluencia en el matraz, 55 se las colocó en placas y se las recolectó para la realización de experimentos. Tras extraer las células del matraz, se las expuso durante 5 minutos a EDTA 0,53 mM en PBS (tampón fosfato salino) a 37°C. Se neutralizó el EDTA con un volumen idéntico de medio RPMI 1640 más L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino al 10%. Se centrifugaron las células a 800 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células recolectadas fueron lavadas dos veces con medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM y se las resuspendió en la concentración de 1 x 10⁶ 60 células/ml. Después se las dejó reposar durante 1 hora a 37°C.

65 Para probar la motilidad celular se empleó una prueba de migración celular cuantitativa modificada (Cat. N° ECM500 de la empresa Chemicon, Temecula [California], Estados Unidos). La membrana de las cámaras Chemicon fue revestida de poros de 8 micras de diámetro, que contenían fibronectina. Mediante pipeteo, se añadieron 400 μl de medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, que no contenía inhibidores o que contenía inhibidores (1 μM), a la cámara inferior. A la cámara superior se añadieron unas 5 x 10⁴ células en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM. Se incubaron las placas de 24 pocillos con insertos durante 4 horas en un incubador con CO₂ al 5% a 37°C. Concluida la incubación, se extrajeron las cámaras y se las pasó a una placa de 24 pocillos fresca, se

ES 2 298 227 T3

extrajeron las células de la cámara interna pasando un hisopo varias veces, y se colocaron dichas células en la solución de tinción celular previamente preparada, dejándolas allí 30 minutos a temperatura ambiente. Al final de esta incubación, se extrajo la solución de tinción celular de los pocillos. Se lavaron las cámaras 3 veces con 1 ml de PBS por pocillo. Tras el lavado final con PBS, se examinaron las cámaras a fin de confirmar que las células presentasen la morfología correcta y se contaron las células adherentes empleando un microscopio invertido.

En la Figura 27 se ilustra un efecto de los compuestos recién sintetizados sobre la migración, inducida por LPA, de la célula de cáncer ovárico HEY. El compuesto 66 inhibió aproximadamente en un 70% la motilidad celular inducida por LPA; en cambio, el compuesto 55 (marginalmente) y el compuesto 56a potenciaron la motilidad celular inducida por el LPA.

Ejemplo 12

15 Citotoxicidad de los compuestos

Im *et al.* (2000) y los datos derivados del análisis mediante TI-PCR demostraron que en las líneas celulares de cáncer de próstata DU-145, PC-3 y LNCaP hay presencia de PLGFRs. Dada la prometedora actividad inhibidora que mostraron una serie de compuestos en la prueba de los oocitos de *Xenopus* y en la prueba de motilidad celular, se examinaron los efectos de inhibición del crecimiento, por parte de dicha serie de compuestos, en las líneas celulares de cáncer de próstata DU-145, PC-3 y LNCaP.

Se propagaron células DU-145, PC-3 y LNCaP en matraces de 150 cm² que contenían los medios RPMI 1640 o de Dulbecco modificado suplementados con suero fetal bovino al 10%. Se extrajeron las células de los matraces de concentración máxima (matraces "stock") empleando tripsina, se las centrifugó, resuspendió en medios frescos, y colocó en placas a una densidad aproximada de 2000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos. Las concentraciones finales de los fármacos oscilaron entre 0,05 y 10 ó 50 µM. Se llevaron a cabo experimentos de control en paralelo, sin adición de fármacos (control negativo) y con adición de 5-fluoroacilo (control positivo). Durante el transcurso del experimento se retiraron los medios, y a las 48 horas se volvieron a colocar medios con el fin de minimizar los efectos de la degradación de los fármacos. A las 96 horas de la exposición a los fármacos, las células fueron fijadas mediante adición de ácido tricloroacético (TCA) e incubación a 4°C durante 1 hora. Las células fijadas fueron teñidas con sulfurodamina B (SRB) y el número de células se determinó mediante comparación de la absorbancia a 540 nm (comparación con una curva estándar de número de células frente a absorbancia). Los experimentos se realizaron por duplicado. Se representó el número de células como porcentaje del control (pocillos no tratados) frente a la concentración de fármaco y a la concentración que inhibía el crecimiento celular en un 50% (CI₅₀) determinada mediante regresión no lineal (con el software WinNonlin, de la empresa Pharsight Corporation).

En la Tabla 3 se presentan los datos de los estudios de citotoxicidad llevados a cabo con las líneas celulares de cáncer de próstata DU-145, PC-3 y LNCaP, junto con los de los compuestos de referencia 5F-uracilo, LPA (18:1), SPH (13:0), SPP (13:0) y ácido fosfórico N-palmitoil L-serina (15:0).

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 298 227 T3

TABLA 3

Citotoxicidad de los compuestos sintetizados sobre líneas celulares de cáncer de próstata

5

	Compuesto	CI ₅₀ ± SEM (μ M) ^x		
		DU-145	PC-3	LNCaP
10	Fluorouracilo	6,8 ± 3,3	10,2 ± 4,1	2,8 ± 1,6
	LPA (18:1)	AD	28,5 ± 6,3	AD
15	SPP (13:0)	> 10	AD	SA
	SPH (13:0)	13,9 ± 1,1	11,7 ± 2,3	5,7 ± 2,1
	N-palmitoil-L-			
20	serina (15:0)	AD	AD	AD
	27	19,7 ± 6,0	AD	10,9 ± 2,7
	38	38,9 ± 8,9	?	?
25	51	8,1 ± 1,3	25,4 ± 3,6	19,9 ± 6,4
	55	24,9 ± 4,1	31,6 ± 9,0	4,9 ± 2,6
	56	2,3 ± 1,2	0,7 ± 0,1	13,5 ± 4,7
30	56a	0,7 ± 0,1	AD	30,3 ± 7,9
	57	9,1 ± 0,8	AD	10,7 ± 2,1
	66	SA	SA	3,1 ± 3,2
35	67	AD	AD	25,2 ± 12,3
	68	AD	AD	29,3 ± 21,7
	85	SA	SA	11,6 ± 10,3
40	86	SA	SA	?
	87	SA	SA	AD
	88	SA	SA	?
45	89	AD	SA	?
	90	> 50	AD	AD
	91	42,2 ± 1,9	AD	AD
50	92	AD	AD	AD

^xEl número de células como porcentaje del control (pocillos no tratados) se representó frente a la concentración de fármaco y a la concentración que inhibía el crecimiento celular en un 50% (CI₅₀) determinada mediante regresión no lineal (con el software WinNonlin, de la empresa Pharsight Corporation).

SEM = Error estándar de la media; AD = Actividad débil;

SA = Sin actividad;

? = La inhibición máxima fue del 50%.

65

60

55

50

40

30

25

20

15

10

5

ES 2 298 227 T3

Los compuestos 55, 56, 56a, 66 y 85 mostraron un abanico de actividades inhibidoras del crecimiento. El compuesto 56 fue un inhibidor más potente del crecimiento de las células DU-145 y PC-3 que el 5-fluorouracilo. Un hecho interesante fue que el 56a inhibió selectivamente el crecimiento de las células DU-145, mientras que se mostró menos potente contra las células PC-3; el compuesto 55 fue un inhibidor más potente del crecimiento de las células 5 LNCaP que del crecimiento de las células DU-145 y PC-3. El compuesto 66 inhibió selectivamente el crecimiento de las células LNCaP, mientras que no mostró actividad alguna frente a las células PC-3 y LNCaP. El compuesto 85 fue el que se mostró más activo de entre los compuestos difosfato (*sn*-1 acilo).

Discusión de los Ejemplos 1-12

10 Se sintetizaron de manera específica, y se analizaron, tres series de compuestos (35-43, 55-59, 66-68 y 85-92). En la primera y la segunda serie se amalgamaron los inhibidores endógenos SPH y SPP con el inhibidor sintético ácido fosfórico N-palmitoil L-serina, mientras que la tercera serie comprende los compuestos difosfato. En prueba de los oocitos de *Xenopus*, los compuestos 56, 57, 66 y 92 fueron inhibidores de las corrientes de cloruro inducidas por el 15 LPA. Además, los compuestos difosfato con una cadena más corta en la posición (*sn*-1) fueron capaces de provocar corrientes de cloruro en el oocito de *Xenopus*, [67 (umbral ~ 1 μ M), 68 (umbral ~ 10 nM) y 85 (umbral ~ 100 nM)]. Se demostró que el compuesto 66 inhibe la motilidad celular inducida por el LPA en líneas celulares de cáncer ovárico HEY. Al evaluar los efectos de inhibición del crecimiento de los mencionados compuestos sintetizados en las líneas celulares de cáncer de próstata DU-145, PC-3 y LNCaP, se descubrieron tres compuestos muy potentes y selectivos 20 (56, 56a y 66).

25 De los datos que se han expuesto anteriormente (en la Tabla 3) parece desprenderse que (i) los compuestos que contienen un alcohol y que no contienen fosfato son menos activos (27 frente a 56); (ii) los compuestos que tienen la fracción fosfato protegida son menos activos (51 frente a 56); (iii) la alquilación de la amina no reduce la actividad 30 (56a); (iv) el compuesto difosfato más potente presenta un enlace éter en la posición *sn*-1; (v) cuando se redujo la longitud de cadena en la serie de la SAP (55 frente a 56), la potencia contra DU-145 y PC-3 disminuyó (aunque la potencia contra las células LNCaP aumentó); (vi) cuando se redujo la longitud de cadena en la serie de los compuestos difosfato (*sn*-1 alquilo), la potencia disminuyó, aunque la selectividad por las células LNCaP se mantuvo; y (vii) la sustitución en la posición *sn*-1 (acilo frente a alquilo) no aumentó la potencia. Probablemente la ubicación de destino 35 de estas moléculas reside en la membrana celular (por ejemplo, un receptor transmembranal), dado que es improbable que los derivados fosfatados polares atraviesen con facilidad la membrana celular (aunque podría darse el caso de que existiese un sistema de transporte activo). De estos resultados parece desprenderse que las diferencias en los PLGFRs o los sucesos en la transducción de señales "downstream" pueden desempeñar una función importante en las propiedades de inhibición del crecimiento que estos compuestos tienen sobre las células de cáncer de próstata.

Ejemplo 13

Preparación y caracterización de líneas celulares estables que expresan el EDG-2, el EDG-4 y el EDG-7

40 En un esfuerzo por desarrollar antagonistas selectivos de los receptores EDG-2, EDG-4 y EDG-7, primero se eligió un sistema de identificación de compuestos candidatos. Como sistema modelo se eligieron las células RH7777, ya que existían informes de que, en un amplio abanico de estudios celulares, no respondían al LPA, y además porque se descubrió que no contenían ARNm para ninguno de los receptores EDG conocidos (Fukushima *et al.*, 1998). Se instituyeron en las células RH7777 líneas de células estables transfectadas con los receptores EDG, así como líneas 45 de células de control transfectadas con un vector vacío.

50 Se analizaron los clones resultantes, mediante monitorización de los incrementos transitorios de Ca^{2+} intracelulares y mediante TI-PCR. Este proceso de análisis condujo a la identificación de al menos tres líneas celulares que expresaban el EDG-2 y el EDG-7; no se logró identificar ninguna línea celular positiva que expresase el EDG-4. Asimismo, se halló que las células transfectadas con el vector no respondían al LPA. Aunque no se aislaron clones estables que expresasen el EDG-4, la expresión transitoria del EDG-4 condujo a la activación, mediada por el LPA, de los incrementos transitorios de Ca^{2+} intracelulares, lo que demostró que el constructo era funcionalmente activo en estas 55 células. La línea celular estable que expresaba el EDG-4 empleada en estos experimentos fue aislada y caracterizada por Im *et al.*, quienes nos proporcionaron amablemente ese clon (Im *et al.*, 2000).

55 Se caracterizaron aún más las líneas celulares con la intención de identificar una prueba adecuada para el análisis e identificación de posibles antagonistas. En las células que expresaban el EDG-2, así como en las que expresaban el EDG-4 de manera transitoria, se observó que el LPA provocaba la activación de la ERK 1/2; en las células que expresaban el EDG-7 no había activación de la ERK 1/2. El LPA provocaba incrementos transitorios de Ca^{2+} en todas 60 las líneas de células estables que expresaban el EDG-2, el EDG-4 y el EDG-7. Las curvas dosis-respuesta revelaron valores de CE_{50} (concentración efectiva media) de 378 ± 53 , 998 ± 67 , y 214 ± 26 nM para las células que expresaban el EDG-2, el EDG-4 y el EDG-7, respectivamente (Figuras 28A-C). Como el valor de CE_{50} determinado en el clon estable que expresaba el EDG-4 difería del que se había notificado anteriormente, se elaboró también una curva dosis-respuesta correspondiente a las células que expresaban el EDG-4 de manera transitoria (Figura 28B, An *et al.*, 1998a; An *et al.*, 1998b), la cual arrojó un valor de CE_{50} de 186 ± 39 .

65 Se examinó la capacidad del LPA para estimular la síntesis de ADN en las líneas de células estables; para ello, se midió la incorporación de ^3H -timidina. Ni las células RH7777 de referencia ni las células RH7777 transfectadas con el

ES 2 298 227 T3

vector mostraron un aumento de la incorporación de ^3H -timidina tras una incubación de 24 horas de duración con LPA 10 μM ; este hecho contrasta con un informe anterior en el que se notificaba que el LPA es mitógeno en estas células. En las células que expresaban el EDG-2, la incorporación de ^3H -timidina aumentó en un factor de 1,8, mientras que las células que expresaban el EDG-4 y el EDG-7 no mostraron aumento alguno de la incorporación de ^3H -timidina en comparación con las células de control.

Ejemplo 14

Actividad de los fosfatidatos de cadena corta sobre los receptores EDG-2 y EDG-7

Puesto que se habían provocado incrementos transitorios del Ca^{2+} en las tres líneas de células estables que expresaban el EDG-2, el EDG-4 y el EDG-7 (Figuras 28A-C), se empleó esta prueba con la intención de identificar posibles antagonistas. En un esfuerzo por identificar antagonistas selectivos de los miembros activados por LPA de la familia de receptores EDG, como punto de partida se emplearon las características estructurales del farmacóforo del LPA. Se probaron LPA (8:0) de cadena corta, o una mezcla de LPA (8:0) y LPA (18:1), como inhibidores del EDG-2, EDG-4 o EDG-7. Cuando se probó con las células una mezcla de LPA (8:0) y LPA (18:1), los incrementos del Ca^{2+} no se vieron afectados en ninguna de las tres líneas de células estables (véanse las Figuras 30A-C, 31A-C y 30A-B). El LPA (8:0) por sí solo no fue capaz de provocar incrementos del Ca^{2+} en ninguna de las células, ni siquiera a concentraciones tan altas como 10 μM .

Basándose en estos resultados, los solicitantes desarrollamos la hipótesis de que una modificación del farmacóforo del LPA, que restringiese estéricamente la movilidad de la cadena de ácido graso, podría afectar también a sus propiedades en cuanto a ligandos. Por este motivo, probamos también los compuestos con un segundo ácido graso de cadena corta, en la posición *sn*-2. Tales fosfatidatos de cadena corta presentan una mayor hidrofobicidad en relación con el LPA de cadena corta correspondiente, que podría limitar la interacción de dichos fosfatidatos con el bolsillo de unión a ligandos del receptor.

El ácido fosfatídico (PA) y el diacilglicerol pirofosfato (DGPP) son lípidos que se dan naturalmente y que comparten algunas propiedades químicas con el farmacóforo del LPA; presentan grupos fosfato iónicos y cadenas de ácidos grasos. Ninguno de ambos compuestos es agonista de los receptores EDG (véase más adelante). Teniendo en cuenta esta similitud, se preparó un DGPP de cadena corta y se lo probó como inhibidor del EDG-2, EDG-4 o EDG-7. Las Figuras 29A-D ilustran el efecto de un exceso diez veces mayor de DGPP (8:0) sobre los incrementos del Ca^{2+} generados por el LPA en las líneas de células estables. En las células que expresaban el EDG-2, los incrementos del Ca^{2+} fueron inhibidos un 50% aproximadamente (Figura 29A); en las células que expresaban el EDG-7, los incrementos del Ca^{2+} fueron inhibidos por completo (Figura 29C). En cambio, en las células que expresaban el EDG-4, los incrementos del Ca^{2+} no se vieron afectados por el DGPP (8:0) (Figura 29B). Dada la discrepancia en los valores de CE_{50} en relación con la expresión estable y transitoria del EDG-4 (Figura 29B), se probó de manera parecida el DGPP 8:0 en células que fueron transfectadas transitoriamente con el EDG-4. Los incrementos del Ca^{2+} no se vieron afectados por el DGPP 8:0 en las células que expresaban transitoriamente el EDG-4 (Figura 29D), y esto se ajustaba a los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo con las células estables. Se obtuvieron observaciones similares empleando PA 8:0 en cada una de las pruebas que se han descrito para el DGPP 8:0 (véase más adelante).

Se determinaron las curvas de inhibición de las células que expresaban el EDG-2 y el EDG-7, empleando concentraciones crecientes de DGPP 8:0 y manteniendo constante la concentración de LPA en la CE_{50} correspondiente al receptor estudiado. A partir de estas curvas se determinaron los valores de CI_{50} $285 \pm 28 \text{ nM}$ para el EDG-7 (Figura 30A) y $11,0 \pm 0,68 \mu\text{M}$ para el EDG-2 (Figura 31A). Empleando una cantidad constante de DGPP 8:0, cercana al valor de CI_{50} (250 nM para el EDG-7, 3 μM para el EDG-2), las curvas dosis-respuesta correspondientes al EDG-7 (Figura 30B) y al EDG-2 (Figura 31B) se desplazaron hacia la derecha, lo que indicaba la existencia de un mecanismo de inhibición competitivo.

Con el fin de definir mejor la relación entre estructura y actividad del DGPP y de las especies de cadena corta (8:0) y de cadena larga (18:1) del LPA, se probaron el DGPP, el PA y el DAG con líneas celulares que expresaban el EDG-2 y el EDG-7. La Figura 30C ilustra el efecto de estos lípidos sobre los incrementos del Ca^{2+} en células que expresaban el EDG-7, expuestas a una combinación de LPA 18:1 con cada uno de dichos lípidos. Para llevar a cabo estos experimentos se eligió una concentración de LPA cercana a la CE_{50} , mientras que los lípidos que se deseaba probar se aplicaron a una concentración igual a la CI_{50} del DGPP 8:0. El LPA 8:0 no tuvo efecto alguno sobre el EDG-7, mientras que tanto el DGPP 8:0 como el PA 8:0 inhibieron significativamente los incrementos del Ca^{2+} . Cuando se aumentó la longitud de cadena del DGPP y del PA a 18:1, estos análogos no fueron inhibidores del EDG-7 (Figura 30C). De igual manera, el DAG 18:1 no tuvo ningún efecto inhibidor sobre el EDG-7.

Se probó el mismo conjunto de lípidos con células que expresaban el EDG-2 (Figura 31C). Se emplearon análogos de longitud de cadena C8 (octil) del DGPP, PA y DAG a una concentración 10 μM ; a dicha concentración, todos ellos redujeron las respuestas (los incrementos del Ca^{2+}) en un 50%, 19% y 64% respecto del control, respectivamente. Tras aumentar la longitud de cadena a 18:1, el DGPP y el DAG dejaron de tener efecto inhibidor, mientras que el PA 18:1 mantuvo un efecto inhibidor modesto (redujo los incrementos del Ca^{2+} en un 18%). Se probó también el conjunto de lípidos con células que expresaban el EDG-4 (Figuras 32A-B). Cuando fueron probados con la líneas de células estables que expresaba el EDG-4, ninguno de los lípidos de cadena corta o larga tuvo efecto inhibidor, pero el PA 8:0 y el PA 18:1 aumentaron significativamente los incrementos del Ca^{2+} , en un 162% y un 137% respecto del

ES 2 298 227 T3

control, respectivamente. Para confirmar los resultados obtenidos con el clon estable, se probó el conjunto de lípidos con células que expresaban transitoriamente el EDG-4 (Figura 32B). De nuevo, ni las especies de cadena corta ni las especies de cadena larga del DGPP o del PA tuvieron efecto inhibidor sobre los incrementos del Ca^{2+} , lo cual se ajustaba a los resultados obtenidos con la línea de células estable. No obstante, a diferencia de lo que ocurría con el clon que expresaba el EDG-4 de manera estable, ninguno de los análogos del PA aumentó los incrementos del Ca^{2+} en las células que expresaban transitoriamente el EDG-4. Ninguna de las especies del PA, aplicada por sí sola, a concentraciones de hasta 10 μM , provocó una respuesta en células que expresaban de manera estable o transitoria el EDG-4.

Se examinó también el efecto del DGPP 8:0 sobre células que expresan endógenamente los receptores del LPA. Se halló que el DGPP 8:0 inhibía las corrientes de Cl^- (mediadas por el Ca^{2+}) que el LPA provocaba hacia el interior del oocito de *Xenopus*, con una CI_{50} de $96 \pm 21 \text{ nM}$ (Figura 33A). En presencia de una concentración 200 nM de DGPP 8:0, la curva dosis-respuesta correspondiente al LPA 18:1 se desplazó hacia la derecha, lo que indicaba la existencia de un mecanismo de acción competitivo semejante al hallado en los clones EDG-2 y EDG-7 (Figura 33B). Con el fin de determinar si el DGPP 8:0 actúa mediante un mecanismo intracelular o extracelular, se inyectó DGPP 8:0 intracelularmente y se expuso el oocito a LPA 18:1. La Figura 32C muestra que tras la inyección intracelular de DGPP 8:0, calculada para alcanzar una concentración > 300 nM, la inyección extracelular de LPA 18:1 5 nM provocó una respuesta que fue idéntica, en tamaño, a la del control. En cambio, la respuesta provocada en condiciones normales por el LPA 18:1 fue inhibida por completo cuando se aplicó DGPP 8:0 extracelularmente (Figura 33C). El efecto inhibidor del DGPP 8:0 era reversible, puesto que tras un lavado de 10 minutos de duración, la respuesta se recuperó hasta igualar el nivel de control (Figura 33C).

Con el fin de demostrar la especificidad del DGPP 8:0 hacia los receptores del LPA expresados en el oocito, se indujo la expresión de receptores de neurotransmisores mediante inyección de ARNm poliA+ procedente de cerebro de rata. Esto condujo a la expresión de los receptores, acoplados a proteína G, de la serotonina y de la acetilcolina, que no se expresan en oocitos que no han recibido la mencionada inyección. Estos neurotransmisores activan la misma ruta de señalización mediada por inositol trifosfato- Ca^{2+} que es activada por el LPA (Tigyi *et al.*, 1990). En estos oocitos, el DGPP 8:0 no inhibió las respuestas generadas por la serotonina, ni las generadas por el carbachol, lo que demuestra la especificidad del DGPP 8:0 hacia los receptores del LPA. Cuando se empleó PA 8:0 a concentraciones similares, el PA 8:0 se mostró también eficaz para inhibir las respuestas provocadas por el LPA en los oocitos.

También se examinó el efecto del DGPP 8:0 sobre las respuestas provocadas por el LPA en sistemas de mamíferos que expresan endógenamente los receptores del LPA. Se analizaron células NIH3T3 mediante TI-PCR para ver si presentaban ARNm que codificase receptores EDG/PSP24. La Figura 34A muestra que en las células NIH3T3 se detectaron transcriptos de ARNm para EDG-2, EDG-5 y PSP24. Para demostrar que el DGPP 8:0 inhibía específicamente los incrementos del Ca^{2+} provocados por el LPA, y no así los incrementos del Ca^{2+} provocados por el S1P, se expuso a las células NIH3T3 a LPA o S1P 100 nM en presencia de DGPP 8:0 10 μM . Como se ilustra en la Figura 34B, el DGPP 8:0 inhibió significativamente los incrementos del Ca^{2+} provocados por el LPA, y los incrementos del Ca^{2+} provocados por el S1P no se vieron afectados.

Se ha demostrado que el cáncer de ovario genera LPA, y que el LPA desempeña una función en el cáncer de ovario (Xu *et al.*, 1995a). Por lo tanto, se probó también el DGPP 8:0 en células de cáncer ovárico HEY con el fin de determinar si tenía un efecto sobre una diana terapéuticamente relevante. La Figura 34D muestra que el DGPP 8:0 inhibió la oscilación del Ca^{2+} provocada por el LPA en un 12% respecto del control (mientras que el DGPP 18:1 no tuvo efecto alguno). De igual manera, el PA 8:0 inhibió la oscilación del Ca^2 provocada por el LPA en un 6% respecto del control, y el PA 18:1 no tuvo efecto alguno. Las células HEY expresan transcriptos de ARNm para los receptores EDG-1, EDG-2, EDG-5 y EDG-7 (Figura 34C).

