

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2001.03.19**

(30) Prioridade(s): **2000.03.17 US 190370 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.12.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.12.05**
055/2008

(73) Titular(es):

THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION
1534 WHITE AVENUE, SUITE 403 KNOXVILLE,
TN 37996-1527 **US**

(72) Inventor(es):

DUANE D. MILLER **US**
GABOR TIGYI **US**
JAMES T. DALTON **US**
VINEET M. SARDAR **US**
DON, B. ELROD **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **AGONISTAS E ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DO LPA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Agonistas e antagonistas dos receptores do LPA e métodos de utilização"

A presente invenção refere-se a compostos de acordo com a fórmula (I) aqui descrita assim como a composições farmacêuticas que incluem esses compostos. Revelam-se igualmente métodos de utilização destes compostos, que têm actividade como agonistas ou como antagonistas de receptores de LPA; estes métodos incluem inibição da actividade de LPA num receptor de LPA, modulação da actividade de receptores de LPA, tratamento do cancro, aumento da proliferação celular, e tratamento de um ferimento.

DESCRIÇÃO

"Agonistas e antagonistas dos receptores do LPA e métodos de utilização"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a derivados do ácido lisofosfatídico ("LPA") que têm actividade como agonistas ou como antagonistas dos receptores do LPA e a várias utilizações terapêuticas dos mesmos incluindo, mas não se limitando, a terapêutica do cancro da próstata e a terapêutica do cancro do ovário.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Todas as células não transformadas necessitam de factores de crescimento para a sua sobrevivência e proliferação. Além dos factores de crescimento polipeptídicos, descobriu-se uma classe emergente de lípidos com propriedades semelhantes às dos factores de crescimento, conhecidos colectivamente por factores de crescimento fosfolipídicos (PLGF). Apesar das suas propriedades farmacológicas semelhantes de indução da proliferação de células mais quiescentes (Jalink *et al.*, 1994a; Tokumura, 1995; Moolenaar *et al.*, 1997). Os PLGF podem ser subdivididos estruturalmente em duas categorias básicas. A primeira categoria contém os mediadores glicerofosfolipídicos (GPM), que possuem um esqueleto de glicerol. Exemplos de GPM incluem o LPA, o ácido fosfatídico (PA), o ácido fosfatídico cíclico (PA cíclico), o alcenilglicerolfosfato (alcenil-GP) e a lisofosfatidilserina (LPS). A segunda categoria contém os mediadores esfingolipídicos (SPM), que possuem um motivo base esfingóide. Os exemplos de SPM incluem a esfingosina-1-fosfato (SPP), a di-hidroesfingosina-1-fosfato, esfingosilfosforilcolina (SPC) e a esfingosina (SPH).

O LPA (Tigyi *et al.*, 1991; Tigyi e Miledi, 1992), o PA (Myher *et al.*, 1989), o alcenil-GP (Liliom *et al.*, 1998), o PA cíclico (Kobayashi *et al.*, 1999), o SPP (Yatomi *et al.*, 1995) e a SPC (Tigyi *et al.*, 2000) foram detectados no soro. Estes mediadores lipídicos foram identificados e caracterizados. Existem contudo PLGF presentes no soro e no plasma, ainda

desconhecidos, que exibem propriedades semelhantes às dos factores de crescimento (Tigyi and Miledi, 1992). O LPA, com a sua concentração $\approx 20 \mu\text{M}$, é o PLGF mais abundante presente no soro (Tigyi and Miledi, 1992; Jalink *et al.*, 1993).

Nas células eucarióticas o LPA é um intermediário essencial nas fases iniciais da biossíntese dos fosfolípidos, que ocorre predominantemente na membrana do retículo endoplasmático (RE) (Bosch, 1974; Bishop e Bell, 1988). No RE, o LPA resulta da acção de acil-CoA sobre o glicerol-3-fosfato, que é ulteriormente acilado para produzir PA. Como a taxa de acilação do LPA em PA é muito elevada, a acumulação de LPA no local de biossíntese é muito baixa (Bosch, 1974). Como o LPA está restrito ao RE, o mais provável é que não haja uma relação entre a sua função como intermediário metabólico e a sua função como molécula de sinalização.