50 Ejemplo 15

Inhibición de la proliferación de las células NIH3T3

El efecto distintivo de un factor de crecimiento es su capacidad para provocar la proliferación celular. Dado que se ha demostrado que el LPA estimula la proliferación en un amplio abanico de tipos de células diferentes (Goetzl *et al.*, 2000), se examinó la capacidad del DGPP 8:0 para inhibir la proliferación celular en células NIH3T3. La Figura 35 muestra que el DGPP 8:0 inhibió significativamente la proliferación, inducida por el LPA, de las células NIH3T3 - reduciendo el número de células a niveles semejantes a los de las células de control - y que no tuvo efecto alguno sobre las células de control tratadas con un solvente. Con el fin de definir la relación estructura-actividad inherente al efecto inhibidor del DGPP 8:0, en la prueba se incluyeron las especies de cadena corta y de cadena larga del DGPP, PA y DAG. Como se ilustra en la Figura 35, ninguno de los lípidos incluidos en el conjunto empleado para la prueba tuvo un efecto inhibidor o estimulador significativo sobre las células de control tratadas con solvente. Únicamente el DGPP 8:0 inhibió la proliferación inducida por el LPA. Ni el DGPP 18:1 ni el PA o el DAG de cadena corta/larga tuvieron efecto alguno sobre la proliferación inducida por el LPA. Es un hecho interesante el que el PA 8:0 no tuviese un efecto inhibidor significativo en esta prueba.

Discusión de los Ejemplos 13-15

Se emplearon células RH7777 para la expresión heteróloga de los receptores EDG-2, EDG-4 y EDG-7 con el fin de identificar posibles antagonistas. Basándonos en nuestros modelos computacionales previos de los receptores EDG (Parrill *et al.*, 2000) y en los datos disponibles acerca de la relación estructura-actividad (Jalink *et al.*, 1995), los resultados experimentales que hemos descrito aquí demuestran que el fosfatidato de cadena corta DGPP 8:0 es un antagonista selectivo y competitivo del EDG-7, con un valor de CI_{50} de 285 ± 28 nM. Se halló asimismo que el DGPP 8:0 tenía un efecto inhibidor escaso sobre el EDG-2, con un valor de CI_{50} de $11,0 \pm 0,68$ μ M, y que no inhibió el EDG-4. El DGPP 8:0 inhibió la respuesta del LPA endógeno en los oocitos de *Xenopus*, con un valor de CI_{50} de 96 ± 21 nM. El PA 8:0 mostró propiedades de inhibición similares. Por lo tanto, estos fosfatidatos de cadena corta muestran de 40 a 100 veces más selectividad hacia el EDG-7 que hacia el EDG-2.

Estos resultados obtenidos con los fosfatidatos de cadena corta mencionados vienen a confirmar los obtenidos por Bandoh *et al.* (2000), quienes demostraron que el LPA, con una longitud de cadena del acilo de doce carbonos o menos, no genera respuestas en células de insectos que expresan el EDG-2, el EDG-4 o el EDG-7. Como se ha demostrado anteriormente, el LPA 8:0 no fue ni agonista ni antagonista del EDG-2, el EDG-4 o el EDG-7 en un sistema de expresión compuesto por células de mamíferos. El EDG-7 tiene 10 veces más preferencia por el LPA cuando el LPA tiene una cadena de ácido graso esterificada a la posición *sn*-2, frente al LPA con una cadena de ácido graso esterificada a la posición *sn*-1 (Bandoh *et al.*, 2000). Por lo tanto, la distancia de la cadena hidrocarbonada respecto de la fracción fosfato no impide la unión al receptor y la activación de este último. Asimismo, el EDG-7 muestra una preferencia por los ácidos grasos insaturados, de cadena larga, frente a sus homólogos saturados. La presencia de un enlace éter o de una cadena lateral de éter de vinilo también redujo la CE_{50} en dos órdenes de magnitud (Bandoh *et al.*, 2000). Además, hay una longitud de cadena hidrocarbonada óptima, a saber, 18 carbonos; los análogos de 20 carbonos fueron agonistas más débiles. Estas propiedades farmacológicas del EDG-7 parecen indicar que la activación del receptor depende de la longitud de cadena, así como de la flexibilidad de la cadena lateral (enlace éster frente a enlace éter).

Mediante el modelado computacional del receptor EDG-1 se han identificado tres residuos cargados que resultan necesarios para la unión a ligandos. Uno de estos residuos, la arginina 120, que se predice que interacciona con el grupo fosfato, se conserva en todos los miembros de la familia de los EDG. El segundo residuo, la arginina 292, aparece en una posición en la que todos los miembros de la familia de los EDG, salvo el EDG-8, tienen cerca un residuo catiónico. El tercer residuo, el glutamato 121, no se conserva en los receptores EDG específicos del LPA; en el EDG-2, el EDG-4 y el EDG-7, en el lugar correspondiente hay una glutamina. Se predice que este residuo glutamina interacciona con la fracción hidroxilo del LPA. La sustitución de este residuo por alanina ha conducido a la pérdida de la unión a ligandos y de la activación del receptor, lo que parece indicar que la interacción iónica entre las fracciones cargadas del farmacóforo de los PLGFs y estos tres residuos es necesaria para la unión a ligandos en el EDG-1 (Parrill *et al.*, 2000). En vista de todo esto, se formuló la hipótesis de que, para la activación de los agonistas, se necesita una combinación de interacciones en las que participan el ancla iónica y la cola hidrófoba. Los resultados que hemos expuesto respaldan dicha hipótesis, ya que demostraron que el LPA 8:0 de cadena corta no fue capaz de activar el EDG-2, el EDG-4 ni el EDG-7, lo que subraya la importancia que tiene la interacción entre la cola hidrófoba y el bolsillo de unión a ligandos. Como consecuencia, los solicitantes han designado a la cola hidrófoba como la región “interruptor” del farmacóforo de los PLGFs. Dada la relativa tolerancia, por parte de estos receptores, a la sustitución de los ácidos grasos en *sn*-1 y *sn*-2, los solicitantes se centraron en los fosfatidatos de cadena corta, que se pensó que no eran capaces de activar los receptores a causa de sus cadenas hidrocarbonadas truncadas. La movilidad estructural de las cadenas acilo en los fosfatidatos se ve limitada también por la fracción ácido graso adyacente. Los solicitantes exploraron asimismo los efectos de una fracción pirofosfato, que no sólo no cambia el carácter de carga negativa de la región de anclaje, sino que aumenta dicha carga negativa.

Este diseño farmacológico conceptual se sometió a prueba en líneas celulares clonales que expresaban los receptores EDG-2, EDG-4 y EDG-7. Se descubrió que las propiedades farmacológicas del DGPP 8:0 y del PA 8:0 son radicalmente diferentes en relación con los tres receptores. Ambas moléculas se mostraron eficaces como inhibidores del EDG-7, pero fueron más de un orden de magnitud menos eficaces a la hora de inhibir el EDG-2. Ninguna de las dos moléculas se mostró eficaz como inhibidor del EDG-4. Se halló también que el DGPP 8:0 era un inhibidor competitivo del EDG-2 y del EDG-7; desplazaba las curvas dosis-respuesta hacia la derecha y se producía un aumento de los valores de CE_{50} para el LPA en ambos receptores. La carencia de actividad agonista de las especies de PA y de DGPP de cadena larga correspondientes resalta las limitaciones que prevalecen en el bolsillo de unión a ligandos. La importancia que tiene el ancla iónica para el acoplamiento del ligando al bolsillo de unión se ve respaldada por la ausencia de inhibición por parte del DAG 8:0, aunque es probable que sus efectos celulares se confundan debido a sus acciones intracelulares sobre otras dianas moleculares, tales como la PKC.

Tanto el PA como el DGPP son lípidos que se dan en la naturaleza. El DGPP (8:0) fue descubierto en 1993 como un lípido novedoso que aparecía en las plantas y que es un producto de la fosforilación del PA por parte de la fosfatidato quinasa (Wissing y Behrbohm, 1993; Munnik *et al.*, 1996). El DGPP ha sido identificado en bacterias, levaduras y plantas, pero no así en células de mamíferos. Estudios recientes han revelado que el DGPP activa los macrófagos y estimula la producción de prostaglandinas mediante la activación de la fosfolipasa A₂ citosólica, lo que parece indicar que el DGPP desempeña una función en la respuesta inflamatoria (Balboa *et al.*, 1999; Balsinde *et al.*, 2000). Estos autores descartaron la posibilidad de que estos efectos fuesen mediados a través de los receptores del LPA. Los resultados que hemos expuesto, obtenidos con los análogos de cadena larga del DGPP y del PA, confirmaron

ES 2 298 227 T3

esta noción, ya que dichos compuestos no presentaron propiedades agonistas en las líneas celulares que expresaban receptores EDG a concentraciones de hasta 10 μM .

También se examinó el efecto de los fosfatidatos de cadena corta sobre los receptores del LPA que se expresaban endógenamente en tres tipos de células diferentes. Se halló que el DGPP 8:0 y el PA 8:0 eran eficaces como inhibidores de las corrientes de Cl^- provocadas por el LPA en los oocitos de *Xenopus*. Con el fin de determinar el lugar de acción, se inyectó DGPP 8:0 en oocitos y luego se les aplicó LPA extracelularmente. El DGPP 8:0 sólo se mostró eficaz como inhibidor de las corrientes de Cl^- provocadas por el LPA cuando fue aplicado extracelularmente, lo que demuestra que ejerce su efecto antagonista en la superficie celular. La especificidad del DGPP 8:0 hacia los receptores del LPA fue demostrada en oocitos y en células NIH3T3. En estas células, el DGPP 8:0 sólo inhibió eficazmente los incrementos del Ca^{2+} provocados por el LPA; no así los incrementos del Ca^{2+} provocados por el S1P, la acetilcolina o la serotonina.

El análisis mediante TI-PCR reveló que en las células NIH3T3 sólo se expresa el EDG-2 y no el EDG-4 ni el EDG-7. En las células NIH3T3, el DGPP 8:0, en un gran exceso (factor de 100), sólo inhibió los incrementos del Ca^{2+} en un 40%. Este nivel de inhibición es semejante al observado con el DGPP 8:0 en la línea de células estables que expresaba el EDG-2, donde también resultó ser un inhibidor débil. Cuando se evaluaron el DGPP y el PA de cadena corta en células de cáncer ovárico HEY, a un exceso de diez veces la concentración de LPA, ambos fueron inhibidores eficaces, mientras que ninguna de ambas moléculas de cadena larga tuvo efecto alguno. El análisis mediante TI-PCR reveló que en las células HEY el ARNm predominante codificaba el EDG-7 y sólo se detectó una pequeña cantidad de ARNm que codificase el EDG-2. Este nivel de inhibición es semejante al observado en la línea de células estables que expresaba el EDG-7, en la que tanto el DGPP 8:0 como el PA 8:0 fueron inhibidores eficaces.

Se evaluó la capacidad de ambos fosfatidatos de cadena corta para bloquear la proliferación de las células NIH3T3 inducida por el LPA. El DGPP 8:0 inhibió eficazmente la proliferación inducida por el LPA, mientras que el DGPP de cadena larga no la inhibió. Aunque el PA 8:0 inhibió eficazmente los incrementos del Ca^{2+} , no se mostró eficaz en inhibir la proliferación celular. Estos resultados son conformes con un informe previo en el que se notificaba que el LPA (12:0) no inhibió el efecto mitógeno del PA 18:1 (van Corven *et al.*, 1992). En las pruebas de larga duración preocupa la estabilidad de las moléculas, ya que las lípidofosfatasas podrían inactivar el antagonista. El hecho de que ni el PA ni el DAG inhibieron la proliferación parece indicar que es probable que el DGPP 8:0 sea más estable a lo largo de toda esta prueba. La estabilidad del DGPP fue también demostrada por Balboa *et al.* (1999), quienes notificaron que, en el transcurso de sus experimentos, el DGPP no era metabolizado.

El DGPP 8:0 representa una herramienta nueva importante para el campo de estudio que nos ocupa (no sólo los receptores EDG, sino también otros receptores de los PLGFs). El concepto de un ancla iónica y de un interruptor hidrófobo del farmacóforo de los PLGFs, derivado del modelado computacional de la familia de los EDG, debería resultar útil para el diseño y la síntesis de nuevos inhibidores.

Ejemplo 16

40 Síntesis de los compuestos intermedios fosfatados de cadena lineal 101-105

Compuesto 101

45 Diéster de ácido fosfórico con dibencilo y butilo

Se disolvieron 74 mg (1,00 mmol) de n-butanol anhidro y 365 mg (5,17 mmol) de 1*H*-tetrazol en 34 ml de cloruro de metileno anhidro en un matraz de fondo redondeado de 100 ml. Mediante una jeringa, se añadió una solución de 0,895 g (2,58 mmol) de dibencil-N,N-diisopropil fosforamido en 5 ml de cloruro de metileno anhidro, en atmósfera de argón y agitando. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se enfrió la mezcla de reacción en un baño de hielo seco con alcohol isopropílico a ~38°C. Se añadieron gota a gota 0,815 g (3,43 mmol) de ácido peracético al 32% en 28 ml de cloruro de metileno anhidro, mediante un embudo de adición. Tras la adición, se elevó la temperatura de la mezcla de reacción hasta ~0°C mediante baño de hielo. Se agitó la mezcla de reacción en el baño de hielo durante 1 hora. Después se transfirió la mezcla de reacción a un embudo separador y se diluyó la mezcla de reacción con 200 ml de cloruro de metileno. Se lavó la capa orgánica con metabisulfito sódico al 10% (2 x 40 ml), bicarbonato sódico saturado (2 x 40 ml), agua (30 ml) y solución salina saturada (40 ml). Se secó la capa orgánica con sulfato sódico anhidro, se la filtró y se la concentró en condiciones de vacío hasta secarla. Después, el producto bruto fue purificado mediante cromatografía con adsorción en gel de sílice empleando hexanos/acetato de etilo 1:1 como eluyente, obteniéndose el compuesto 101 (309 mg que contenían una pequeña cantidad de impureza originada en el exceso de reactivo fosforilador) en forma de aceite transparente. RMN ¹H (CDCl₃) 0,88 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃), 1,34 (sexteto, J = 7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,59 (quinteto, J = 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 3,99 (dt, J = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 5,02 (d, J = 1,8 Hz, 2H, OCH₂Ar), 5,05 (d, J = 2,1 Hz, 2H, OCH₂Ar), 7,35 (sa, 10H, 2 x ArH); RMN ¹³C (CDCl₃) 13,55, 18,60, 32,16, (d, J_{C,P} = 6,8 Hz), 67,72 (d, J_{C,P} = 6,1 Hz), 69,13 (d, J_{C,P} = 5,5 Hz), 127,90, 128,47, 128,55, 136,00 (d, J_{C,P} = 6,8 Hz); RMN ³¹P (CDCl₃) 16,84; MS (modo positivo): [M + 65 ²³Na] a m/z 357,3.

ES 2 298 227 T3

Compuesto 102

Diéster de ácido fosfórico con dibencilo y octilo

5 Se emplearon 130 mg (1,00 mmol) de n-octanol anhidro y se siguió un procedimiento análogo al empleado para obtener el compuesto 101. El producto bruto fue purificado mediante cromatografía con adsorción en gel de sílice empleando hexanos/acetato de etilo 7:3 como eluyente, obteniéndose el compuesto 102 (351 mg, 90%) en forma de aceite claro. RMN ^1H (CDCl_3) 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,24 (sa, 10H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1,60 (quinteto, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 3,98 (dt, $J = 6,6$ Hz, 6,9 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 5,02 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 5,05 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 7,34 (sa, 10H, 2 x ArH); RMN ^{13}C (CDCl_3) 14,09, 22,62, 25,38, 29,06, 29,14, 30,17 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,9$ Hz), 31,75, 68,05 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,2$ Hz), 69,12 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 5,5$ Hz), 127,90, 128,47, 128,56, 135,97 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,9$ Hz); RMN ^{31}P (CDCl_3) 16,83; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ a m/z 413,4.

Compuesto 103

Diéster de ácido fosfórico con dibencilo y dodecilo

15 Se emplearon 186 mg (1,00 mmol) de n-butanol anhidro y se siguió un procedimiento análogo al empleado para obtener el compuesto 101. El producto bruto fue purificado mediante cromatografía con adsorción en gel de sílice empleando hexanos/acetato de etilo 7:3 como eluyente, obteniéndose el compuesto 103 (361 mg, 81%) en forma de aceite claro. RMN ^1H (CDCl_3) 0,88 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3), 1,24 (sa, 18H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1,60 (quinteto, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 3,98 (td, $J = 6,9$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 5,02 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 5,05 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 7,34 (sa, 10H, 2 x ArH); RMN ^{13}C (CDCl_3) 14,13, 22,69, 25,38, 29,12, 29,35, 29,49, 29,56, 29,63, 30,18 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 7,0$ Hz), 31,92, 68,05 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,1$ Hz), 69,12 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 5,4$ Hz), 127,89, 128,46, 128,55, 135,97 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,8$ Hz); RMN ^{31}P (CDCl_3) 16,84; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ a m/z 469,1.

Compuesto 104

Diéster de ácido fosfórico con dibencilo y octadecilo

30 Se emplearon 270 mg (1,00 mmol) de octadecanol y se siguió un procedimiento análogo al empleado para obtener el compuesto 101. El producto bruto fue purificado mediante cromatografía con adsorción en gel de sílice empleando hexanos/acetato de etilo 7:3 como eluyente, obteniéndose el compuesto 104 (474 mg, 89%) en forma de sólido higroscópico de color blanco: pf 32-33°C; RMN ^1H (CDCl_3) 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,25 (sa, 30H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 1,60 (quinteto, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 3,98 (td, $J = 6,6$ Hz, 6,9 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 5,02 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 5,05 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 7,34 (sa, 10H, 2 x ArH); RMN ^{13}C (CDCl_3) 14,12, 22,70, 25,40, 29,13, 29,38, 29,51, 29,58, 29,68, 29,72, 30,20 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,9$ Hz), 31,94, 68,06 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,1$ Hz), 69,14 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 5,4$ Hz), 127,90, 128,47, 128,55, 136,00 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,8$ Hz); RMN ^{31}P (CDCl_3) 16,83; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ a m/z 553,3.

Compuesto 105

Diéster de ácido fosfórico con dibencilo y docosanilo

45 Se emplearon 327 mg (1,00 mmol) de docosanol y se siguió un procedimiento análogo al empleado para obtener el compuesto 101. El producto bruto fue purificado mediante cromatografía con adsorción en gel de sílice empleando hexanos/acetato de etilo 7:3 como eluyente, obteniéndose el compuesto 105 (516 mg, 88%) en forma de sólido higroscópico de color blanco: pf 43,5-44,5°C; RMN ^1H (CDCl_3) 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,25 (sa, 38H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 1,60 (quinteto, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 3,98 (td, $J = 6,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 5,02 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 5,05 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 7,35 (sa, 10H, 2 x ArH); RMN ^{13}C (CDCl_3) 14,13, 22,70, 25,39, 29,12, 29,37, 29,50, 29,57, 29,66, 29,71, 30,18 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,9$ Hz), 31,93, 68,06 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,0$ Hz), 69,13 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 5,6$ Hz), 127,89, 128,47, 128,55, 135,98 (d, $J_{\text{C},\text{P}} = 6,9$ Hz); RMN ^{31}P (CDCl_3) 16,83; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ a m/z 609,3.

Ejemplo 17

Síntesis de los compuestos intermedios fosfatados de cadena lineal 106-110

Compuesto 106

Fosfato de monobutilo

60 Se disolvieron 200 mg (0,60 mmol) del compuesto 101 en 30 ml de metanol anhidro en un recipiente a presión de paredes gruesas. Se purgó el recipiente con argón y se añadieron ~200 mg de paladio al 10% sobre carbón activado (Pd/C). Se conectó el recipiente a un aparato de hidrogenación y se mantuvo una atmósfera de hidrógeno a ~50 psi (~3,44 bares) dentro del recipiente de reacción a temperatura ambiente durante 8 horas. Despues se filtró la mezcla de reacción mediante vacío a través de una almohadilla de Celite que se lavó con metanol. Se evaporó el solvente, en condiciones de vacío, y tras la evaporación quedaron 70 mg (86%) del compuesto 106, en forma de aceite de color

ES 2 298 227 T3

amarillo. RMN ¹H (CDCl₃/MeOH-d₄) 0,95 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃), 1,43 (sexteto, J = 7,5 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,66 (quinteto, J = 6,9 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 3,99 (td, J = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃); RMN ¹³C (CDCl₃/MeOH-d₄) 13,71, 19,02, 32,72 (d, J_{C,P} = 7,2 Hz), 66,86 (d, J_{C,P} = 5,5 Hz); RMN ³¹P (CDCl₃/MeOH-d₄) 18,84; MS (modo negativo): [M - 1]⁻ a m/z 153,0.

5

Compuesto 107

Fosfato de monooctilo

10 Se emplearon 200 mg (0,51 mmol) del compuesto 102 y, siguiendo un procedimiento análogo al empleado para obtener el compuesto 106, se aislaron 100 mg (93%) del compuesto 107, en forma de sólido pegajoso de color blanco amarillento. RMN ¹H (CDCl₃/MeOH-d₄) 0,89 (t, J = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 1,29 (sa, 10H, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 1,67 (quinteto, J = 6,9 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 3,97 (dt, J = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₃); RMN ¹³C (CDCl₃/MeOH-d₄) 14,18, 22,98, 25,89, 29,57, 29,58, 30,76 (d, J_{C,P} = 7,3 Hz), 32,18, 67,16 (d, J_{C,P} = 5,2 Hz); RMN ³¹P (CDCl₃/MeOH-d₄) 20,55; MS (modo negativo): [M - 1]⁻ a m/z 209,1.

Compuesto 108

Fosfato de monododecilo

20 Se emplearon 200 mg (0,45 mmol) del compuesto 103 y se siguió un procedimiento igual al empleado para obtener el compuesto 106, obteniéndose 112 mg (94%) del compuesto 108, en forma de sólido de color blanco. RMN ¹H (CDCl₃/MeOH-d₄) 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H, CH₃), 1,27 (sa, 18H, OCH₂CH₂(CH₂)₉CH₃), 1,67 (quinteto, J = 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₉CH₃), 3,97 (dt, J = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₉CH₃); RMN ¹³C (CDCl₃/MeOH-d₄) 14,21, 22,98, 25,84, 29,57, 29,67, 29,89, 29,92, 29,96, 29,98, 30,69 (d, J_{C,P} = 7,4 Hz), 32,25, 67,22 (d, J_{C,P} = 5,7 Hz); RMN ³¹P (CDCl₃/MeOH-d₄) 21,22; MS (modo negativo): [M - 1]⁻ a m/z 265,0.

Compuesto 109

Fosfato de monoctadecilo

30 Se emplearon 200 mg (0,38 mmol) del compuesto 104 y se siguió un procedimiento análogo al empleado para obtener el compuesto 106, obteniéndose 104 mg (79%) del compuesto 109, en forma de sólido de color blanco. RMN ¹H (CDCl₃/MeOH-d₄) 0,89 (t, J = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 1,27 (sa, 30H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₅CH₃), 1,68 (quinteto, J = 6,9 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₅CH₃), 3,98 (dt, J = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₅CH₃); RMN ¹³C (CDCl₃/MeOH-d₄) 14,26, 23,14, 26,01, 29,74, 29,84, 30,06, 30,09, 30,16, 30,87 (d, J_{C,P} = 7,2 Hz), 32,42, 67,32 (d, J_{C,P} = 5,8 Hz); RMN ³¹P (CDCl₃/MeOH-d₄) 21,69; MS (modo negativo): [M - 1]⁻ a m/z 349,1.

Compuesto 110

Fosfato de monodocosilo

40 Se emplearon 200 mg (0,34 mmol) del compuesto 105 y se siguió un procedimiento igual al empleado para obtener el compuesto 106, obteniéndose 98 mg (71%) del compuesto 110, en forma de sólido de color blanco. RMN ¹H (CDCl₃/MeOH-d₄) 0,88 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 1,26 (sa, 38H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₉CH₃), 1,66 (quinteto, J = 6,9 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₉CH₃), 3,97 (td, J = 6,6 Hz, 6,6 Hz, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₉CH₃); RMN ¹³C (CDCl₃/MeOH-d₄) 14,22, 23,01, 25,87, 29,61, 29,71, 29,93, 29,97, 30,04, 30,73 (d, J_{C,P} = 7,4 Hz), 32,29, 67,27 (d, J_{C,P} = 5,6 Hz); RMN ³¹P (CDCl₃/MeOH-d₄) 20,66; MS (modo negativo): [M - 1]⁻ a m/z 405,1.

50 Ejemplo 18

Compuestos fosfatados de cadena lineal 106-110

55 Se emplearon oocitos de *Xenopus*, que expresan endógenamente el PLGFR PSP24, para evaluar la actividad inhibitoria del LPA de los compuestos 106-110. Los oocitos se obtuvieron (en condiciones asépticas) de ranas *Xenopus laevis* adultas (obtenidas de la empresa Carolina Scientific, Burlington [Carolina del Norte], Estados Unidos) anestesiadas con xilazina, y se los preparó para el experimento. Los oocitos de fase V-VI fueron desprovistos de la capa de células foliculares mediante tratamiento con collagenasa de tipo A (obtenida de Boehringer, [Indiana], Estados Unidos), empleada en una concentración de 1,4 mg/ml en una solución una solución de cloruro sódico compuesta (solución de Ringer-2) ovárica libre de Ca²⁺ ((OR-2) NaCl 85,2 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,5, con NaOH). Se mantuvo a los oocitos en una solución de Barth en un incubador a una temperatura de 17 a 20°C, y se los empleó durante 2-7 días tras su aislamiento.

60 Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos empleando un amplificador con fijación del voltaje de dos electrodos estándar, manteniendo el potencial de membrana en -60 mV (GeneClamp 500, Axon Instruments, California, Estados Unidos). Los compuestos que se deseaba probar fueron disueltos en MeOH, formando un complejo con BSA libre de ácidos grasos, y diluidos con una solución de cloruro sódico compuesta (solución de Ringer-Na⁺) (NaCl 120 nM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, HEPES 5 mM; pH 7,0) de rana; los compuestos así preparados fueron aplicados mediante

ES 2 298 227 T3

superfusión al oocito a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Las corrientes de membrana fueron registradas mediante un osciloscopio digital NIC-310 (de la empresa Nicolet, Madison [Wisconsin], Estados Unidos). Las aplicaciones se realizaron a intervalos de 15 minutos (mínimo) con el fin de permitir un período de reposo farmacológico adecuado y para que los oocitos se recuperasen de la desensibilización.

5 La Figura 36 ilustra la inhibición, proporcional a la dosis, de las corrientes de cloruro inducidas por el LPA, por parte de los compuestos 106-110. El compuesto 108 fue el mejor inhibidor, con un valor de IC_{50} de unos 8,1 nM. Los compuestos que presentaban grupos alquilo de cadena lineal más corta o más larga exhibieron una eficacia decreciente a la hora de inhibir las corrientes de cloruro inducidas por el LPA, aunque el compuesto 107 mostró una eficacia similar a la del compuesto 108, con un valor de IC_{50} de unos 10,2 nM. En la Figura 37 se comparan los valores de CE_{50} correspondientes a la solución de control positivo (sólo LPA), 25 nm, y a una solución que contenía LPA y 100 nM del compuesto 108, 343 nM. De los datos se concluye que el compuesto 108 inhibe eficazmente la señalización inducida por el LPA a través de los receptores PSP24 en los oocitos de *Xenopus*.

10 15 Sobre la base de estos resultados, se examinó asimismo la eficacia del compuesto 108 como antagonista de los receptores EDG-2, EDG-4 y EDG-7 en células RH7777 que expresan heterólogamente cada uno de los receptores.

20 25 La Figura 38 ilustra el efecto del compuesto 108 sobre los incrementos del Ca^{2+} en células que expresaban el EDG-2, el EDG-4 y el EDG-7, expuestas a una combinación de LPA 18:1 y compuesto 108. Para la realización de estos experimentos, se eligió una concentración de LPA cercana a la CE_{50} . El compuesto 108 inhibió significativamente los incrementos del Ca^{2+} , reduciéndolas hasta niveles de alrededor de un 63% y de un 56% respecto del control, respectivamente, en líneas celulares que expresaban el EDG-2 y el EDG-7. En cambio, en líneas celulares que expresaban el EDG-4, el compuesto 108 aumentó significativamente los incrementos del Ca^{2+} , hasta niveles de alrededor de un 148% respecto del control.

Por lo tanto, cabe esperar que los compuestos fosfatados de cadena lineal inhiban selectivamente *in vivo* la actividad del EDG-2 y del EDG-7, y que aumenten selectivamente *in vivo* la actividad del EDG-4.

Lista de referencias

- 30 Cada una de las referencias indicadas a continuación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad en el documento de esta solicitud.
- 35 **Ahn et al.**, “Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling”, *J. Biol. Chem.* **274**:1185-1188 (1999).
- 40 **An et al.**, “Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids”, *FEBS Lett.* **417**:279-282 (1997a).
- 45 **An et al.**, “Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**(3):619-622 (1997b).
- 50 **An et al.**, “Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid”, *J. Biol. Chem.* **273**:7906-7910 (1998a).
- 55 **An et al.**, “Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization”, *Mol. Pharmacol.* **54**:881-888 (1998b).
- 60 **Balazs et al.**, “Topical application of LPA accelerates wound healing”, *Ann. N. Y Acad. Sci.* **905**:270-273 (2000).
- 65 **Balboa et al.**, “Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate”, *J. Biol. Chem.* **274**:522-526 (1999).
- 70 **Balsinde et al.**, “Group IV cytosolic phospholipase A2 activation by diacylglycerol pyrophosphate in murine P3 88D1 macrophages”, *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:11-15 (2000).
- 75 **Bandoh et al.**, “Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid”, *J. Biol. Chem.* **274**:27776-27785 (1999).
- 80 **Bandoh et al.**, “Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species; Structure-activity relationship of cloned LPA receptors”, *FEBS Lett.* **478**:159-165 (2000).
- 85 **Bishop and Bell**, “Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation”, *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:579-610 (1988).
- 90 **Bittman et al.**, “Inhibitors of lipid phosphatidate receptors: N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids”, *J. Lipid Res.* **37**:391-398 (1996).

ES 2 298 227 T3

- Bosch, "Phosphoglyceride metabolism", *Annu. Rev. Biochem.* **43**:243-277 (1974).
- Cherrick *et al.*, "Effects of topically applied 5-fluorouracil in the Syrian hamster", *J. Invest. Dermatol.*, **63**:284-286 (1974).
- Cunnick *et al.*, "Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway", *J. Biol. Chem.* **273**:14468-14475 (1998).
- Durieux *et al.*, "Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive Ca^{2+} -activated Cl⁻ current in *Xenopus laevis* oocytes", *Am. J Physiol.* **263**:896-900 (1992).
- Dyer *et al.*, "The effect of serum albumin on PC12 cells: I. Neurite retraction and activation of the phosphoinositide second messenger system", *Mol. Brain Res.* **14**:293-301 (1992).
- Eicholtz *et al.*, "The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets", *Biochem. J* **291**:677-680 (1993).
- Femhout *et al.*, "Lysophosphatidic acid induces inward currents in *Xenopus laevis* oocytes; evidence for an extracellular site of action", *European Journal of Pharmacology* **213**:313-315 (1992).
- Fischer *et al.*, "Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes", *Mol. Pharmacol.* **54**:979-988 (1998).
- Fukami and Takenawa, "Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal", *J. Biol. Chem.* **267**:10988-10993 (1992).
- Fukushima *et al.*, "A single receptor encoded by vvg-l/lpAl/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6151-6 (1998).
- Gerrard *et al.*, "Lysophosphatidic acids influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux", *Am. J. Path.* **96**:423-438 (1979).
- Ghosh *et al.*, "Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling", *Faseb. J.* **11**:45-50 (1997).
- Goetzl *et al.*, "Lysophospholipid Growth Factors", in *Cytokine Reference* (Oppenheim, J, ed.), Academic Press, New York, 1407-1418 (2000).
- Gohla *et al.*, "The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho", *J. Biol. Chem.* **273**:4653-4659 (1998).
- Gonda *et al.*, "The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signaling pathways", *Biochem. J.* **337**:67-75 (1999).
- Guo *et al.*, "Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes", *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **93**:14367-14372 (1996).
- Hecht *et al.*, "Ventricular zone gene-1 (vvg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenie regions of the developing cerebral cortex", *J. Cell. Biol.* **135**:1071-1083 (1996).
- Herrlich *et al.*, "Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8985-8990 (1998).
- Hill *et al.*, "The Rho family GTPases RhoA, Rae I, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF", *Cell* **81**:1159-1170 (1995).
- Hoffmann-Wellenhof *et al.*, "Correlation of melanoma cell motility and invasion *in vitro*", *Melanoma. Res.* **5**:311-319 (1995).
- Hooks *et al.*, "Characterization of a receptor subtype-selective lysophosphatidic acid mimetic", *Mol. Pharmacol.* **53**:188-194 (1998).
- Hunt and Goodson, In: *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way, Appleton & Lange), págs. 86-98 (1988).
- Im *et al.*, "Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate", *Mol. Pharmacol.* **57**:753-759 (2000).

- Imamura et al.**, "Serum requirement for *in vitro* invasion by tumor cells", *Jpn. J. Cancer Res.* **82**:493-496 (1991).
- Imamura et al.**, "Induction of *in vitro* tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D", *Biochem. Biophys. Res. Com.* **193**:497-503 (1993).
- Imamura et al.**, "rho-Mediated protein tyrosine phosphorylation in lysophosphatidic-acid- induced tumor-cell invasion", *Int. J. Cancer* **65**:627-632 (1996).
- Jalink et al.**, "Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca^{2+} - mobilizing stimulus for fibroblasts", *J. Biochem.* **265**:12232-12239 (1990).
- Jalink and Moolenaar**, "Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers", *J. Cell Biol.* **118**:411-419 (1992).
- Jalink et al.**, "Lysophosphatidic Acid is a Chemoattractant for Dictyostelium Discoideum Amoebae", *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **90**:1857-1861 (1993a).
- Jalink et al.**, "Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action", *Cell Growth Differ.* **4**:247-255 (1993b).
- Jalink et al.**, "Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator", *Biochimica et. Biophysica Acta* **1198**:185-196 (1994a).
- Jalink et al.**, "Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho", *J. Cell Biol.* **126**:801-810 (1994b).
- Jalink et al.**, "Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis", *Biochem. J.* **307**:609-616 (1995).
- Kartha et al.**, "Adenine nucleotides stimulate migration in wounded cultures of kidney epithelial cells", *J. Clin. Invest.*, **90**:288-292 (1992).
- Kawasawa et al.**, "Brain-specific expression of novel G-protein-coupled receptors, with homologies to *Xenopus* PSP24 and human GPR45", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**(3):952-956 (2000).
- Kimura et al.**, "Effect of sphingosine and its N-methyl derivatives on oxidative burst, phagokinetic activity, and trans-endothelial migration of human neutrophils", *Biochem. Pharmacol.* **44**:1585-1595 (1992).
- Kimura et al.**, "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho- kinase)", *Science* **273**:245-248 (1996).
- Kobayashi et al.**, "Existence of a Bioactive Lipid, Cyclic Phosphatidic Acid in Human Serum", *Life Sci.* **56**:245-253 (1999).
- Liliom et al.**, "N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids are selective competitive antagonists of the lysophosphatidic acid receptors", *Mol. Pharmacol.* **50**:616-623 (1996).
- Liliom et al.**, "Identification of a novel growth factor-like lipid, l-O-cis-alk-1'-enyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate (alkenyl-GP) that is present in commercial sphingolipid preparations", *J. Biol. Chem.* **273**:13461-13468 (1998).
- Lin et al.**, "Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1", *J. Biol. Chem.* **272**:31051-31057 (1997).
- Liotta et al.**, "Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastasis", *Anticancer Drug Des.* **2**:195-202 (1987).
- Liu et al.**, "Synthesis, calcium mobilizing, and physicochemical properties of D-chiro-inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate, a novel and potent ligand at the D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor", *J. Med. Chem.* **42**:1991-1998 (1999).
- Luttrell et al.**, "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes", *Science* **283**:655-661 (1999).
- Lynch et al.**, "Structure/activity relationships in lysophosphatidic acid: the 2-hydroxyl moiety", *Mol. Pharmacol.* **52**:75-81 (1997).
- Machesky and Hall**, "Rho: a connection between membrane signaling and cytoskeleton", *Trends Cell Biol.* **6**:304-310 (1996).

ES 2 298 227 T3

- Macrae *et al.*, "Cloning, characterization, and chromosomal localization of recl.3, a member of the G-protein-coupled receptor family highly expressed in brain", *Brain Res. Mol. Brain Res.* **42**:245-254 (1996).
- Mills *et al.*, "A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization, and mechanism of action", *Cancer Res.* **48**:1066-1071 (1988).
- Mills *et al.*, "Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells", *J. Clin. Invest.* **86**:851-855 (1990).
- Miyata *et al.*, "New wound-healing model using cultured corneal endothelial cells: Quantitative study of healing process", *Jpn. J. Ophthalmol.*, **34**:257-266 (1990).
- Moolenaar, "G-protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis, and cell proliferation", *Cell Growth Differ.* **2**:359-364 (1991).
- Moolenaar, "A novel lipid mediator with diverse biological actions", *Trends in Cell Biology* **4**:213-219 (1994).
- Moolenaar, "Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger", *J. Biol. Chem.*, **270**:12949-12952 (1996).
- Moolenaar *et al.*, "Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses", *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:168-173 (1997).
- Mukai *et al.*, "Mechanism of tumor cell invasion studied by a culture model—modification of invasiveness by host mediators", *Hum. Cell* **6**:194-198 (1993).
- Muller *et al.*, "Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5600-5604 (1987).
- Munnik *et al.*, "Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants", *J. Biol. Chem.* **271**:15708-15715 (1996).
- Murakami-Murofushi *et al.*, "Inhibition of cell proliferation by a unique lysophosphatidic acid, PHYLPA, isolated from Physarum polycephalum: signaling events of antiproliferative action by PHYLPA", *Cell Struct. Funct.* **18**:363-370 (1993).
- Myher *et al.*, "Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human plasma: comparison to red blood cells", *Lipids* **24**:408-418 (1989).
- Ohkawara *et al.*, In: *Biochemistry of Cutaneous Epithelial Differentiation*, Seiji *et al.*, eds., University Park Press, Baltimore, 1977, págs. 274-278.
- Parrill *et al.*, "Identification of edg 1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate", *J. Biol. Chem.* **275**:39379-393784 (2000).
- Postma *et al.*, "Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor", *Embo. J.* **15**:2388-2392 (1996).
- Ridley, "Rho: theme and variations", *Curr. Biol.* **6**:1256-1264 (1996).
- Ridley and Hall, "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors", *Cell* **70**:389-399 (1992).
- Sato *et al.*, "Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis", *J. Cell Biol.*, **107**:1199-1205 (1988).
- Schumacher *et al.*, "Platelet aggregation evoked *in vitro* and *in vivo* by phosphatidic acids and lysodervatives: identity with substances in aged serum (DAS)", *Thrombos. Haemostas.* **42**:631-640 (1979).
- Simon *et al.*, "Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators?", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**:1743-1750 (1982).
- Spiegel and Milstien, "Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors", *Biochim. et. Biophys. Acta.* **1484**:107-116 (2000).
- Sugiura *et al.*, "Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: Comparison with platelet activating factor", *Arch. Biochem. Biophys.* **311**:358-368 (1994).

ES 2 298 227 T3

- Sun et al.**, "Synthesis of Chiral 1-(2'-Amino-2'-carboxyethyl)-1,4-dihydro-6,7-quinoxaline-2,3-diones: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate Receptor Agonists and Antagonists", *J. Med. Chem.* **39**:4430-4438 (1996).
- 5 **Tigyi et al.**, "A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1521-1525 (1990).
- 10 **Tigyi et al.**, "A factor that activates oscillatory chloride currents in *Xenopus* oocytes copurifies with a subfraction of serum albumin", *J. Biol. Chem.* **266**:20602-20609 (1991).
- 15 **Tigyi and Miledi**, "Lysophosphatides bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells", *J. Biol. Chem.* **267**:21360-21367 (1992).
- 20 **Tigyi et al.**, "Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1908-1912 (1994).
- 25 **Tigyi et al.**, "Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho", *J. Neurochem.* **66**:537-548 (1996).
- 30 **Tigyi et al.**, "Pharmacological characterization of phospholipid growth factor receptors", *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:34-53 (2000).
- 35 **Tokumura et al.**, "Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acid on the arterial blood pressure of different animal species", *Lipids* **13**:572-574 (1978).
- 40 **Tokumura et al.**, "Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats", *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **245**:74-83 (1980).
- 45 **Tokumura et al.**, "Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**:391-398 (1981).
- 50 **Tokumura et al.**, "Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma", *Biochim. et. Biophys. Acta.* **875**:31-38 (1986).
- 55 **Tokumura et al.**, "Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta", *Am. J. Physiol.* **267**:204-210 (1994).
- 60 **Umansky et al.**, "Prevention of rat neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by stimulated *in vitro* ischemia and reperfusion", *Cell Death Diff.* **4**:608-616 (1997).
- 65 **van Brocklyn et al.**, "Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi- coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival", *J. Cell. Biol.* **142**:229-240 (1998).
- 70 **van Brocklyn et al.**, "Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6", *Blood* **95**:2624-2629 (2000).
- 75 **van Corven et al.**, "Lysophosphatidic-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins", *Cell* **59**:45-54 (1989).
- 80 **van Corven et al.**, "Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts: Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin", *Biochem. J.* **281**:163-169 (1992).
- 85 **van der Bend et al.**, "The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D: Comparison with the response to endothelin", *Biochem. J.* **285**:235-240 (1992a).
- 90 **van der Bend et al.**, "Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid", *EMBO J.* **11**:2495-2501 (1992b).
- 95 **Verrier et al.**, "Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene", *EMBO J.* **5**:913-917 (1986).
- 100 **Wissing and Behrbohm**, "Diacylglycerol pyrophosphate, a novel phospholipid compound", *FEBS Lett.* **315**:95-99 (1993).

- Xu et al.**, "Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients", *Clin. Cancer Res.* **1**:1223-1232 (1995a).
- 5 **Xu et al.**, "Effect of lysophospholipids on signaling in the human Jurkat T cell line", *J. Cell. Physiol.*, **163**:441-450 (1995b).
- 10 **Yatomi et al.**, "Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets", *Blood* **86**:193-202 (1995).
- 15 **Zsiros et al.**, "Naturally occurring inhibitors of lysophosphatidic acid", *Abstr. 6th. International Congress on Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators*, pág. 128 (1998).
- 19 Aunque en la presente invención se han ilustrado y descrito detalladamente formas de realización preferidas, será evidente para los expertos en la materia que es posible realizar diversas modificaciones, adiciones, sustituciones, etc., sin apartarse del espíritu de la presente invención y, por lo tanto, dichas modificaciones, adiciones, sustituciones, etc., se consideran incluidas dentro del ámbito de la invención, tal como se define en las reivindicaciones que se indican a continuación.
- 20 **Referencias citadas en la descripción**
- 25 Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.
- 30 **Documentos que no son patentes citados en la descripción**
- **AHN et al.** Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.*, **1999**, vol. 274, 1185-1188
 - 35 • **AN et al.** Identification of cDNAs encoding two Gprotein-coupled receptors for lysosphingolipids. *FEBS. Lett.*, **1997**, vol. 417, 279-282 [0269]
 - 40 • **AN et al.** Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, vol. 231 (3), 619-622 [0269]
 - 45 • **AN et al.** Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **1998**, vol. 273, 7906-7910 [0269]
 - 50 • **AN et al.** Recombinant humanGprotein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization. *Mol. Pharmacol.*, **1998**, vol. 54, 881-888 [0269]
 - 55 • **BALAZS et al.** Topical application of LPA accelerates wound healing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**, vol. 905, 270-273 [0269]
 - 60 • **BALBOA et al.** Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, **1999**, vol. 274, 522-526 [0269]
 - 65 • **BALSINDE et al.** Group IV cytosolic phospholipase A2 activation by diacylglycerol pyrophosphate in murine P388D1 macrophages. *Ann. NY Acad. Sci.*, **2000**, vol. 905, 11-15 [0269]
 - 70 • **BANDOH et al.** Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **1999**, vol. 274, 27776-27785 [0269]
 - 75 • **BANDOH et al.** Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species; Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.*, **2000**, vol. 478, 159-165
 - 80 • **BISHOP; BELL.** Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1988**, vol. 4, 579-610 [0269]
 - 85 • **BITTMAN et al.** Inhibitors of lipid phosphatidate receptors: N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids. *J. Lipid Res.*, **1996**, vol. 37, 391-398 [0269]
 - 90 • **BOSCH.** Phosphoglyceride metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, **1974**, vol. 43, 243-277 [0269]

ES 2 298 227 T3

- **CHERRICK** *et al.* Effects of topically applied 5-fluorouracil in the Syrian hamster. *J. Invest. Dermatol.*, 1974, vol. 63, 284-286 [0269]
- 5 • **CUNNICK** *et al.* Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 14468-14475
- **DURIEUX** *et al.* Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive Ca²⁺-activated Cl⁻ current in Xenopus laevis oocytes. *Am. J. Physiol.*, 1992, vol. 263, 896-900 [0269]
- 10 10 • **DYER** *et al.* The effect of serum albumin on PC12 cells: I. Neurite retraction and activation of the phosphoinositide second messenger system. *Mol. Brain Res.*, 1992, vol. 14, 293-301 [0269]
- 15 • **EICHOLTZ** *et al.* The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem. J.*, 1993, vol. 291, 677-680 [0269]
- **FERNHOUT** *et al.* Lysophosphatidic acid induces inward currents in Xenopus laevis oocytes; evidence for an extracellular site of action. *European Journal of Pharmacology*, 1992, vol. 213, 313-315 [0269]
- 20 20 • **FISCHER** *et al.* Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, 1998, vol. 54, 979-988 [0269]
- **FUKAMI; TAKENAWA**. Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 10988-10993 [0269]
- 25 25 • **FUKUSHIMA** *et al.* A single receptor encoded by vwg-1/lpA1/edg-2 couples to Gproteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 6151-6
- **GERRARD** *et al.* Lysophosphatidic acids influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux. *Am. J. Path.*, 1979, vol. 96, 423-438 [0269]
- 30 30 • **GHOSH** *et al.* Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *Faseb. J.*, 1997, vol. 11, 45-50 [0269]
- Lysophospholipid Growth Factors. **GOETZL** *et al.* Cytokine Reference. Academic Press, 2000, 1407-1418
- 35 • **GOHLA** *et al.* The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 4653-4659 [0269]
- **GONDA** *et al.* The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signaling pathways. *Biochem. J.*, 1999, vol. 337, 67-75 [0269]
- 40 40 • **GUO** *et al.* Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from Xenopus oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 14367-14372 [0269]
- **HECHT** *et al.* Ventricular zone gene-1 (vgz-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell. Biol.*, 1996, vol. 135, 1071-1083 [0269]
- 45 45 • **HERRLICH** *et al.* Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 8985-8990 [0269]
- **HILL** *et al.* The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 1995, vol. 81, 1159-1170 [0269]
- 50 50 • **HOFFMANN-WELLENHOF** *et al.* Correlation of melanoma cell motility and invasion *in vitro*. *Melanoma Res.*, 1995, vol. 5, 311-319 [0269]
- **HOOKS** *et al.* Characterization of a receptor subtype-selective lysophosphatidic acid mimetic. *Mol. Pharmacol.*, 1998, vol. 53, 188-194 [0269]
- 60 60 • **HUNT; GOODSON**. *Current Surgical Diagnosis & Treatment*, 1988, 86-98 [0269]
- **IM** *et al.* Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol. Pharmacol.*, 2000, vol. 57, 753-759 [0269]
- 65 65 • **IMAMURA** *et al.* Serum requirement for *in vitro* invasion by tumor cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1991, vol. 82, 493-496 [0269]

- IMAMURA *et al.* Induction of *in vitro* tumor cell invasion of cellular monolayers by lysphosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1993, vol. 193, 497-503 [0269]
- 5 • IMAMURA *et al.* rho-Mediated protein tyrosine phosphorylation in lysophosphatidic-acid- induced tumor-cell invasion. *Int. J. Cancer*, 1996, vol. 65, 627-632 [0269]
- JALINK *et al.* Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺-mobilizing stimulus for fibroblasts. *J. Biochem.*, 1990, vol. 265, 12232-12239 [0269]
- 10 10 • JALINK; MOOLENAAR. Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J. Cell Biol.*, 1992, vol. 118, 411-419 [0269]
- 15 • JALINK *et al.* Lysophosphatidic Acid is a Chemoattractant for Dictyostelium Discoideum Amoebae. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.*, 1993, vol. 90, 1857-1861 [0269]
- 20 15 • JALINK *et al.* Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ.*, 1993, vol. 4, 247-255 [0269]
- 20 • JALINK *et al.* Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochimica et. Biophysica Acta.*, 1994, vol. 1198, 185-196 [0269]
- 25 • JALINK *et al.* Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J. Cell Biol.*, 1994, vol. 126, 801-810 [0269]
- 25 30 • JALINK *et al.* Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis. *Biochem. J.*, 1995, vol. 307, 609-616 [0269]
- 30 • KARTHA *et al.* Adenine nucleotides stimulate migration in wounded cultures of kidney epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1992, vol. 90, 288-292 [0269]
- 35 • KAWASAWA *et al.* Brain-specific expression of novel G-protein-coupled receptors, with homologies to Xenopus PSP24 and human GPR45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 276 (3), 952-956 [0269]
- 35 • KIMURA *et al.* Effect of sphingosine and its N-methyl derivatives on oxidative burst, phagokinetic activity, and trans-endothelial migration of human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.*, 1992, vol. 44, 1585-1595
- 40 • KIMURA *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho- kinase. *Science*, 1996, vol. 273, 245-248 [0269]
- 40 • KOBAYASHI *et al.* Existence of a Bioactive Lipid, Cyclic Phosphatidic Acid in Human Serum. *Life Sci.*, 1999, vol. 56, 245-253 [0269]
- 45 • LILIOIM *et al.* N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids are selective competitive antagonists of the lysophosphatidic acid receptors. *Mol. Pharmacol.*, 1996, vol. 50, 616-623 [0269]
- 50 • LILIOIM *et al.* Identification of a novel growth factor-like lipid, 1-O-cis-alk-1'-enyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate (alkenyl-GP) that is present in commercial sphingolipid preparations. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 13461-13468 [0269]
- 50 • LIN *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/ dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 31051-31057 [0269]
- 55 • LIOTTA *et al.* Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Anticancer Drug Des.*, 1987, vol. 2, 195-202 [0269]
- 55 • LIU *et al.* Synthesis, calcium mobilizing, and physicochemical properties of D- chiro-inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate, a novel and potent ligand at the D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Med Chem.*, 1999, vol. 42, 1991-1998 [0269]
- 60 • LUTTRELL *et al.* Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 1999, vol. 283, 655-661 [0269]
- 60 • LYNCH *et al.* Structure/activity relationships in lysophosphatidic acid: the 2-hydroxyl moiety. *Mol. Pharmacol.*, 1997, vol. 52, 75-81 [0269]
- 65 • MACHESKY; HALL. Rho: a connection between membrane signaling and cytoskeleton. *Trends Cell Biol.*, 1996, vol. 6, 304-310 [0269]