O LPA é um constituinte do soro e os seus níveis estão na gama micromolar (μM) inferior (Eicholtz *et al.*, 1993). Este nível é de esperar dado que o LPA é libertado por plaquetas activadas durante o processo de coagulação. Ao contrário do soro, não é detectável no plasma ou sangue fresco (Tigyi e Miledi, 1992; Eicholtz *et al.*, 1993). O LPA presente no soro está ligado à albumina e é responsável pela maior parte da actividade biológica termoestável e não dialisável do soro total (Moolenaar, 1994). O componente activo sérico responsável por desencadear uma corrente de cloreto de entrada no oócito de *Xenopus* foi identificado como sendo o LPA (18:0) (Tigyi e Miledi, 1992). A grande parte do LPA (18:0) ligado à albumina é produzida durante o processo de coagulação e não através da acção da lisofosfolipase D (PLD) sobre a liso-PC. Esta última via é responsável pela presença do LPA em plasma "envelhecido" que foi descoagulado por acção de heparina ou citrato mais dextrose (Tokumura *et al.*, 1986). Outro aspecto a salientar é que o LPA não está presente no plasma que foi tratado com EDTA. Este facto implica que a lisofosfolipase plasmática pode ser dependente de Ca^{2+} (Tokumura, *et al.*, 1986).

O papel da albumina é proteger o LPA das acções das fosfolipases presentes no soro (Tigyi e Miledi, 1992). Tigyi e Miledi sugeriram que a albumina actua não só como portador do

LPA na corrente sanguínea, mas também aumenta a sua semivida fisiológica. Existem mediadores lipídicos ainda não identificados presentes na albumina sérica que imitam as acções do LPA desencadeando uma corrente de cloreto no oócito de *Xenopus*.

Os tipos de células que respondem ao LPA incluem desde a ameba mixomicetes e o oócito de *Xenopus* até às células somáticas dos mamíferos. Portanto, parece provável que a fonte de LPA e a sua libertação possam não estar limitadas apenas às plaquetas activadas. Experiências recentes revelaram que, após estimulação por factores de crescimento peptídicos, os fibroblastos de mamíferos produzem rapidamente LPA, que em seguida é libertado no meio extracelular (Fukami e Takenawa, 1992).

Existem evidências de que estão presentes quantidades relativamente elevadas de LPA bioactivo de origem celular desconhecida no líquido ascítico de doentes com cancro do ovário (Xu et al., 1995a) e sabe-se que o líquido ascítico destas doentes possui uma actividade mitogénica potente sobre as células do carcinoma do ovário (Mills et al., 1988; Mills et al., 1990). Continua por determinar se é segregado pelas células tumorais para o fluido extracelular, se é segregado por leucócitos ou se é produzido a partir de lípidos mais complexos através das acções de diversas fosfolipases.

Os GPM e os SPM desencadeiam uma ampla variedade de respostas celulares que cobrem a árvore filogenética (Jalink et al., 1993a). O LPA induz sinais transitórios de Ca^{2+} que têm origem nas reservas intracelulares em diversas células como os neurónios (Jalink et al., 1993, Durieux et al., 1992), plaquetas, fibroblastos normais assim como transformados (Jalink et al., 1990), células epiteliais (van Corven et al., 1989; Moolenaar, 1991) e oócitos de *Xenopus* (Tigyi e Miledi, 1992; Durieux et al., 1992; Fernhout et al., 1992). O LPA induz a agregação plaquetária (Schumacher et al., 1979; Tokumura et al., 1981; Gerrard et al., 1979; Simon et al., 1982) e a contracção dos músculos lisos (Tokumura et al., 1980; Tokumura et al., 1994) e, após administração intravenosa, induz alterações da tensão arterial dependentes da espécie (Schumacher et al., 1979; Tokumura et al., 1978).

O LPA, quando adicionado a fibroblastos quiescentes, estimula a síntese do ADN e a divisão celular (van Corven et al., 1989; van Corven et al., 1992). Os efeitos do tipo crescimento produzidos pelo LPA não necessitam da presença de factores de crescimento peptídicos. Esta observação diferencia o LPA da endotelina ou da vasopressina, que necessitam da presença de insulina ou do factor de crescimento epidérmico (Moolenaar, 1991) para sustentar a proliferação celular. Um aspecto a salientar é que, nas células de mieloma Sp², o LPA foi responsável por uma resposta antimitogénica que foi mediada por um aumento dos níveis do AMPc (Tigyi et al., 1994; Fischer et al., 1998). Ao contrário da via mitogénica, a via antimitogénica não foi afectada pela toxina *pertussis* (PTX). Além disso, por adição de forskolina e de isobutilmetilxantina, as acções antimitogénicas do LPA em células do mieloma Sp² foram aditivas (Tigyi et al., 1994). O LPA causa alterações citoesqueléticas em vários tipos de células, que incluem a formação de aderências focais e de fibras de stress em fibroblastos (Ridley e Hall, 1992). O LPA também promove a inversão e a supressão da diferenciação do neuroblastoma induzindo a retracção de neurites em desenvolvimento (Jalink et al., 1994a; Jalink et al., 1994b). A adição de quantidades de nanomoles (nmol) de LPA (Jalink e Moolenaar, 1992) a células de neuroblastoma N1E-115 com carência de soro causou a retracção imediata de neurites, que foi acompanhada pelo arredondamento rápido, mas transitório, do corpo celular (Jalink et al., 1993b). Quando é assegurada uma presença contínua de LPA, as células de neuroblastoma mantêm o seu fenótipo indiferenciado, mas não conseguem sofrer mitose (Jalink et al., 1993b). Para a progressão do ciclo celular foram necessários factores adicionais, como factores de crescimento semelhantes à insulina. Depois das células sofrerem diferenciação morfológica, a adição de LPA inverte esta alteração morfológica. Portanto, as retracções de neurites induzidas por LPA resultam da contracção do citoesqueleto de actina e não da perda de aderência ao substrato (Jalink et al., 1993b; Jalink et al., 1994b).