- **MACRAE** *et al.* Cloning, characterization, and chromosomal localization of rec1.3, a member of the G-protein-coupled receptor family highly expressed in brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1996, vol. 42, 245-254 [0269]
- 5 • **MILLS** *et al.* A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization, and mechanism of action. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, 1066-1071 [0269]
- **MILLS** *et al.* Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells. *J. Clin. Invest.*, 1990, vol. 86, 851-855
- 10 10 • **MIYATA** *et al.* New wound-healing model using cultured corneal endothelial cells: Quantitative study of healing process. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 1990, vol. 34, 257-266 [0269]
- 15 • **MOOLENAAR**. G-protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis, and cell proliferation. *Cell Growth Differ.*, 1991, vol. 2, 359-364 [0269]
- 15 • **MOOLENAAR**. A novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends in Cell Biology*, 1994, vol. 4, 213-219 [0269]
- 20 20 • **MOOLENAAR**. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 270, 12949-12952 [0269]
- 25 • **MOOLENAAR** *et al.* Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997, vol. 9, 168-173 [0269]
- 25 • **MUKAI** *et al.* Mechanism of tumor cell invasion studied by a culture model-modification of invasiveness by host mediators. *Hum. Cell*, 1993, vol. 6, 194-198 [0269]
- 30 • **MULLER** *et al.* Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1987, vol. 84, 5600-5604 [0269]
- 30 • **MUNNIK** *et al.* Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 15708-15715 [0269]
- 35 • **MURAKAMI-MUROFUSHI** *et al.* Inhibition of cell proliferation by a unique lysophosphatidic acid, PHYLPA, isolated from Physarum polycephalum: signaling events of antiproliferative action by PHYLPA. *Cell Struct. Funct.*, 1993, vol. 18, 363-370 [0269]
- 40 • **MYHER** *et al.* Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human plasma: comparison to red blood cells. *Lipids*, 1989, vol. 24, 408-418 [0269]
- 40 • **OHKAWARA** *et al.* Biochemistry of Cutaneous Epithelial Differentiation. University Park Press, 1977, 274-278 [0269]
- 45 • **PARRILL** *et al.* Identification of edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 39379-393784 [0269]
- 45 • **POSTMA** *et al.* Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *Embo. J.*, 1996, vol. 15, 2388-2392 [0269]
- 50 • **RIDLEY**. Rho: theme and variations. *Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 1256-1264 [0269]
- 50 • **RIDLEY; HALL**. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 1992, vol. 70, 389-399 [0269]
- 55 • **SATO** *et al.* Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, 1988, vol. 107, 1199-1205
- 60 • **SCHUMACHER** *et al.* Platelet aggregation evoked *in vitro* and *in vivo* by phosphatidic acids and lysodervatives: identity with substances in aged serum (DAS. *Thrombos. Haemostas.*, 1979, vol. 42, 631-640 [0269])
- 60 • **SIMON** *et al.* Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, vol. 108, 1743-1750 [0269]
- 65 • **SPIEGEL; MILSTIEN**. Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. et. Biophys. Acta.*, 2000, vol. 1484, 107-116 [0269]
- 65 • **SUGIURA** *et al.* Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: Comparison with platelet activating factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, vol. 311, 358-368

ES 2 298 227 T3

- SUN *et al.* Synthesis of Chiral 1-(2'-Amino-2'-carboxyethyl)-1,4-dihydro-6,7-quinoxaline-2,3-diones: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate Receptor Agonists and Antagonists. *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 4430-4438 [0269]
- 5 • TIGYI *et al.* A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 1521-1525 [0269]
- 10 • TIGYI *et al.* A factor that activates oscillatory chloride currents in Xenopus oocytes copurifies with a subfraction of serum albumin. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 20602-20609 [0269]
- 15 • TIGYI; MILEDI. Lysophosphatides bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 21360-21367
- 20 • TIGYI *et al.* Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 1908-1912 [0269]
- 25 • TIGYI *et al.* Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho. *J. Neurochem.*, 1996, vol. 66, 537-548 [0269]
- 30 • TIGYI *et al.* Pharmacological characterization of phospholipid growth factor receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000, vol. 905, 34-53 [0269]
- 35 • TOKUMURA *et al.* Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acid on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids*, 1978, vol. 13, 572-574 [0269]
- 40 • TOKUMURA *et al.* Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1980, vol. 245, 74-83 [0269]
- 45 • TOKUMURA *et al.* Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 99, 391-398 [0269]
- 50 • TOKUMURA *et al.* Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim. et. Biophys. Acta.*, 1986, vol. 875, 31-38 [0269]
- 55 • TOKUMURA *et al.* Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am. J. Physiol.*, 1994, vol. 267, 204-210 [0269]
- 60 • UMANSKY *et al.* Prevention of rat neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by stimulated *in vitro* ischemia and reperfusion. *Cell Death Diff.*, 1997, vol. 4, 608-616
- 65 • VAN BROCKLYN *et al.* Dual actions of sphingosine- 1-phosphate: extracellular through the Gi- coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell. Biol.*, 1998, vol. 142, 229-240 [0269]
- 70 • VAN BROCKLYN *et al.* Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood*, 2000, vol. 95, 2624-2629 [0269]
- 75 • VAN CORVEN *et al.* Lysophosphatidic-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, 1989, vol. 59, 45-54 [0269]
- 80 • VAN CORVEN *et al.* Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts: Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem. J.*, 1992, vol. 281, 163-169 [0269]
- 85 • VAN DER BEND *et al.* The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D: Comparison with the response to endothelin. *Biochem. J.*, 1992, vol. 285, 235-240 [0269]
- 90 • VAN DER BEND *et al.* Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO*, 1992, vol. 11, 2495-2501 [0269]
- 95 • VERRIER *et al.* Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene. *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 913-917 [0269]
- 100 • WISSING; BEHRBOHM. Diacylglycerol pyrophosphate, a novel phospholipid compound. *FEBS Lett.*, 1993, vol. 315, 95-99 [0269]

ES 2 298 227 T3

- **XU et al.** Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 1995, vol. 1, 1223-1232 [0269]
- 5 • **XU et al.** Effect of lysophospholipids on signaling in the human Jurkat T cell line. *J. Cell. Physiol.*, 1995, vol. 163, 441-450 [0269]
- **YATOMI et al.** Sphingosine-1-phosphate: a platelet- activating sphingolipid released from agonist- stimulated human platelets. *Blood*, 1995, vol. 86, 193-202 [0269]
- 10 10 • **ZHOU et al.** Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 25549-25556 [0269]
- 15 • **ZSIROS et al.** Naturally occurring inhibitors of lysophosphatidic acid. *Abstr. 6th. International Congress on Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators*, 1998, 128 [0269]

20

25

30

35

40

45

50

55

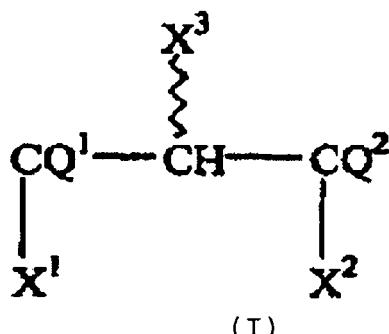
60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula (I)

5



10

15

20 donde

X¹ es $(HO)_2PO-Z^1-$ o $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$;X² y X³ son ambos R^1-NR^2-A- , cada uno siendo igual o diferente;

25

A es un enlace directo, $(CH_2)_k$, siendo k un número entero comprendido entre 0 y 30, o es O;Z¹ es $-O(CH_2)_m$, siendo m un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

30

Z² es $-O(CH_2)_n$, siendo n un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Q¹ y Q² son, independientemente, H₂ o =O;

35

R¹ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, seleccionadas del grupo de los alquilos, los alcóxidos, los ácidos y los alcoholes, un acilo que incluye un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, -C(O)-O-R⁷; y

40

R² es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

45

R⁷ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

50

donde cuando X¹ es $(HO)_2PO-O-$, X² es NHCH₃, Q¹ es H₂ y Q² es =O, entonces X³ no es -NHR₂, donde R₂ es hidrógeno o un acilo sustituido por metilo o fenilo.

55

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

Q¹ es H₂;

Q² es =O;

60

X¹ es $(HO)_2PO-Z^1-$; yX² y X³ son ambos R^1-NH- ;

65

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que X³ es -NH₂ y X² es R^1-NH- , siendo R¹ un alquilo de cadena lineal de C14 a C18.

4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es un alquilo C14.

ES 2 298 227 T3

5. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R¹ es un alquilo C18.

6. Compuesto según la reivindicación 2, en el que

5 X³ es NHR¹-, siendo R¹ un grupo acetilo; y

X² es NHR¹-, siendo R¹ un alquilo C14.

7. Composición farmacéutica que comprende:

10 un portador farmacéuticamente aceptable y

un compuesto según la reivindicación 1.

15 8. Procedimiento para modular la actividad del receptor del LPA *in vitro*, que comprende:

proporcionar un compuesto según la reivindicación 1 que tiene actividad como agonista del receptor del LPA o como antagonista del receptor del LPA, y

20 poner en contacto un receptor del LPA *in vitro* con el compuesto en condiciones eficaces para modular la actividad del receptor del LPA.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el receptor del LPA está presente en una célula mantenida en un cultivo.

25 10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el receptor del LPA se selecciona del grupo que consiste en EDG-2, el EDG-4, el EDG-7 y el PSP-24.

11. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el compuesto tiene actividad como agonista del receptor del LPA, y dicho contacto se lleva a cabo en condiciones eficaces para inducir la actividad del receptor del LPA.

30 12. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el compuesto tiene actividad como antagonista del receptor del LPA, y dicho contacto se lleva a cabo en condiciones eficaces para reducir la actividad del receptor del LPA.

35 13. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, que tiene actividad como antagonista del receptor del LPA, para la fabricación de un medicamento anticanceroso.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el medicamento anticanceroso está destinado al tratamiento del cáncer de próstata o del cáncer de ovario.

40 15. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, que tiene actividad como agonista del receptor del LPA para la fabricación de un medicamento que induce la proliferación celular.

16. Procedimiento para la fabricación un compuesto según la reivindicación 1, que comprende:

45 hacer reaccionar (Y²O)₂PO-Z¹¹-Z¹³ o (Y²O)₂PO-Z¹²-P(OH)O-Z¹¹-Z¹³, donde

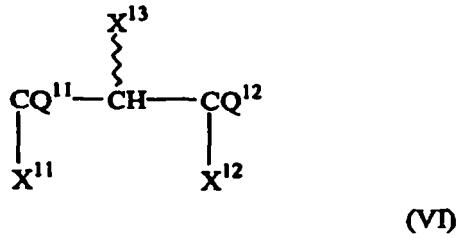
Z¹¹ es -O(CH₂)_m, siendo m un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

50 Z¹² es -O(CH₂)_n, siendo n un número entero comprendido entre 1 y 50, o es -O-;

Z¹³ es H o un primer grupo saliente, o bien -Z¹¹-Z¹³ juntos forman el primer grupo saliente; e

Y² es H o un grupo protector,

55 con un compuesto intermedio según la fórmula (VI)



ES 2 298 227 T3

donde

X¹² y X¹³ son ambos R¹¹-NR¹²-A-, siendo cada uno iguales o diferentes entre sí;

5 X¹¹ es OH, NH₂, SH o un segundo grupo saliente;

A es o bien un enlace directo, o bien (CH₂)_k, siendo k un número entero comprendido entre 0 y 30, o es O;

Q¹¹ y Q¹² son, independientemente, H₂ o =O;

10 R¹¹ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, seleccionadas del grupo de los alquilos, los alcóxidos, los ácidos y los alcoholes, un acilo que incluye un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, -C(O)-O-R¹⁶; y

15 R¹² es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

20 R¹⁶ es, independientemente, hidrógeno, un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, un alquenilo de cadena lineal o ramificada de C2 a C30, un anillo aromático con o sin monosustituciones, disustituciones o trisustituciones del anillo, un acilo que incluye un alquilo de C1 a C30 o un anillo aromático, un arilalquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30, o un ariloxialquilo que incluye un alquilo de cadena lineal o ramificada de C1 a C30;

25 si es necesario, después se lleva a cabo una etapa de desprotección, realizándose tanto dicha etapa de reacción como dicha etapa de desprotección en condiciones que resultan eficaces para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde X¹ es (HO)₂PO-Z¹⁻ o (HO)₂PO-Z²-P(OH)O-Z¹⁻.

35

40

45

50

55

60

65

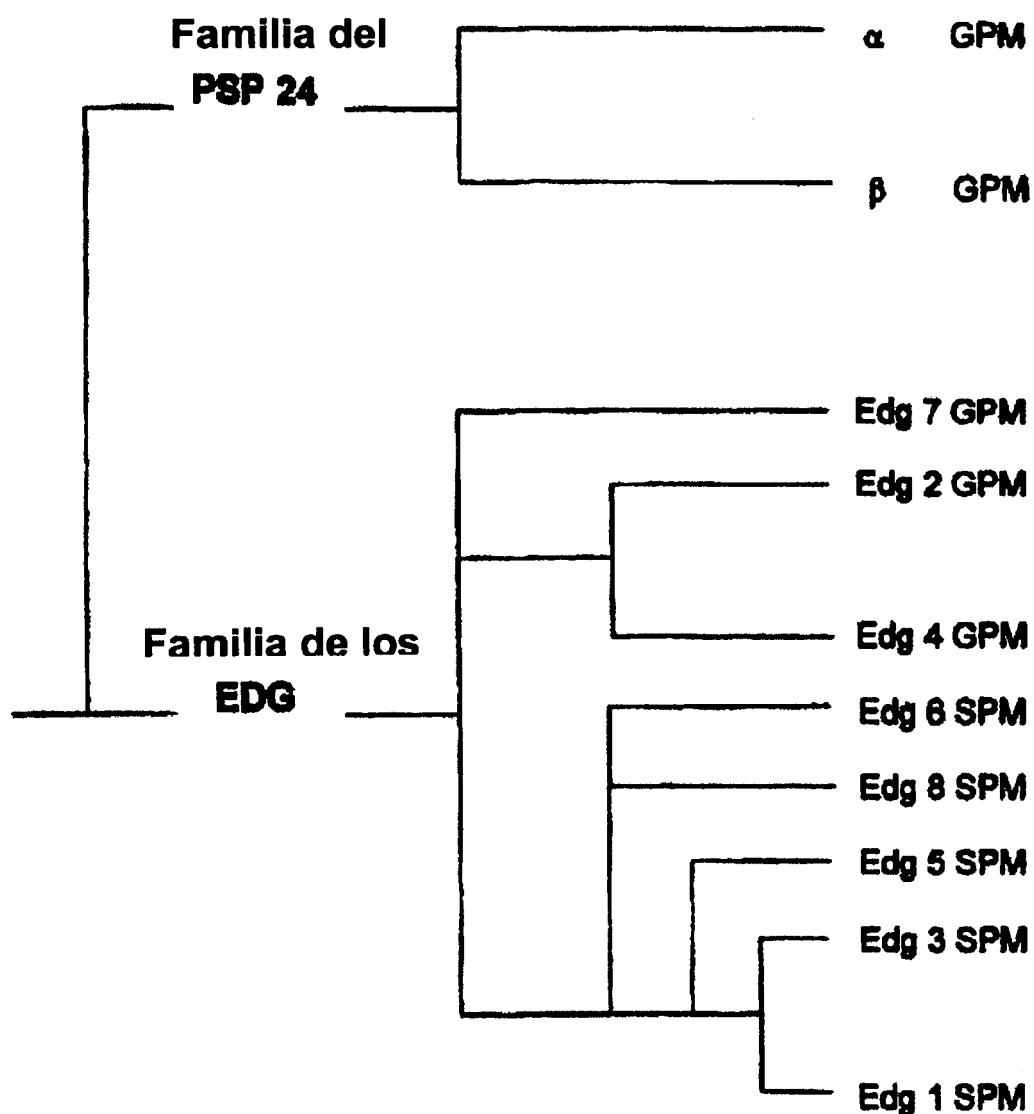
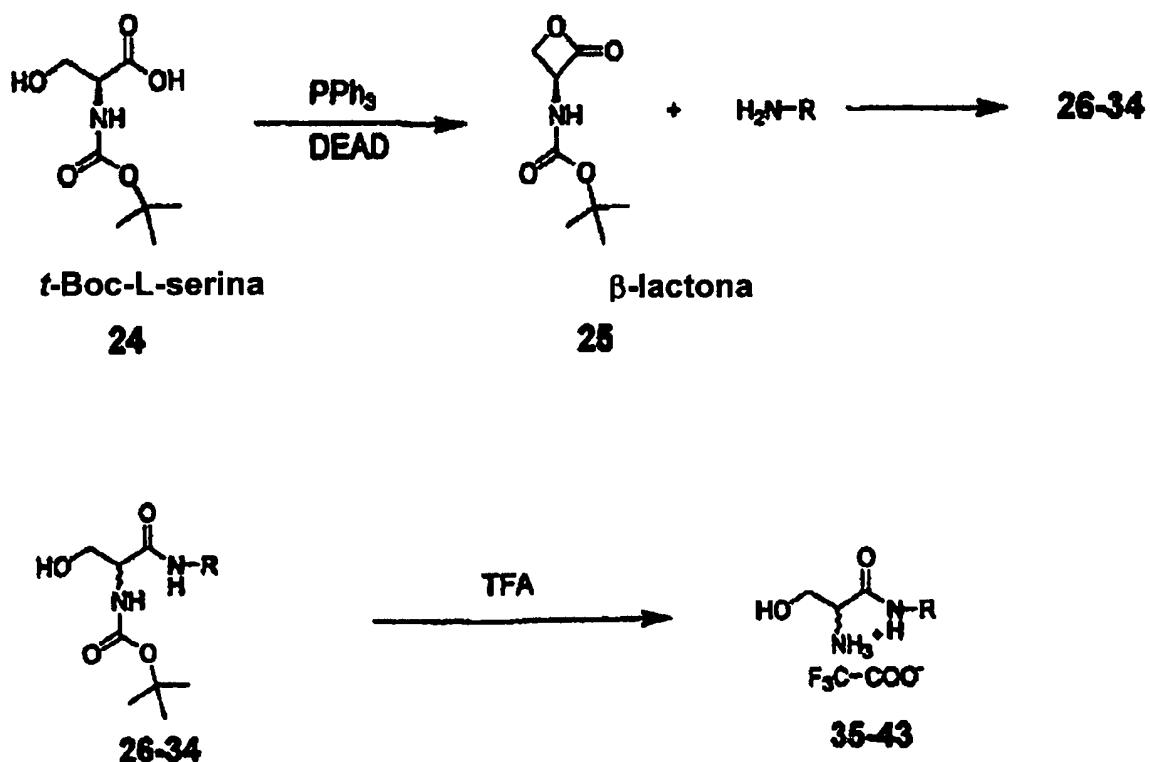
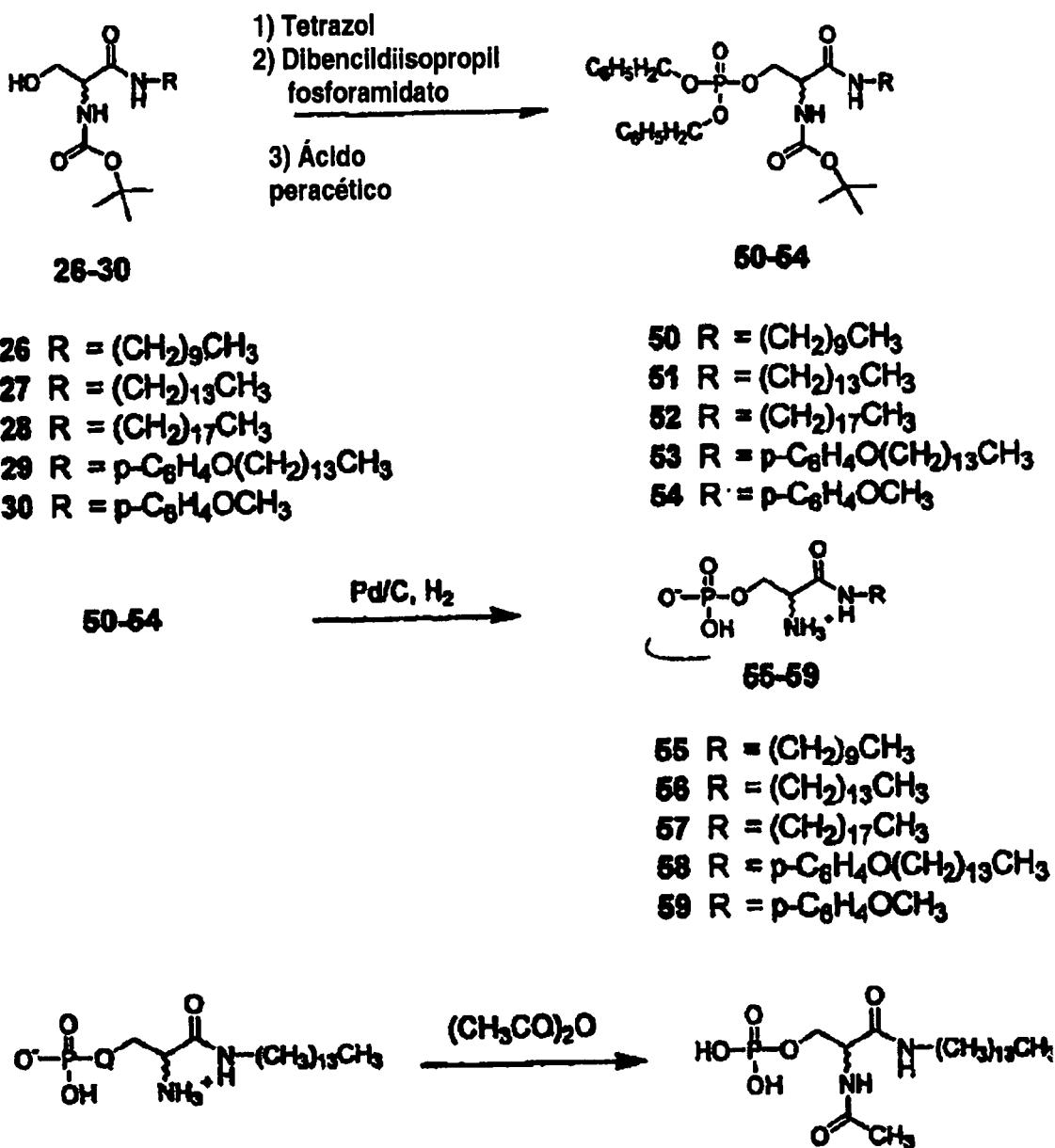


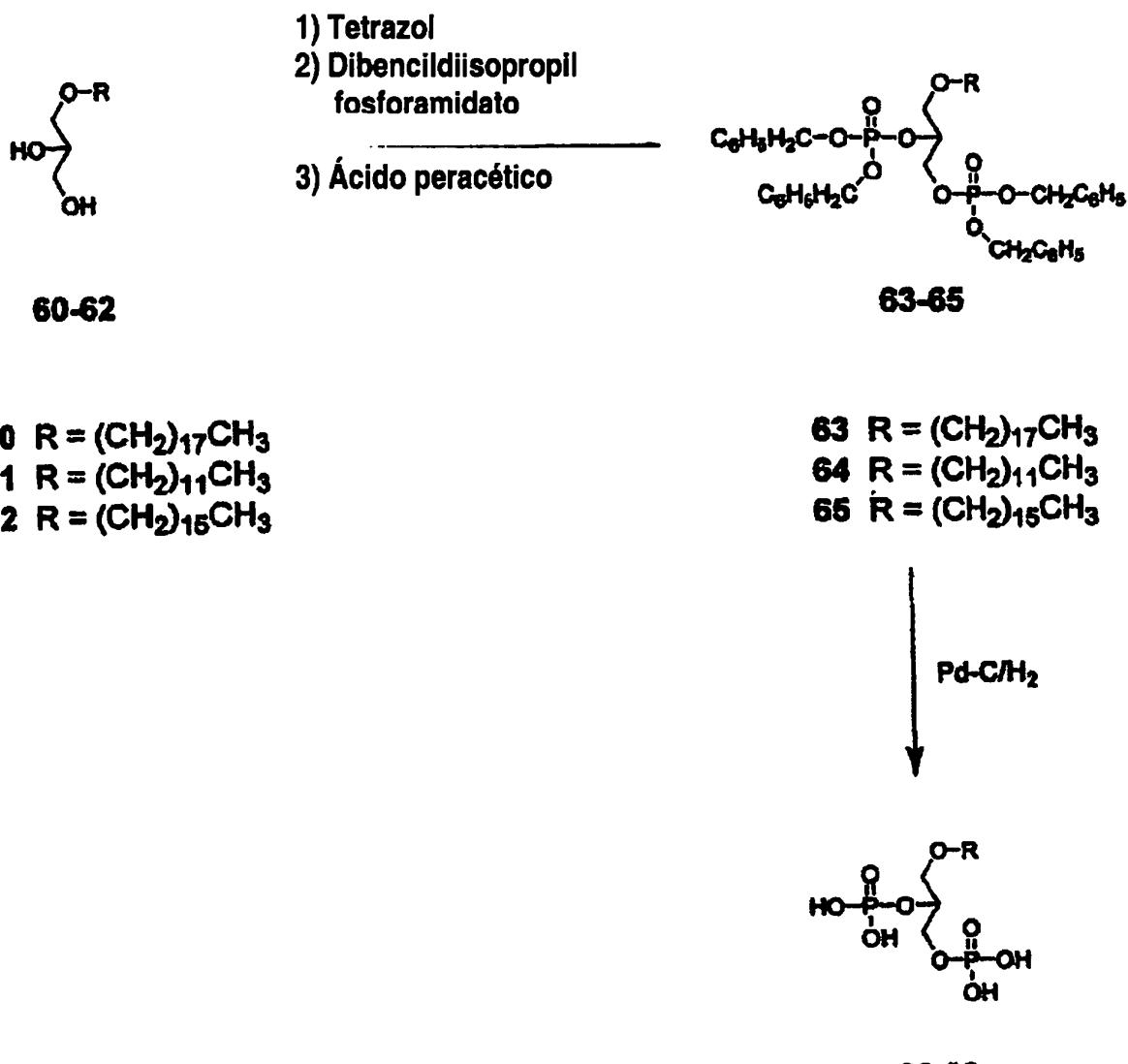
Figura 1



- | | | | |
|-----------|--|-----------|--|
| 26 | $\text{R} = (\text{CH}_2)_{9}\text{CH}_3$ | 36 | $\text{R} = (\text{CH}_2)_{9}\text{CH}_3$ |
| 27 | $\text{R} = (\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ | 36 | $\text{R} = (\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 28 | $\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ | 37 | $\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ |
| 29 | $\text{R} = \text{p-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ | 38 | $\text{R} = \text{p-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 30 | $\text{R} = \text{p-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ | 39 | $\text{R} = \text{p-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ |
| 31 | $\text{R} = \text{m-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ | 40 | $\text{R} = \text{m-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 32 | $\text{R} = \text{m-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ | 41 | $\text{R} = \text{m-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ |
| 33 | $\text{R} = \text{o-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ | 42 | $\text{R} = \text{o-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 34 | $\text{R} = \text{o-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ | 43 | $\text{R} = \text{o-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ |

Figura 2

**Figura 3**

**Figura 4**

66 R = (CH₂)₁₇CH₃
67 R = (CH₂)₁₁CH₃
68 R = (CH₂)₁₅CH₃

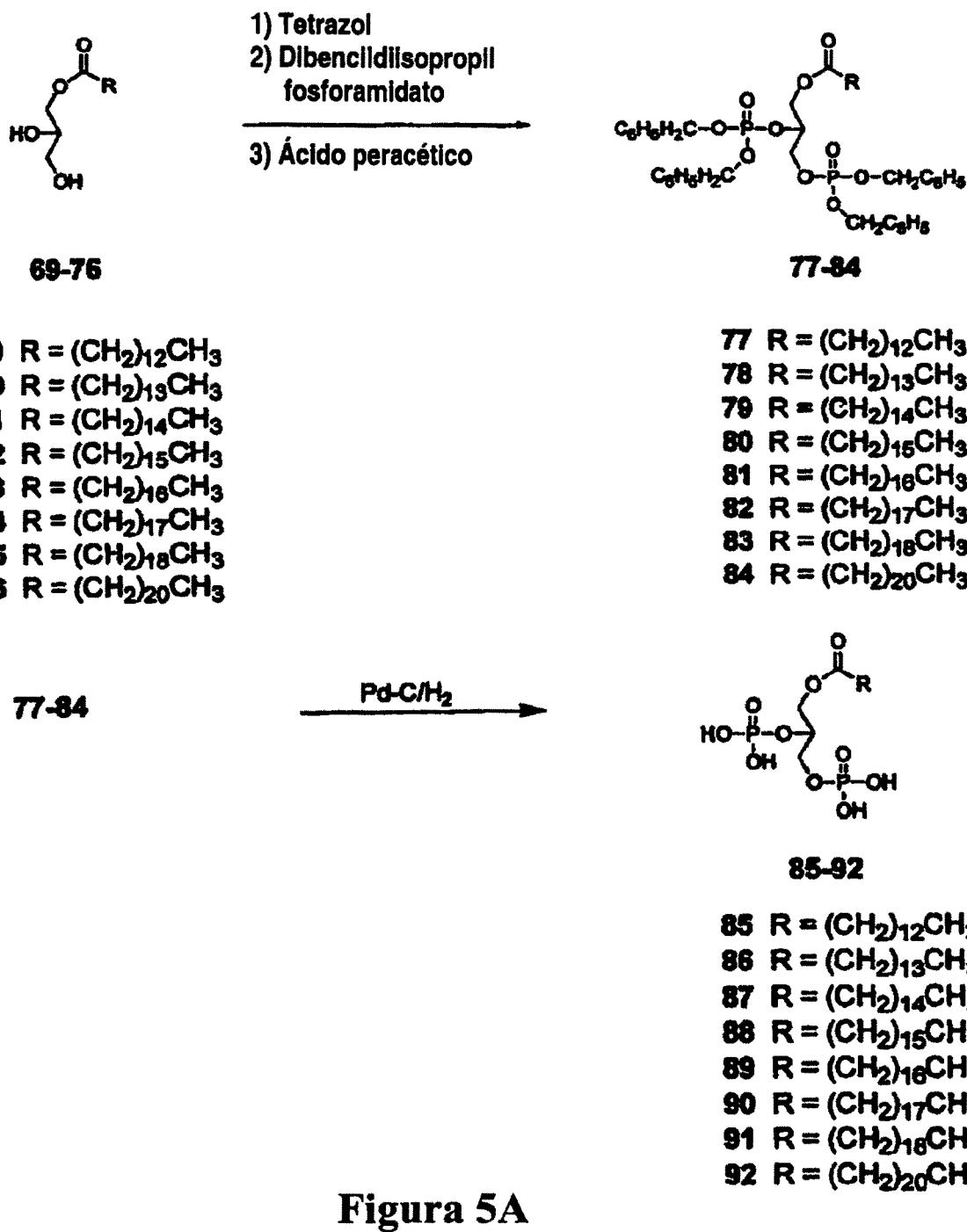


Figura 5A

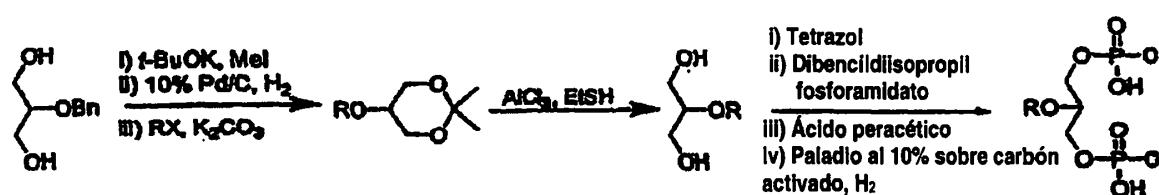


Figura 5B

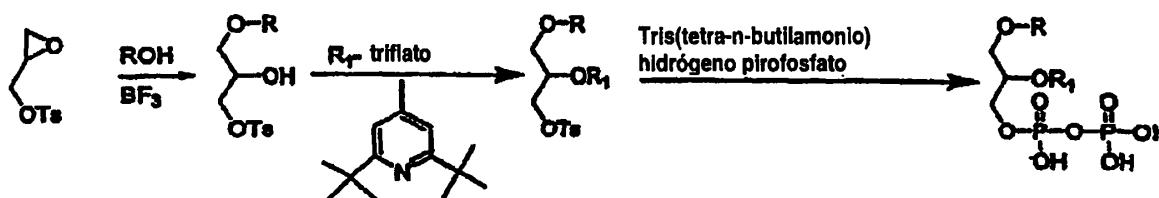


Figura 6A

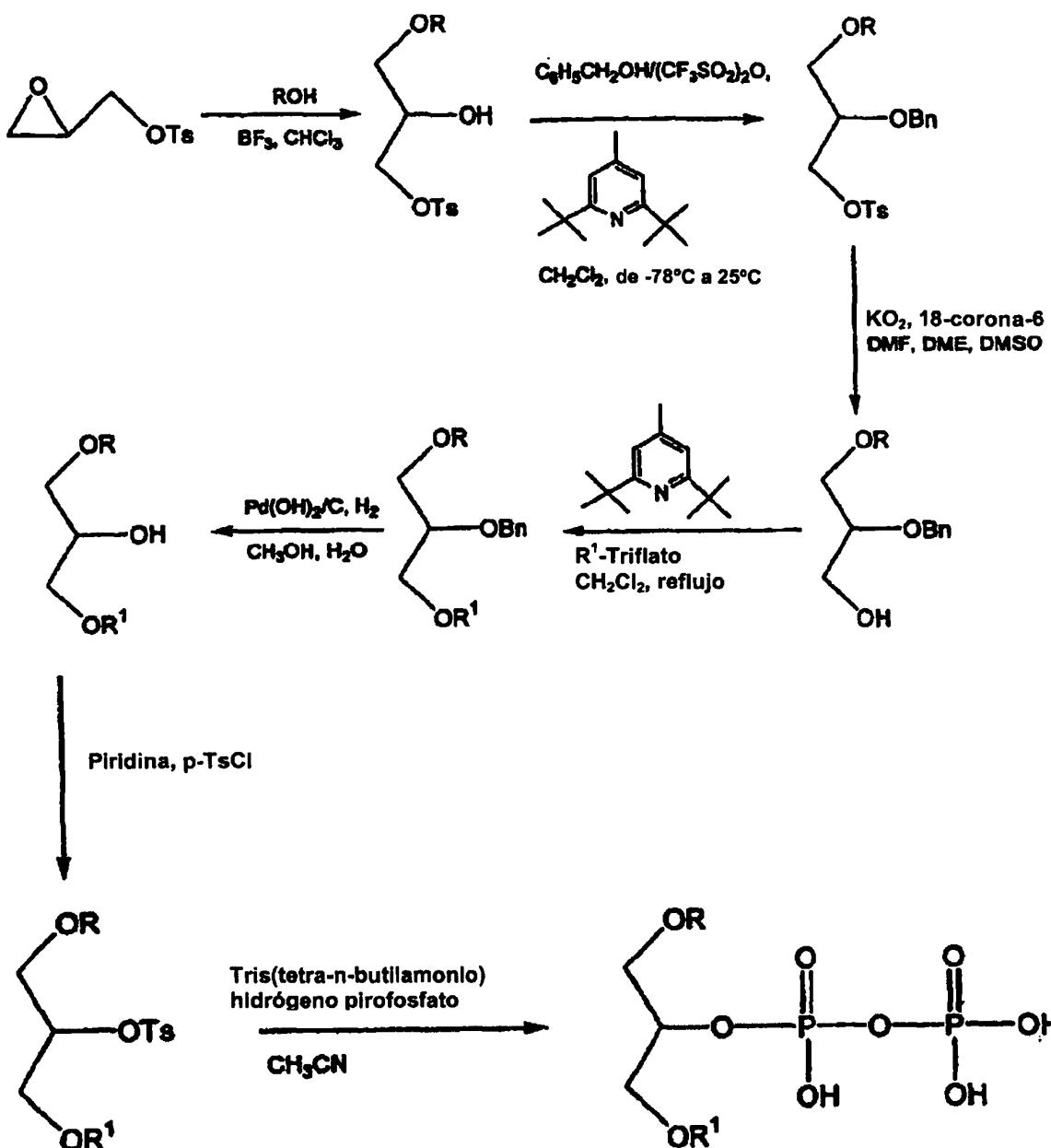
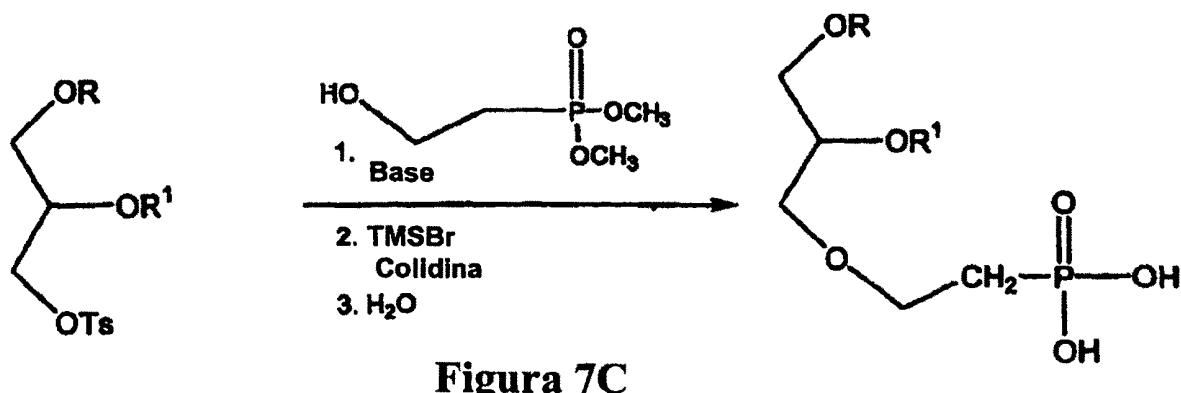
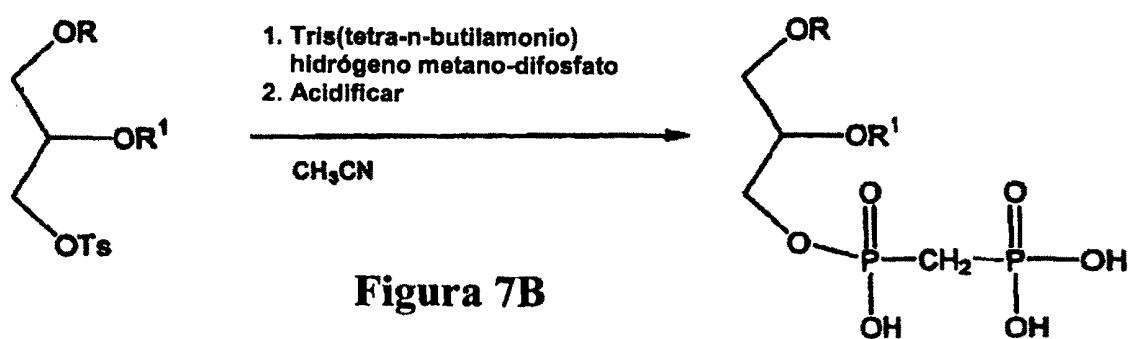
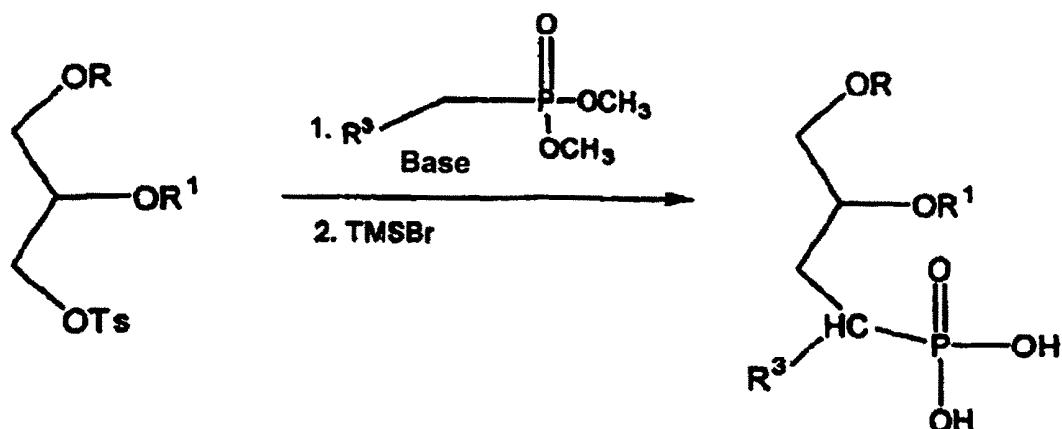
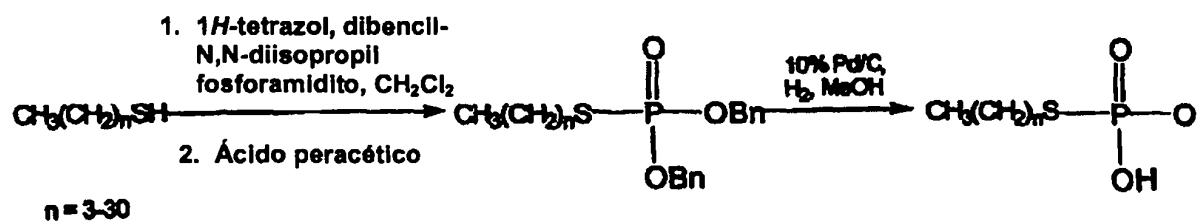
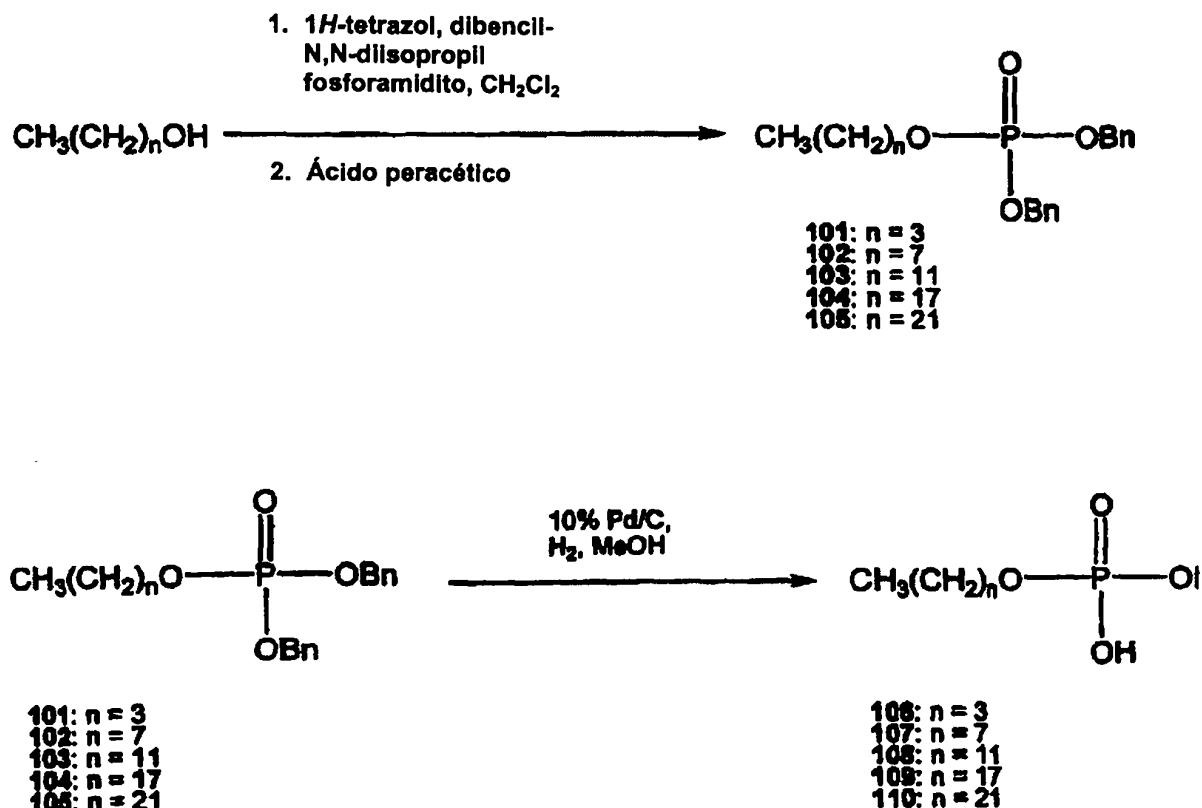


Figura 6B





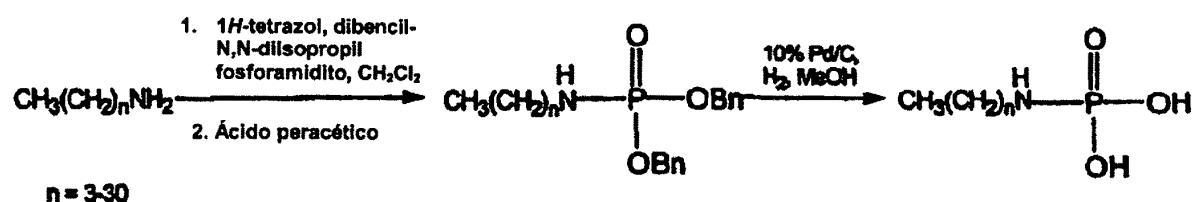


Figura 10

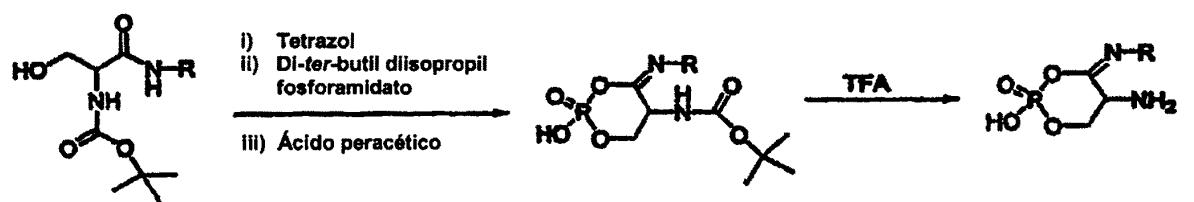


Figura 11

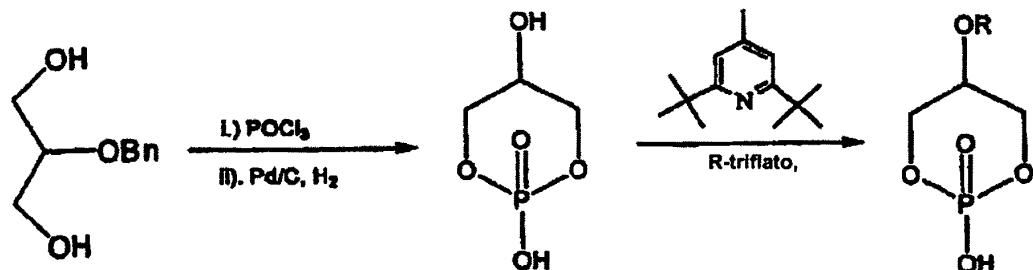


Figura 12

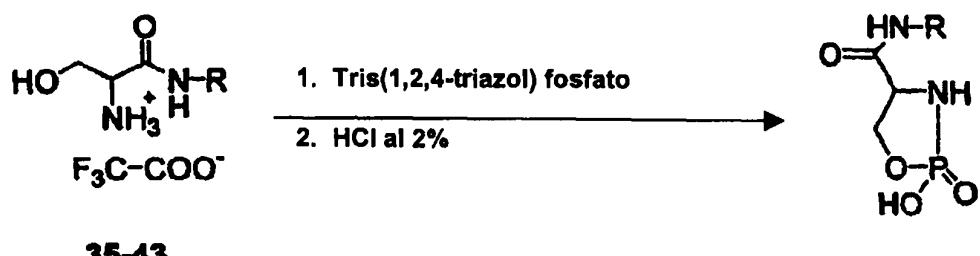


Figura 13

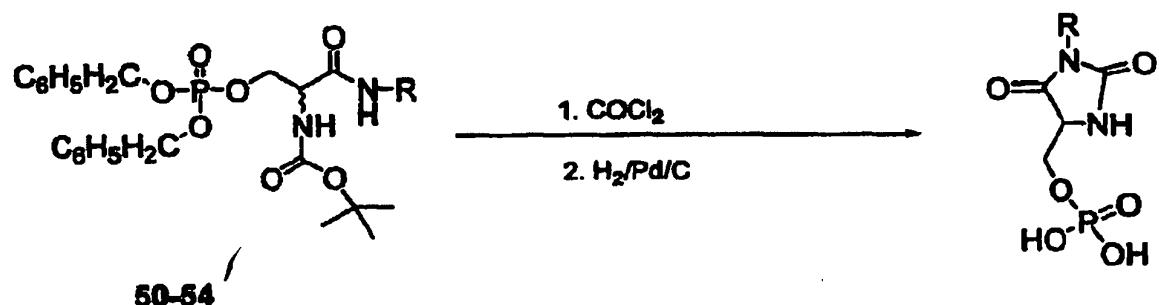


Figura 14

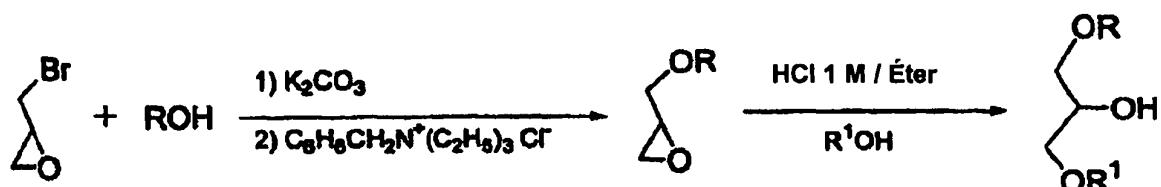


Figura 15

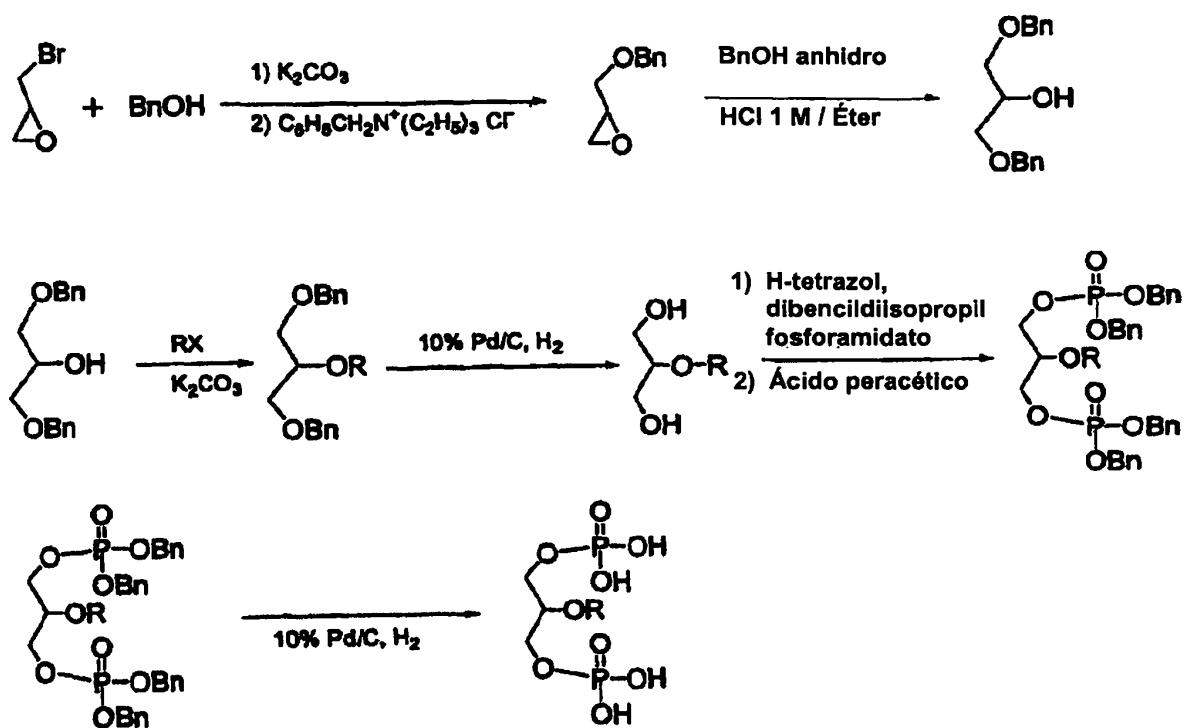


Figura 16

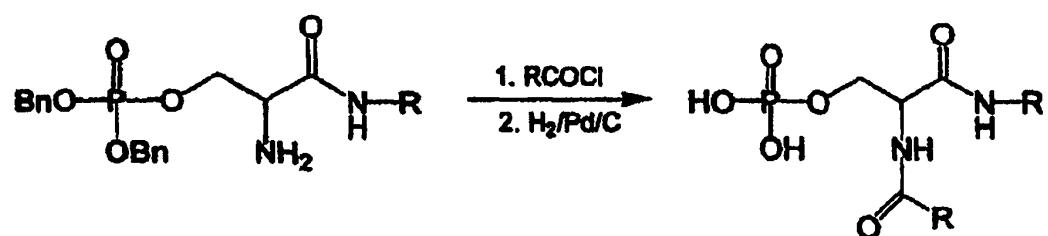


Figura 17

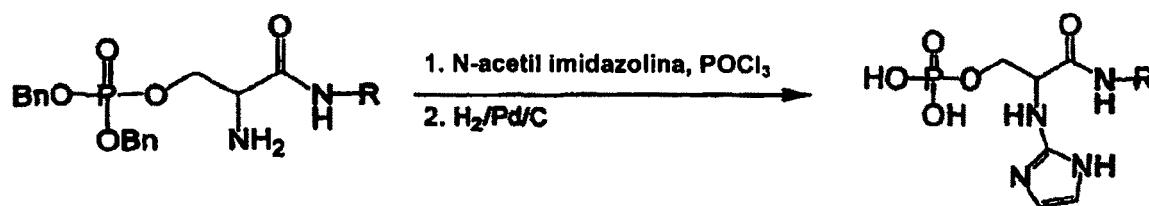


Figura 18

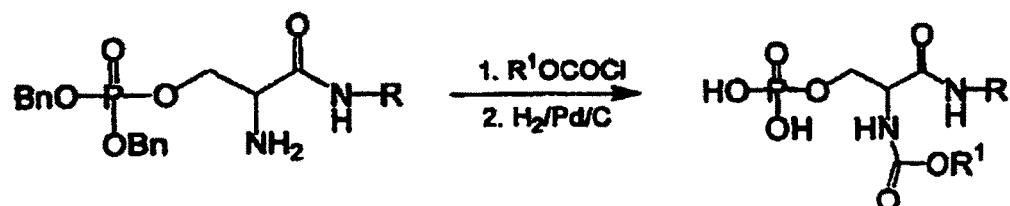


Figura 19

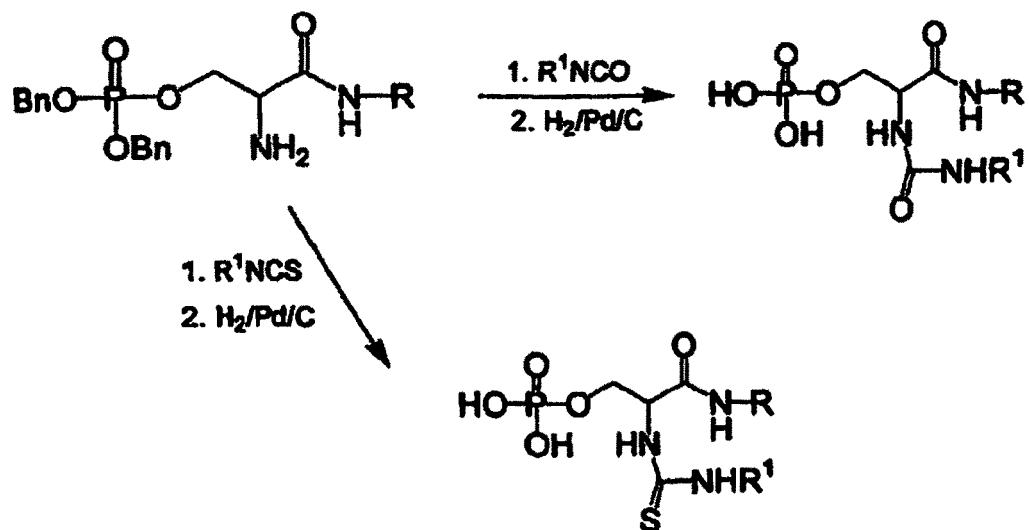


Figura 20

ES 2 298 227 T3

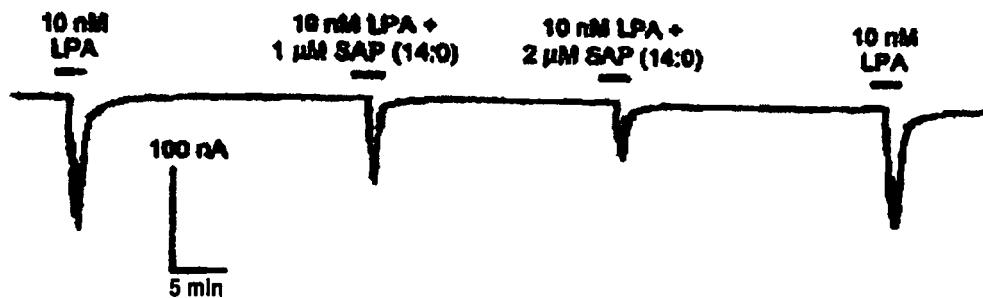


Figura 21

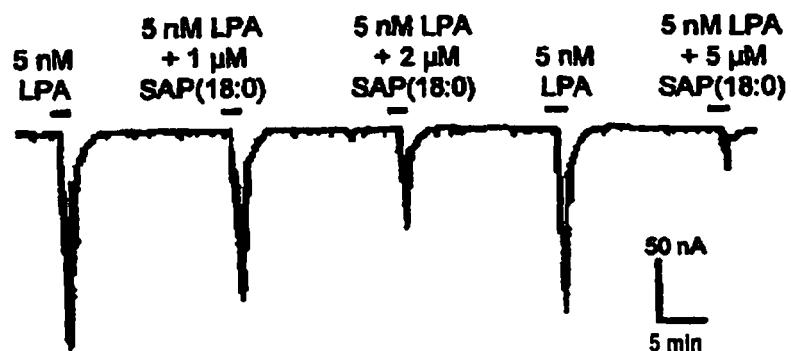
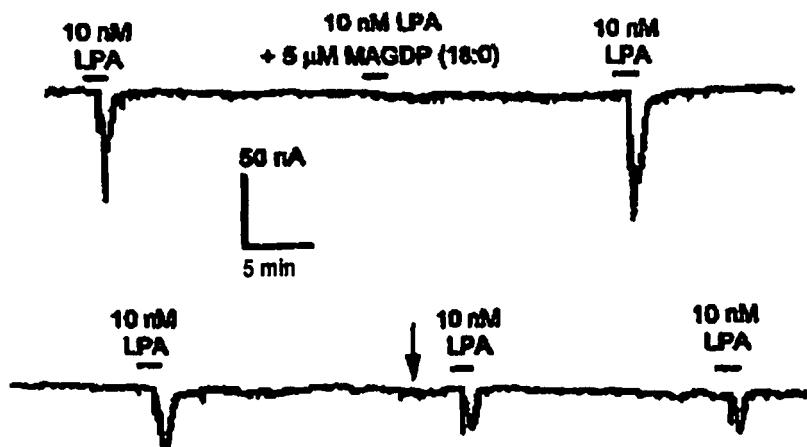


Figura 22



Figuras 23A-B

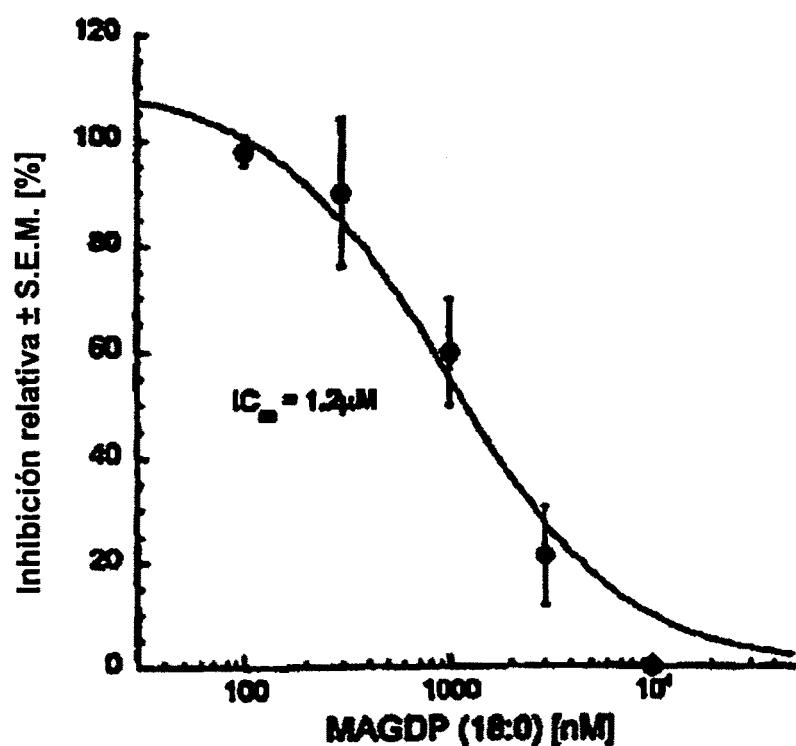


Figura 24

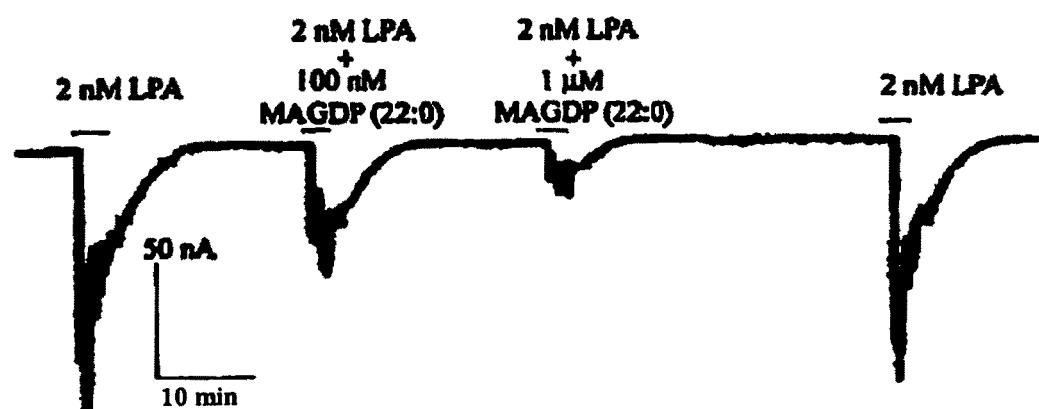


Figura 25

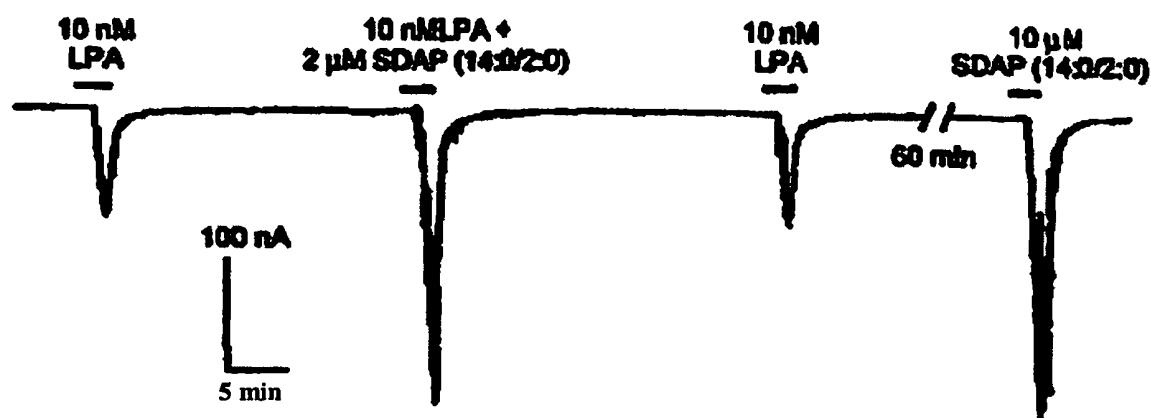


Figura 26

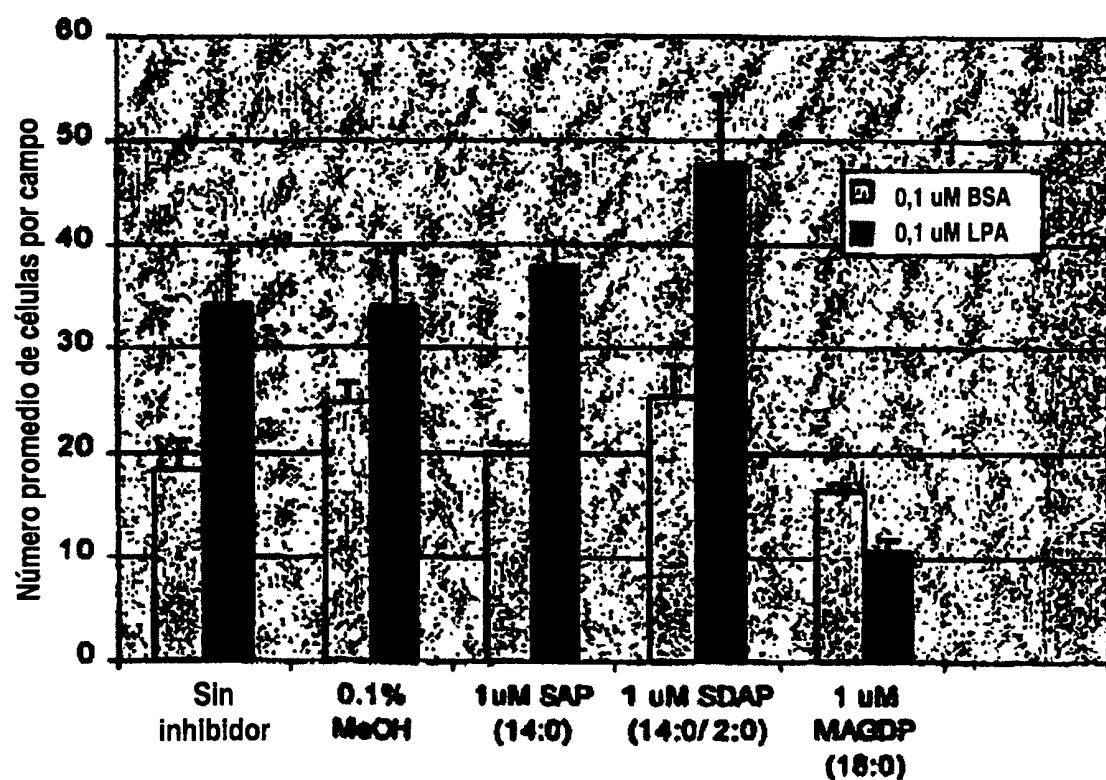
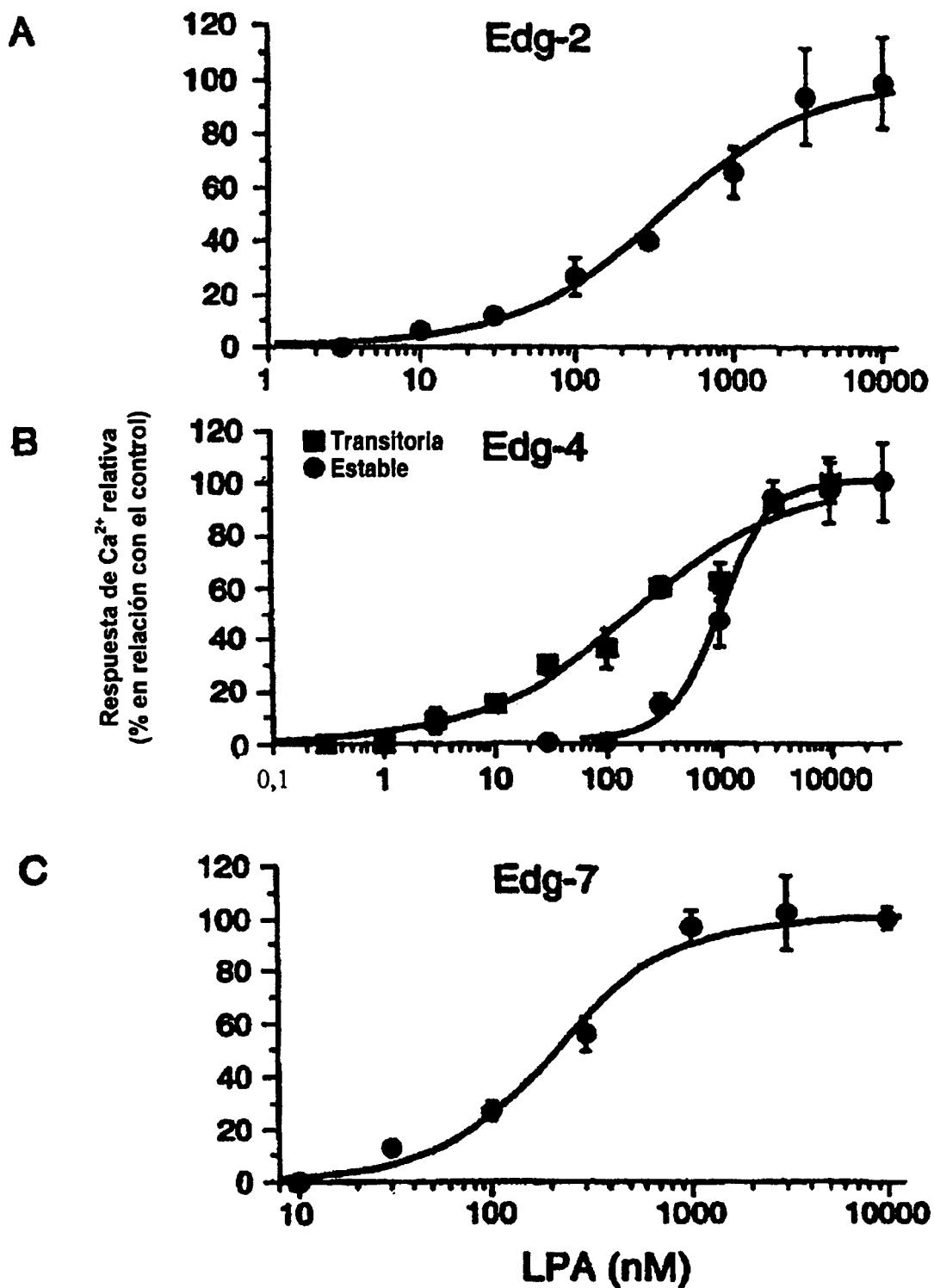
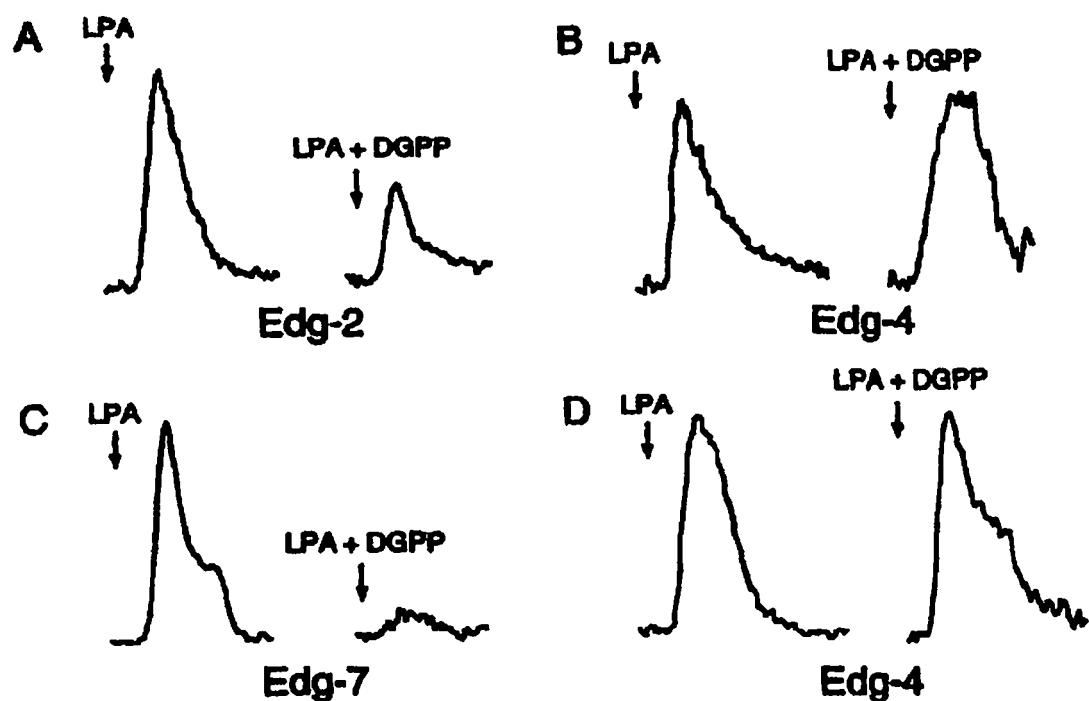
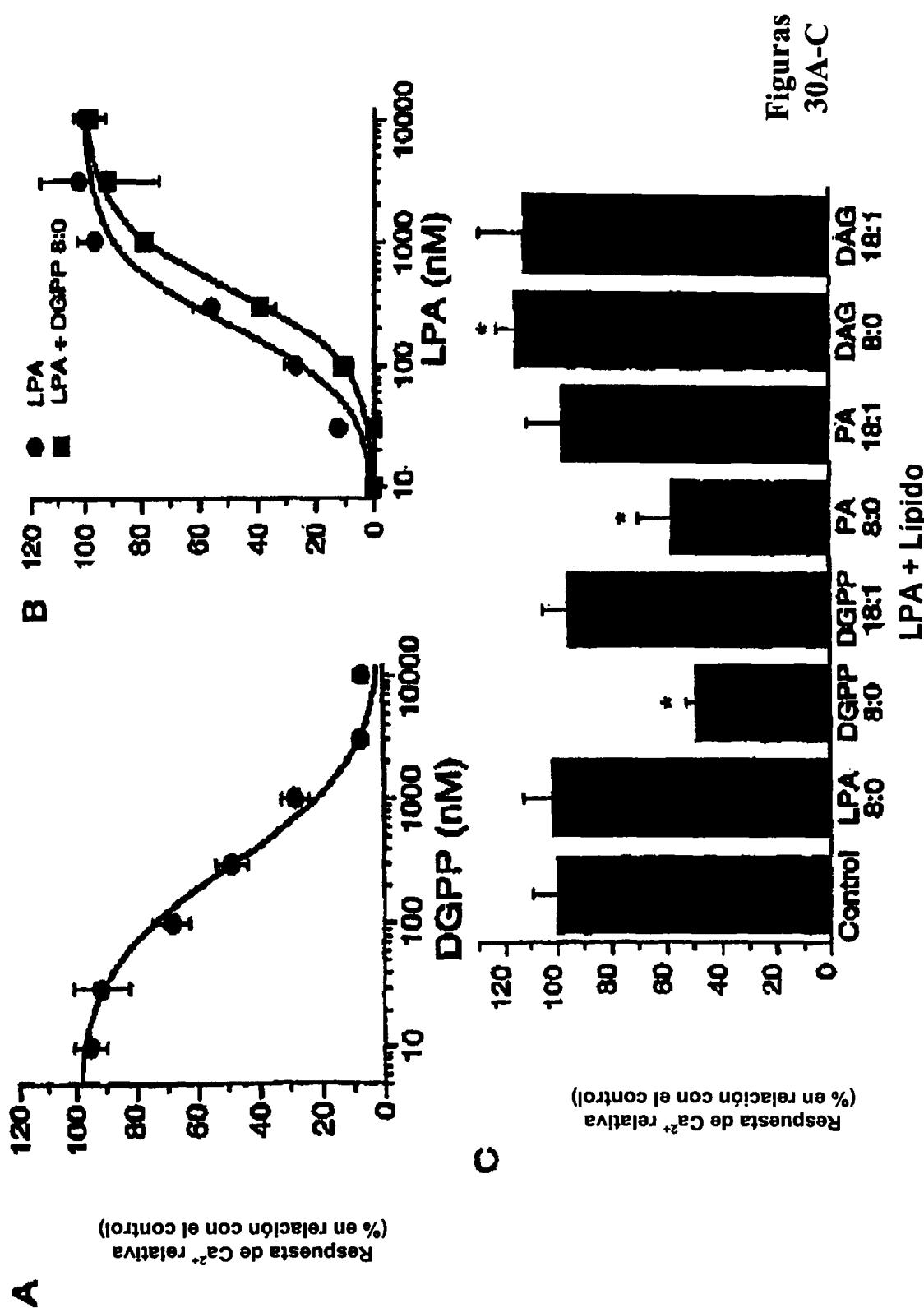


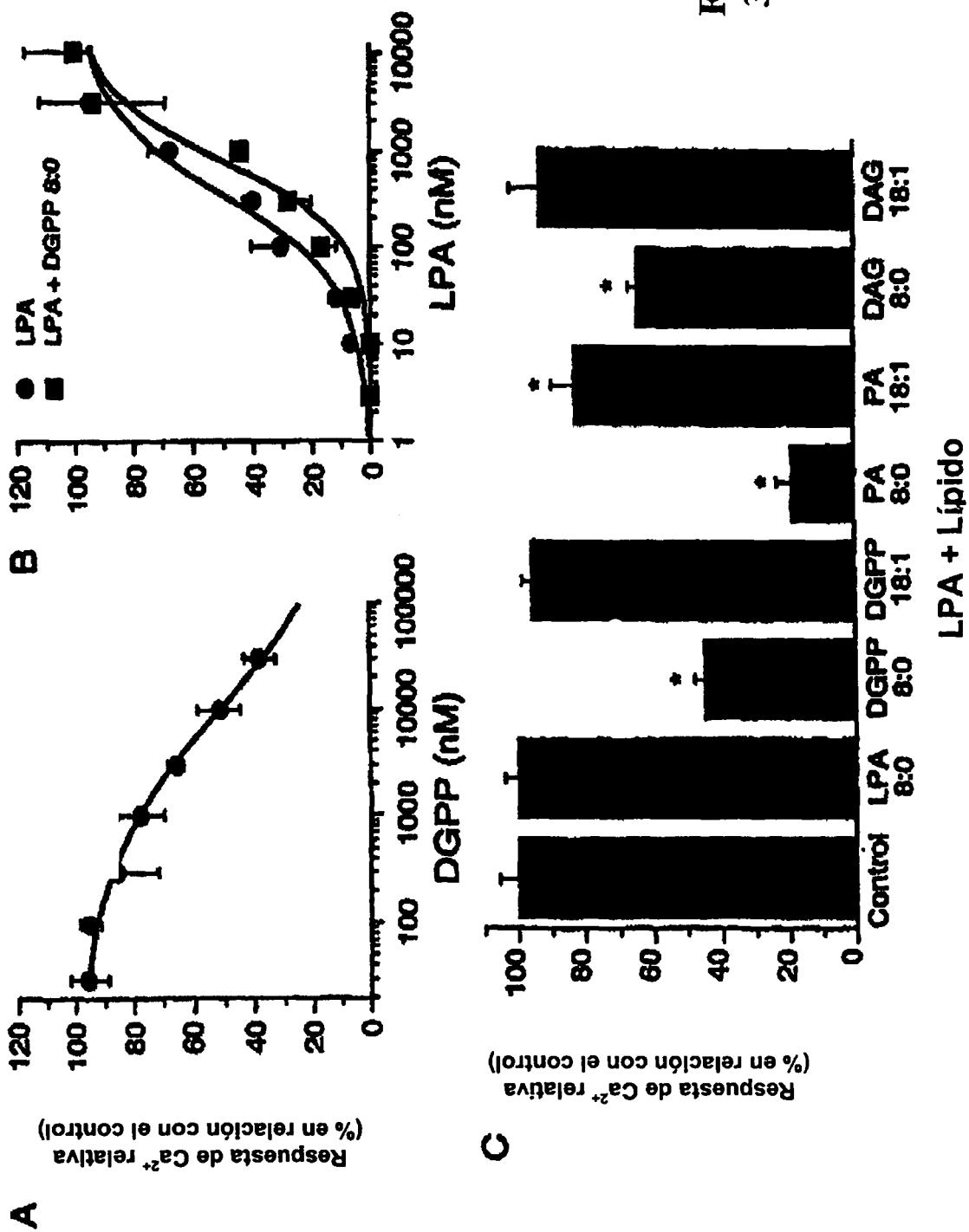
Figura 27

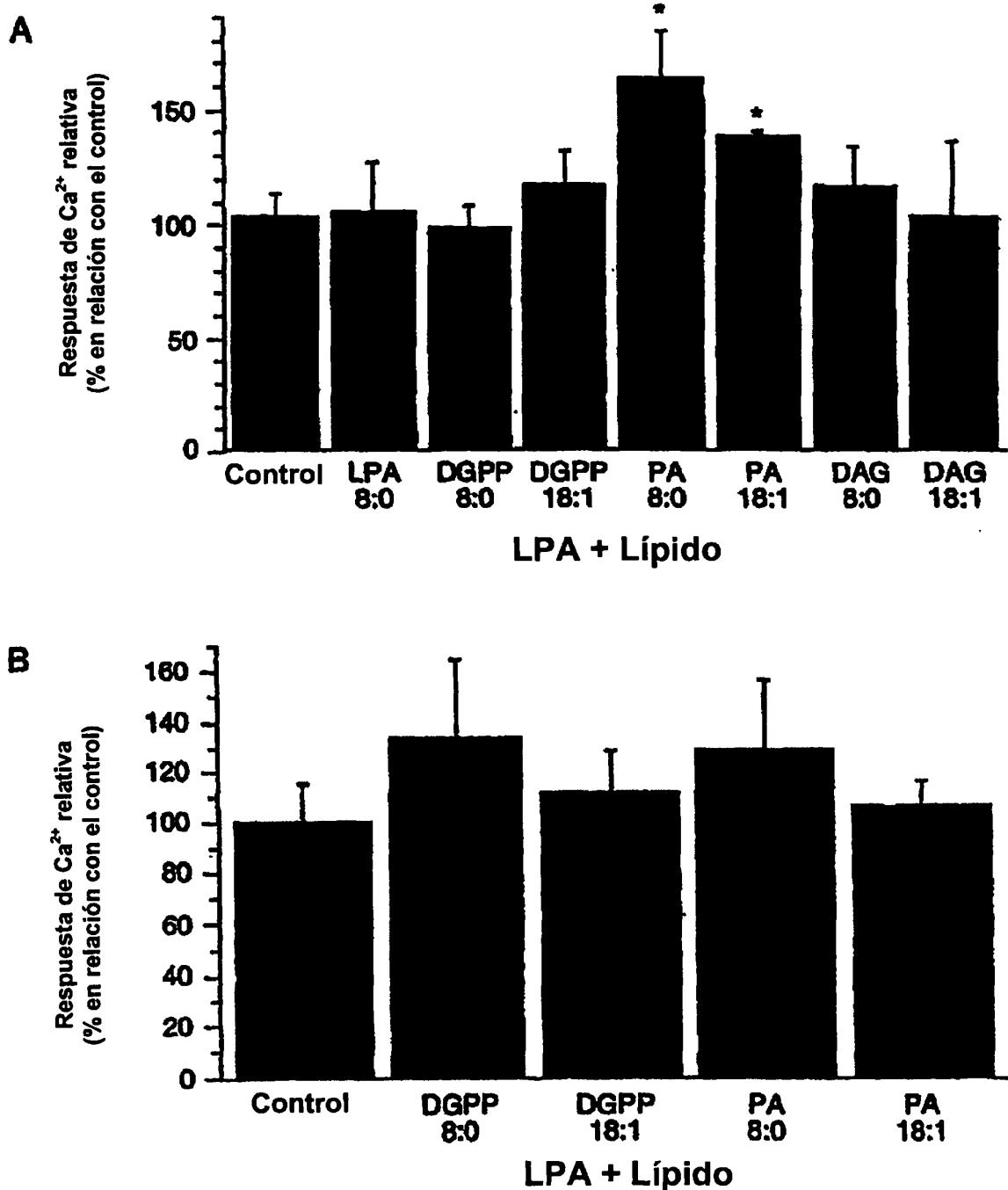
**Figuras 28A-C**



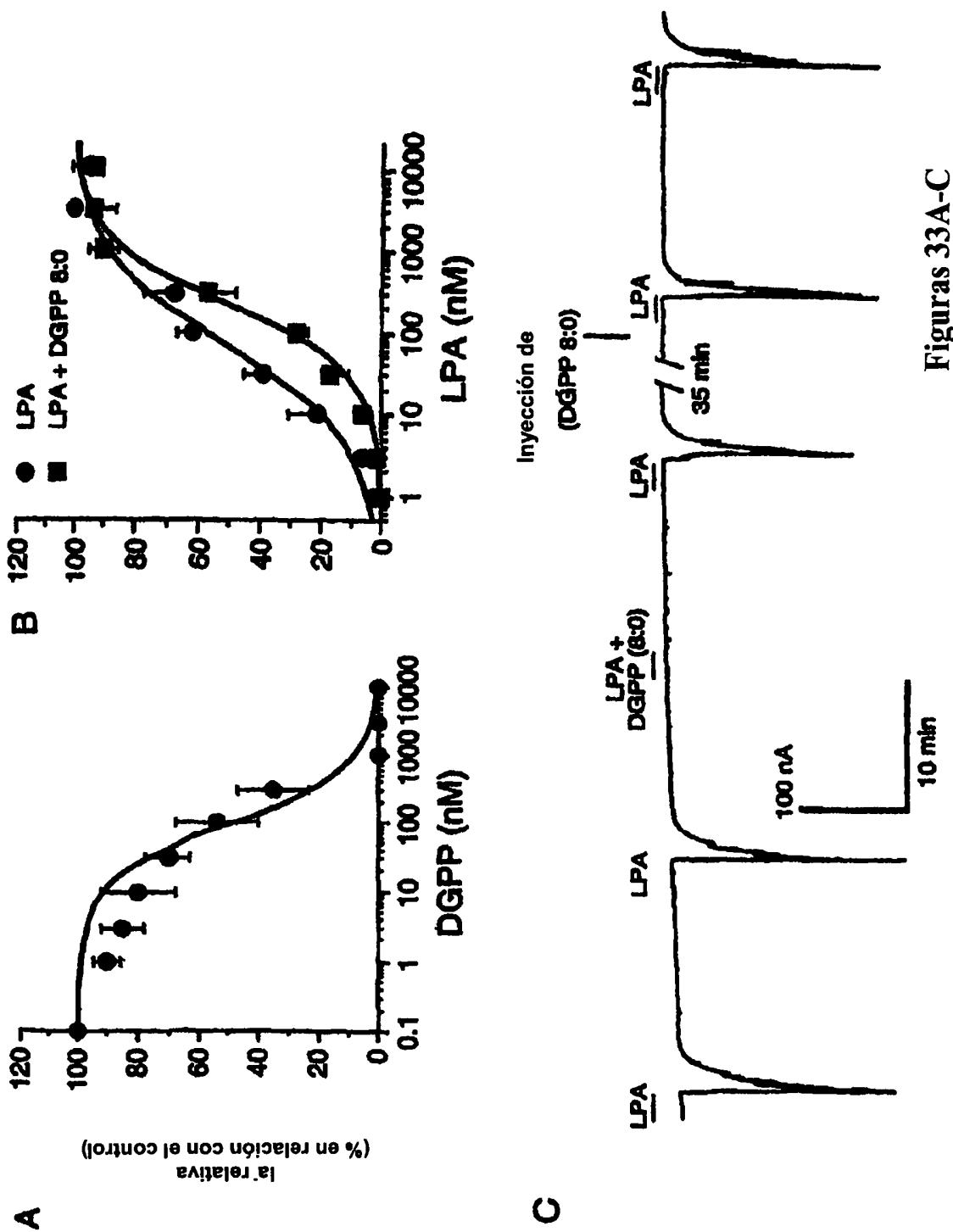
Figuras 29A-D



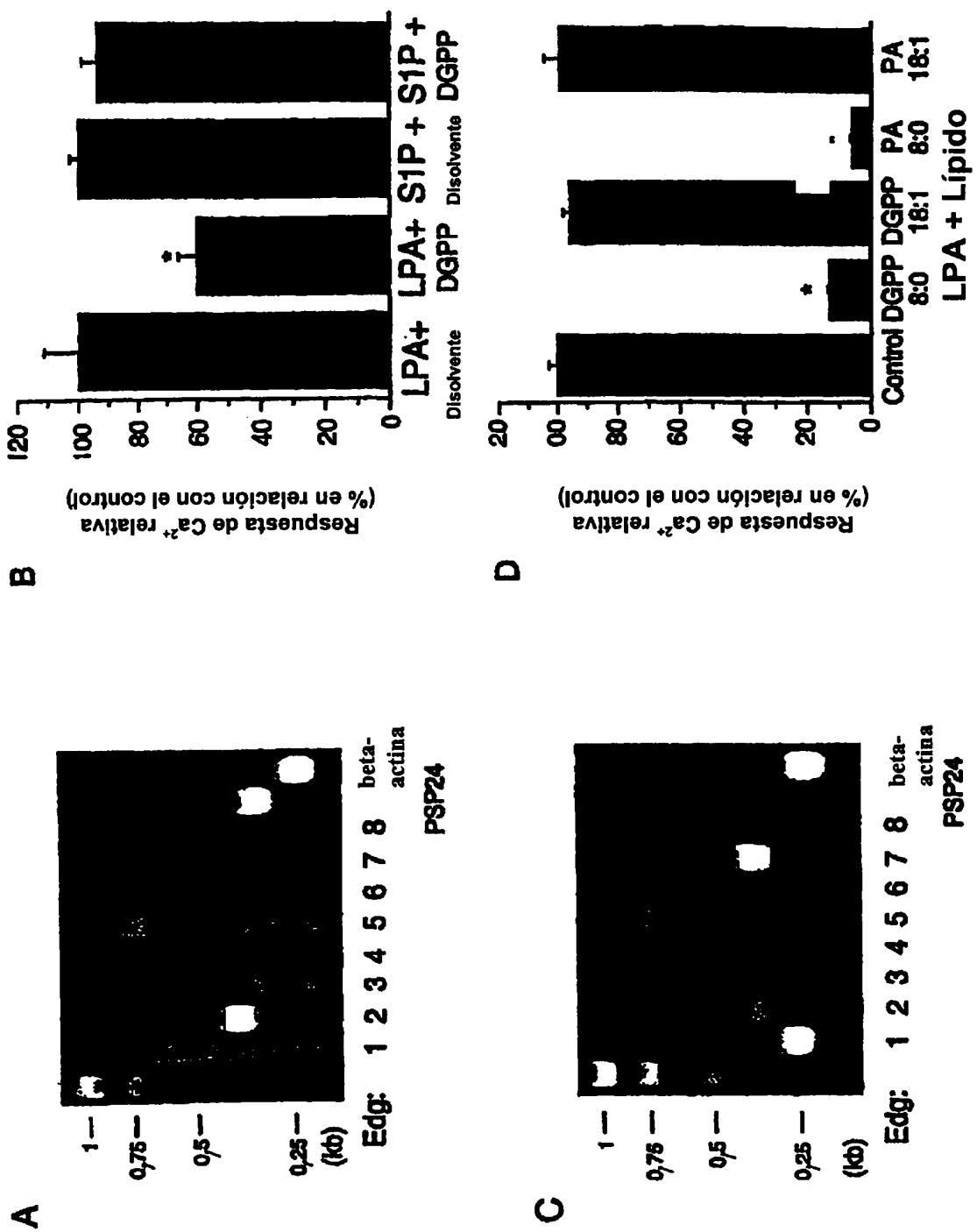
Figuras
31A-C



Figuras 32A-B



Figuras 33A-C



Figuras 34A-D

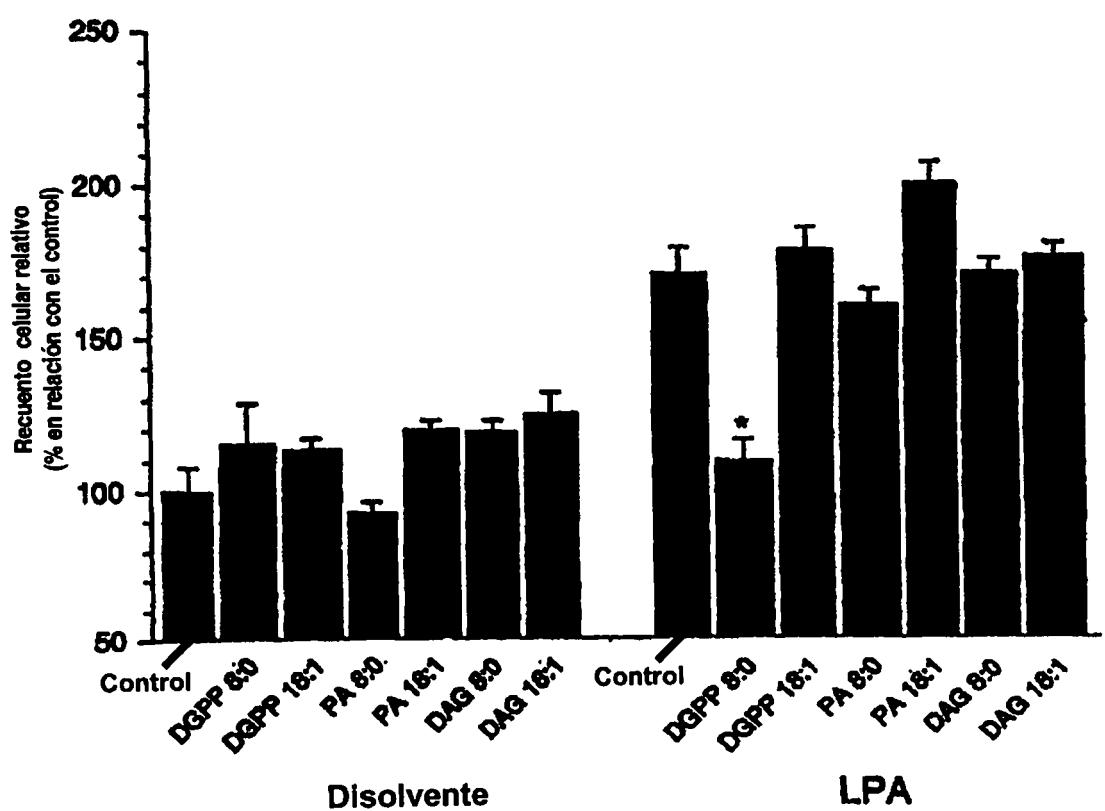


Figura 35

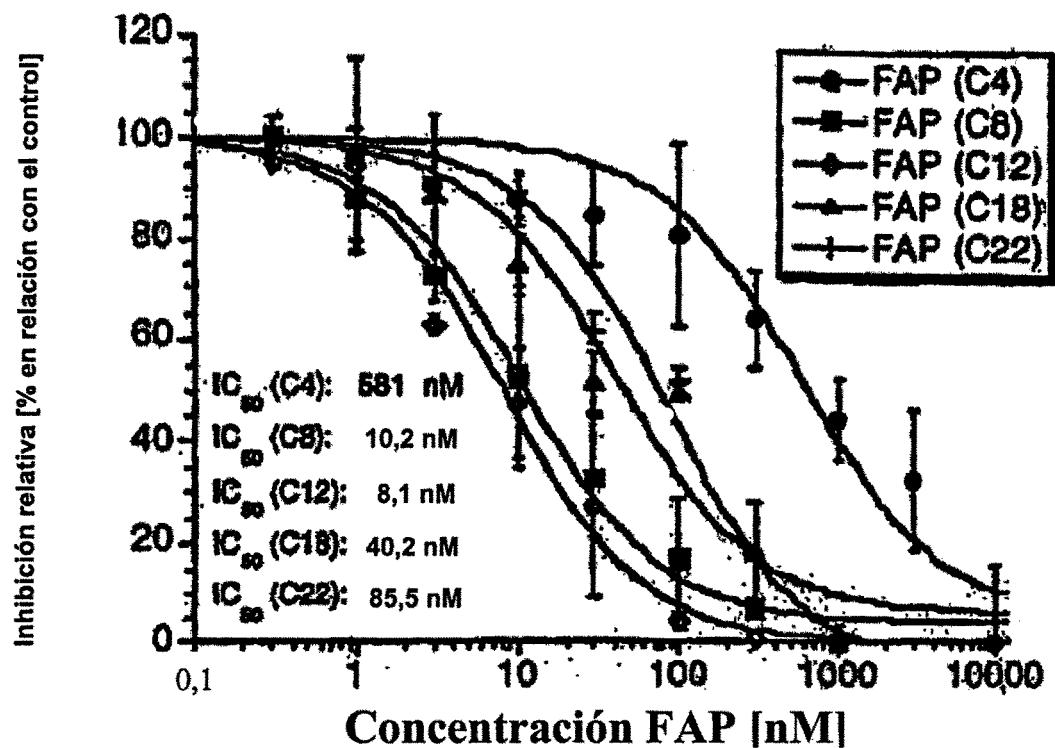


Figura 36

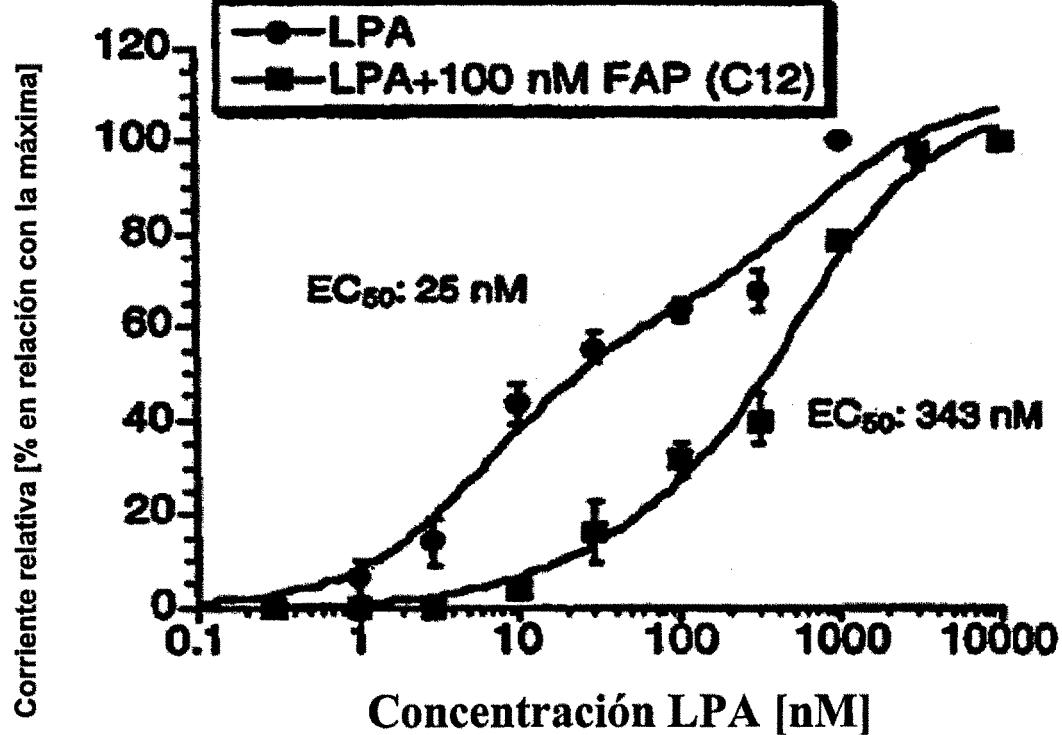


Figura 37

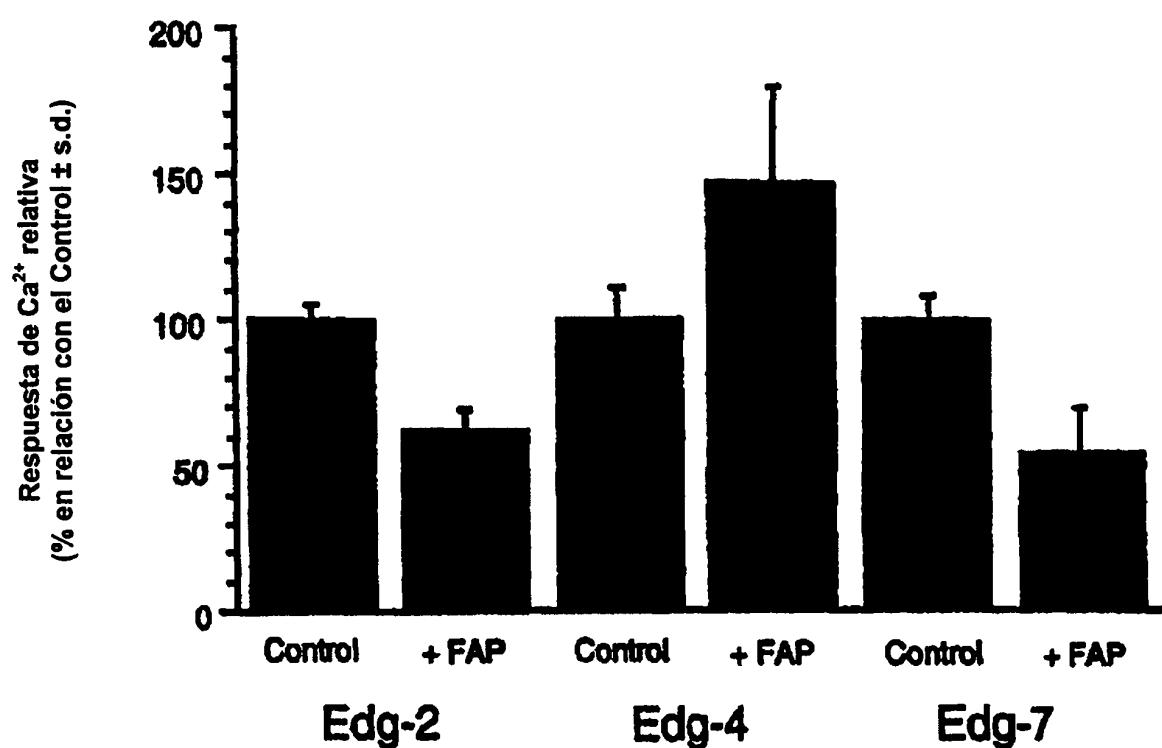


Figura 38

ES 2 298 227 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The University of Tennessee Research Corporation
<120> AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DEL LPA Y PROCEDIMIENTOS DE USO
<130> 20609/182

<140>
<141>
<150> 60/190,370
<151> 2000-03-17

<160> 26
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1095
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

30 atggctgccatctacttc cattccctgtatattcacagc cccagttcac agccatgaat 60
 gaaccacagt gtttctacaa cgagttccatt gcctttttttt ataaaccaag tggaaaggcat 120
 cttgcacacag aatggAACAC agtcagcaag ctggtgatgg gacttggaat cactgtttgt 180
 atcttcatca ttttggccaa ccttatggtc atggtgccaa tctatgtcaa ccgcggcttc 240
 cattttccta ttattttaccc aatggctaat ctggctgctg cagacttctt tgctgggttg 300
 gcctacttctt atctcatgtt caacacagga cccaaatactc ggagactgac tgtagcaca 360
 tggctccgtc gtcaggcccatttgcaccc agccatgtggc cacttacttgc 420
 gctattgcaa tcgagaggca cattacggtt ttccgcattgc agtcacac acggatgagc 480
 aacccgggg tagtgggtgtt cattttggc atctggacta tggccatcgat tatgggtgt 540
 ataccacatgt tggctggaa ctgtatgtt gatattgaaa attgttccaa catggcaccc 600
 ctctacatgt actcttactt agtcttctgg gccatcttca acttgggtgac ctttgggtgt 660
 atgggtggtc tctatgtcaa catcttggc tatgttgcgc agaggactat gagaatgtct 720
 cgccatagtt ctggaccccg gcggatcgatgataccatgatgatgttttgc 780
 gtcattgtgc ttggggcatttcatctgc tggactcctg gattgggtttt gttacttctt 840
 gacgtgtgtgt gtccacatgtcgacgtgtgc gcctatgaga aatttttctt ttccttgc 900
 gaattcaact ctggccatgaa ccccatcatt tactcctacc gcgacaaaga aatgagcgcc 960
 accttttaggc agatctctgt ctggccagcgca gatgagaacc ccacccggccac cacagaaagc 1020
 tcagaccgct cggcttctc cotcaaccac accatcttgg ctggagttca cagcaatgac 1080
 cactctgtgg tttag 1095

<210> 2
<211> 364
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 298 227 T3

<400> 2

	Met Ala Ala Ile Ser Thr Ser Ile Pro Val Ile Ser Gln Pro Gln Phe			
5	1	5	10	15
	Thr Ala Met Asn Glu Pro Gln Cys Phe Tyr Asn Glu Ser Ile Ala Phe			
	20	25	30	
10	Phe Tyr Asn Arg Ser Gly Lys His Leu Ala Thr Glu Trp Asn Thr Val			
	35	40	45	
15	Ser Lys Leu Val Met Gly Leu Gly Ile Thr Val Cys Ile Phe Ile Met			
	50	55	60	
	Leu Ala Asn Leu Leu Val Met Val Ala Ile Tyr Val Asn Arg Arg Phe			
	65	70	75	80
20	His Phe Pro Ile Tyr Tyr Leu Met Ala Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe			
	85	90	95	
25	Phe Ala Gly Leu Ala Tyr Phe Tyr Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Asn			
	100	105	110	
30	Thr Arg Arg Leu Thr Val Ser Thr Trp Leu Leu Arg Gln Gly Leu Ile			
	115	120	125	
	Asp Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Asn Leu Leu Ala Ile Ala Ile			
	130	135	140	
35	Glu Arg His Ile Thr Val Phe Arg Met Gln Leu His Thr Arg Met Ser			
	145	150	155	160
40	Asn Arg Arg Val Val Val Val Ile Val Val Ile Trp Thr Met Ala Ile			
	165	170	175	
	Val Met Gly Ala Ile Pro Ser Val Gly Trp Asn Cys Ile Cys Asp Ile			
	180	185	190	
45	Glu Asn Cys Ser Asn Met Ala Pro Leu Tyr Ser Asp Ser Tyr Leu Val			
	195	200	205	
50	Phe Trp Ala Ile Phe Asn Leu Val Thr Phe Val Val Met Val Val Leu			
	210	215	220	
	Tyr Ala His Ile Phe Gly Tyr Val Arg Gln Arg Thr Met Arg Met Ser			
	225	230	235	240
55				

60

65

ES 2 298 227 T3

	Arg His Ser Ser Gly Pro Arg Arg Asn Arg Asp Thr Met Met Ser Leu			
	245	250	255	
5	Leu Lys Thr Val Val Ile Val Leu Gly Ala Phe Ile Ile Cys Trp Thr			
	260	265	270	
10	Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp			
	275	280	285	
15	Val Leu Ala Tyr Glu Lys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Glu Phe Asn Ser			
	290	295	300	
	Ala Met Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Met Ser Ala			
	305	310	315	320
20	Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys Cys Gln Arg Ser Glu Asn Pro Thr Gly			
	325	330	335	
25	Pro Thr Glu Ser Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile			
	340	345	350	
30	Leu Ala Gly Val His Ser Asn Asp His Ser Val Val			
	355	360		
	<210> 3			
	<211> 1056			
35	<212> ADN			
	<213> <i>Homo sapiens</i>			
	<400> 3			
40	atggtcata tgggccagt ctactacaac gagaccatcg gcttcttcta taacaacagt 60 ggcaaagagc tcagtccca ctggccccc aaggatgtgg tcgtgggtgc actggggctg 120 accgtcagcg tgctgggtct gctgaccaat ctgctggtca tagcagccat cgcctccac 180 cgccgtttcc accagccccat ctactacctg ctggcaatc tggccggcgc tgaccttcc 240 ggggcgtgg cttcaccttt cttcatgttc cacactggtc cccgcacagc cccacttca 300 tttgagggtt ggttcctgcg gcagggtttg ctggacacaaa gcttcaactgc gtccgtggcc 360 acactgctgg ccatacgccgt ggagccgcac cgcagtgtga tggccgtgca gtcgcacagc 420 cgcotgcccc gtggccggcgt ggtcatgttc atttgtggcg tgggggtggc tgccctggc 480 ctggggctgc tgcctgcccc ctccctggcac tgcctctgtg ccctggaccg ctgtcacgc 540 atggcaccccc tgcctcagccg ctccctatttg gccgtctggg ctctgtcgag cctgttgc 600 ttccctgtca tgggtggctgt gtacacccgc attttcttct acgtgcggcg gegagtgcag 660 cgcatggcag agcatgtcag ctggccaccccc cgcttcccgag agaccaacgt cagccctggc 720 aagactgttgc tcatcataatc ggggggttgc gtgggtctgtt ggacaccagg ccagggtgtt 780 ctgtcttgg atgggtttagg ctgtgagttcc tgcataatgtcc tggctgtaga aaagtacttc 840 ctactgttgg cccaggccaa ctcaactggtc aatgtctgttgc ttgtacttgc cccagatgtt 900 gagatgcgcgc gcacccctccg ccgccttctc tgcctgcgcgt gctccgcac gtccacccgc 960 gagtcgttcc actatacatac ctctgttccag ggaggtgcac gcaactgcacat catgtttccc 1020 gagaacggcc acccaactgtt ggcactccacc cttag			
55				
60				
65	<210> 4			
	<211> 351			
	<212> PRT			

ES 2 298 227 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

5 Met Val Ile Met Gly Gln Cys Tyr Tyr Asn Glu Thr Ile Gly Phe Phe
 1 5 10 15

10 Tyr Asn Asn Ser Gly Lys Glu Leu Ser Ser His Trp Arg Pro Lys Asp
 20 25 30

15 Val Val Val Val Ala Leu Gly Leu Thr Val Ser Val Leu Val Leu Leu
 35 40 45

20 Thr Asn Leu Leu Val Ile Ala Ala Ile Ala Ser Asn Arg Arg Phe His
 50 55 60

25 Gln Pro Ile Tyr Tyr Leu Leu Gly Asn Leu Ala Ala Asp Leu Phe
 65 70 75 80

30 Ala Gly Val Ala Tyr Leu Phe Leu Met Phe His Thr Gly Pro Arg Thr
 85 90 95

35 Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gly Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp
 100 105 110

40 Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Thr Leu Leu Ala Ile Ala Val Glu
 115 120 125

45 Arg His Arg Ser Val Met Ala Val Gln Leu His Ser Arg Leu Pro Arg
 130 135 140

50 Gly Arg Val Val Met Leu Ile Val Gly Val Trp Val Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

55 Leu Gly Leu Leu Pro Ala His Ser Trp His Cys Leu Cys Ala Leu Asp
 165 170 175

60 Arg Cys Ser Arg Met Ala Pro Leu Leu Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Val
 180 185 190

65 Trp Ala Leu Ser Ser Leu Leu Val Phe Leu Leu Met Val Ala Val Tyr
 195 200 205

ES 2 298 227 T3

Thr Arg Ile Phe Phe Tyr Val Arg Arg Arg Val Gln Arg Met Ala Glu
210 215 220

5 His Val Ser Cys His Pro Arg Tyr Arg Glu Thr Thr Leu Ser Leu Val
225 230 235 240

10 Lys Thr Val Val Ile Ile Leu Gly Ala Phe Val Val Cys Trp Thr Pro
245 250 255

Gly Gln Val Val Leu Leu Leu Asp Gly Leu Gly Cys Glu Ser Cys Asn
260 265 270

15 Val Leu Ala Val Glu Lys Tyr Phe Leu Leu Leu Ala Glu Ala Asn Ser
275 280 285

20 Leu Val Asn Ala Ala Val Tyr Ser Cys Arg Asp Ala Glu Met Arg Arg
200 205 210 215 220 225 230

Thr Phe Arg Arg Leu Leu Cys Cys Ala Cys Leu Arg Gln Ser Thr Arg
305 310 315 320

Glu Ser Val His Tyr Thr Ser Ser Ala Gin Gly Gly Ala Ser Thr Arg
325 330 335

30 Ile Met Leu Pro Glu Asn Gly His Pro Leu Met Asp Ser Thr Leu
340 345 350

35 <210> 5
<211> 1062
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40

45	atgaatgagt gtcactatga caagcacatg gactttttt ataataaggag caacactgat 60 actgtcgatg actggacagg aacaagctt gtgattgtt tgtgtgtgg gacgttttc 120 tgcctgtta ttttttttc taattctctg gtcatcgccg cagtatcaa aaacagaaaa 180 tttcatttcc ccttctacta cctgtggot aattttagctg ctgcgcattt ctgcgttgg 240 attgcctatg tattcctgtat gtttaacaca ggcccagttt caaaaacttt gactgtcaac 300 cgctggtttc tccgtcaggg gcttctggac agtagcttga ctgcctccct caccaacttg 360 ctgggtatcg ccgtggagag gcacatgtca atcatgagga tgccgggtcca tagcaacctg 420 accaaaaaga gggtgacact gtcattttg cttgtctggg ccatcgccat ttttatgggg 480 gccccccca cactgggctg gaattgcctc tgcaacatct ctgcctgtc ttccctggcc 540 ccccatttaca gcaggagttt cttgttttc tggacagttt ccaacctcat ggcccttc 600 atcatggtttgggtaccc gggatctac gtgtacgtca agagaaaaac caacgttttgc 660 .tctccgcata caagtgggtc catcagccgc cggaggacac ccatgaagct aatgaagacg 720 gtgatgactg tcttagggc gtttgggtt tgctggaccc cgggccttgtt ggttctgtc 780
50	
55	

60	ctcgacggcc tgaactgcag gcagtgtggc gtgcagcatg tgaaaaggta gttcctgtg 840 otgcgcgtgc tcaactccgt cgtaaacccc atcatctact octacaagga cgaggacatg 900 tatggcacca tgaagaagat gatctgtgo ttctctcagg agaacccaga gaggegtccc 960 tctcgoatcc octccacagt ctcagcagg agtqacacag gcagccagta catagaggat 1020
65	agtattagcc aaggtgcagt ctgcaataaa agcacttect aa 1062

ES 2 298 227 T3

<210> 6
 <211> 353
 <212> PRT
 5 <213> *homo sapiens*

<400> 6

10	Met Asn Glu Cys His Tyr Asp Lys His Met Asp Phe Phe Tyr Asn Arg			
	1	5	10	15
15	Ser Asn Thr Asp Thr Val Asp Asp Trp Thr Gly Thr Lys Leu Val Ile			
	20	25	30	
20	Val Leu Cys Val Gly Thr Phe Phe Cys Leu Phe Ile Phe Phe Ser Asn			
	35	40	45	
25	Ser Leu Val Ile Ala Ala Val Ile Lys Asn Arg Lys Phe His Phe Pro			
	50	55	60	
30	Phe Tyr Tyr Leu Leu Ala Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Phe Ala Gly			
	65	70	75	80
35	Ile Ala Tyr Val Phe Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Val Ser Lys Thr			
	85	90	95	
40	Leu Thr Val Asn Arg Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp Ser Ser			
	100	105	110	
45	Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asn Leu Leu Val Ile Ala Val Glu Arg His			
	115	120	125	
50	Met Ser Ile Met Arg Met Arg Val His Ser Asn Leu Thr Lys Lys Arg			
	130	135	140	
55	Val Thr Leu Leu Ile Leu Leu Val Trp Ala Ile Ala Ile Phe Met Gly			
	145	150	155	160
60	Ala Val Pro Thr Leu Gly Trp Asn Cys Leu Cys Asn Ile Ser Ala Cys			
	165	170	175	
65	Ser Ser Leu Ala Pro Ile Tyr Ser Arg Ser Tyr Leu Val Phe Trp Thr			
	180	185	190	

ES 2 298 227 T3

Val Ser Asn Leu Met Ala Phe Leu Ile Met Val Val Val Tyr Leu Arg
 195 200 205

5 Ile Tyr Val Tyr Val Lys Arg Lys Thr Asn Val Leu Ser Pro His Thr
 210 215 220

10 Ser Gly Ser Ile Ser Arg Arg Arg Thr Pro Met Lys Leu Met Lys Thr
 225 230 235 240

15 Val Met Thr Val Leu Gly Ala Phe Val Val Cys Trp Thr Pro Gly Leu
 245 250 255

20 Val Val Leu Leu Leu Asp Gly Leu Asn Cys Arg Gln Cys Gly Val Gln
 260 265 270

25 His Val Lys Arg Trp Phe Leu Leu Ala Leu Leu Asn Ser Val Val
 275 280 285

30 Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Lys Asp Glu Asp Met Tyr Gly Thr Met
 290 295 300

35 Lys Lys Met Ile Cys Cys Phe Ser Gln Glu Asn Pro Glu Arg Arg Pro
 305 310 315 320

40 Ser Arg Ile Pro Ser Thr Val Leu Ser Arg Ser Asp Thr Gly Ser Gln
 325 330 335

45 Tyr Ile Glu Asp Ser Ile Ser Gln Gly Ala Val Cys Asn Lys Ser Thr
 340 345 350

50 Ser

<210> 7

45 <211> 1260

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 7

55 atggtcttct cggcagtgtt gactgcgttc cataccggga catccaacac aacatttgtc 60
 gtgtatgaaa acacctacat gaatattaca ctccctccac cattccagca tcctgaccc 120
 agtccattgc ttagatatacg tttgaaacc atggctccca ctggtttgag ttcccttgacc 180
 gtgaatagta cagctgtgcc cacaacacca gcagcattta agagcctaas cttgccttct 240
 cagatcaccc ttctgtctat aatgatattc attctgtttg tgtctttct tgggaacttg 300
 gtttttgcc tcatggtta caaaaagct gccatgaggt ctgcaattaa catccttctt 360
 gccagcctag cttttgcaga catgttgctt gcagtgtga acatgccctt tgccctggta 420

ES 2 298 227 T3

actattctta ctacccgatg gattttggg aaattcttct gtagggtatc tgctatgtt 480
 ttctggatat ttgtataga aggagtagcc atccctgcata tcattagcat agataggtc 540
 cttattatag tccagaggca ggataagcta aaccatata gagctaaggc tctgattgca 600
 5 gtttttggg caacttcctt ttgttagt ttcccttag ccgttagaaaa ccccgacctg 660
 cagataacctt cccgagctcc ccagtgtgtg tttgggtaca caaccaatcc aggctaccag 720
 gettatgtga ttttatttc tctcattttt tcttcatac ctttccttgtt aatactgtac 780
 tcatttatgg gcatactcaa cacccttcgg cacaatgcct tgaggatcca tagctaccct 840
 10 gaaggtatat gcctcagccaa ggcagcaaa ctgggtctca tgagtcgtca gagacccccc 900
 cagatgagca ttgacatggg cttaaaaca cgtgccttca ccactatttt gattctttt 960
 gctgtcttca ttgtctgtcgg ggccccatcc accacttaca gccttggtggc aacattcagt 1020
 aagcactttt actatcagca caactttttt gagattagca cctggctact gtggctctgc 1080
 15 tacctcaagt ctgcattgaa tccgctgatc tactactgga ggatataagaa attccatgat 1140
 gettgcetgg acatgatgcc taagtccttca aagttttgc cgcaagctccc tggcacaca 1200
 aagcgacgga tacgtcttag tgctgttat gtgtgtgggg aacatggac ggtgggtgtga 1260

20 <210> 8
 <211> 419

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

30	Met Val Phe Ser Ala Val Leu Thr Ala Phe His Thr Gly Thr Ser Asn			
	1	5	10	15
35	Thr Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Thr Tyr Met Asn Ile Thr Leu Pro			
	20	25	30	
40	Pro Pro Phe Gln His Pro Asp Leu Ser Pro Leu Leu Arg Tyr Ser Phe			
	35	40	45	
45	Glu Thr Met Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Ser Thr			
	50	55	60	
50	Ala Val Pro Thr Thr Pro Ala Ala Phe Lys Ser Leu Asn Leu Pro Leu			
	65	70	75	80
55	Gln Ile Thr Leu Ser Ala Ile Met Ile Phe Ile Leu Phe Val Ser Phe			
	85	90	95	
60	Leu Gly Asn Leu Val Val Cys Leu Met Val Tyr Gln Lys Ala Ala Met			
	100	105	110	
65	Arg Ser Ala Ile Asn Ile Leu Leu Ala Ser Leu Ala Phe Ala Asp Met			
	115	120	125	
70	Leu Leu Ala Val Leu Asn Met Pro Phe Ala Leu Val Thr Ile Leu Thr			
	130	135	140	

ES 2 298 227 T3

	Thr Arg Trp Ile Phe Gly Lys Phe Phe Cys Arg Val Ser Ala Met Phe		
145	150	155	160
5	Phe Trp Leu Phe Val Ile Glu Gly Val Ala Ile Leu Leu Ile Ile Ser		
	165	170	175
10	Ile Asp Arg Phe Leu Ile Ile Val Gln Arg Gln Asp Lys Leu Asn Pro		
	180	185	190
15	Tyr Arg Ala Lys Val Leu Ile Ala Val Ser Trp Ala Thr Ser Phe Cys		
	195	200	205
	Val Ala Phe Pro Leu Ala Val Gly Asn Pro Asp Leu Gln Ile Pro Ser		
	210	215	220
20	Arg Ala Pro Gln Cys Val Phe Gly Tyr Thr Thr Asn Pro Gly Tyr Gln		
	225	230	235
	240		
25	Ala Tyr Val Ile Leu Ile Ser Leu Ile Ser Phe Phe Ile Pro Phe Leu		
	245	250	255
30	Val Ile Leu Tyr Ser Phe Met Gly Ile Leu Asn Thr Leu Arg His Asn		
	260	265	270
	275	280	285
35	Ser Lys Leu Gly Leu Met Ser Leu Gln Arg Pro Phe Gln Met Ser Ile		
	290	295	300
40	Asp Met Gly Phe Lys Thr Arg Ala Phe Thr Thr Ile Leu Ile Leu Phe		
	305	310	315
	320		
45	Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Ala Pro Phe Thr Thr Tyr Ser Leu Val		
	325	330	335
	340	345	350
50	Ser Thr Trp Leu Leu Trp Leu Cys Tyr Leu Lys Ser Ala Leu Asn Pro		
	355	360	365
55	Leu Ile Tyr Tyr Trp Arg Ile Lys Lys Phe His Asp Ala Cys Leu Asp		
	370	375	380
60	Met Met Pro Lys Ser Phe Lys Phe Leu Pro Gln Leu Pro Gly His Thr		
	385	390	395
	400		