O LPA, à semelhança de outros quimioatractivos fisiológicos (por exemplo, interleucina 8), induz a migração celular através de um mecanismo haptotáctico em monócitos

humanos (Zhou et al., 1995). Além de induzir a migração celular, o LPA promove a invasão da monocamada de células mesoteliais por células de hepatoma e de carcinoma (Imamura et al., 1993). O mecanismo subjacente a esta invasão ainda não foi esclarecido, mas pode ser devido a uma maior motilidade celular e a uma aderência celular aumentada. Finalmente, sabe-se também que o LPA bloqueia a apoptose dos cardiomiócitos neonatais (Umansky et al., 1997).

Demonstrou-se que um fosfolípido natural único, nomeadamente, o PA cíclico, é responsável por acções celulares que eram semelhantes ou opostas às de outros GPM, dependendo do tipo celular. Quando foi testado no oócito de *Xenopus*, desencadeou uma corrente de cloreto exactamente como outros GPM; no entanto a sua resposta não foi dessensibilizada pelo LPA (Fischer et al., 1998). Murakarni-Murofushi et al. (1993) demonstraram que o PA cíclico exibia acções antiproliferativas, ao contrário do LPA, que induz proliferação.

Os receptores dos PLGF (PLGFR) pertencem a uma superfamília de receptores acoplados a proteínas (proteína G) (GPCR) reguladoras de ligação a nucleótidos de guanina, com sete domínios transmembranares (7 TM). Os GPCR 7 TM constituem uma família de receptores da superfície celular que medeiam as suas respostas celulares através da interacção com a proteína G heterotrimérica. Identificaram-se vários receptores do LPA incluindo, entre outros, os receptores EDG-2, EDG-4, EDG-7 e PSP-24. Na Figura 1 apresenta-se uma árvore filogenética que ilustra o parentesco entre estes receptores do LPA e outros receptores.

Em 1996, Hecht et al. utilizaram a hibridação diferencial para clonar um ADNc que codifica um receptor em serpentina putativo de linhas celulares neocorticais de ratinho (Hecht et al., 1996). O gene foi designado por gene-1 da zona ventricular (Vzg-1). O gene foi expresso em regiões neurogénicas corticais e codificava uma proteína com um peso molecular de 41 kDa (364 aminoácidos). O Vzg-1 era muito semelhante a uma sequência em ovinos não publicada, designada por gene-2 da diferenciação endotelial (EDG-2). O mesmo ADNc também foi isolado como receptor órfão a partir de bibliotecas

de ratinho e de bovinos e era conhecido por recl.3 (Macrae et al., 1996). Estava amplamente distribuído nos tecidos de ratinho, tendo a mais alta expressão no cérebro e no coração.

Em 1996, Guo et al., utilizando um protocolo à base de PCR, isolaram outro receptor putativo do LPA, o PSP-24 (372 aminoácidos) a partir do oócito de *Xenopus* (Guo et al., 1996). Este receptor apresentava pouca semelhança com Vzq-1/EDG-2/recl.3 (Guo et al., 1996). Uma pesquisa baseada nas sequências, de receptores de esfingolípídeos, utilizando a sequência de ADNc do receptor do LPA humano EDG-2, conduziu a dois GPCR intimamente relacionados, nomeadamente, o H218 (EDG-5, 354 aminoácidos) e o EDG-3 (378 aminoácidos) do rato (An et al., 1997a). Uma análise de Northern revelou uma expressão elevada de ARNm que codificava EDG-3 e EDG-5 no tecido cardíaco.

A recente identificação do EDG-2 como receptor funcional do LPA levou An et al. a realizarem uma pesquisa baseada em sequências de um novo subtipo de receptores do LPA (An et al., 1998a). Foi identificado um ADNc humano, que codificava um GPCR, que foi designado por EDG-4 (An et al., 1998a). A análise *Northern blot* revelou que, embora o EDG-2 e o EDG-4 servissem ambos como receptores dos GPM, as suas distribuições tecidulares eram muito diferentes. Ao contrário do EDG-2, o EDG-4 era expresso principalmente nos leucócitos do sangue periférico e nos testículos (An et al., 1998a).

A amplificação por PCR do ADNc obtido de células T Jurkat humanas identificou um GPCR anteriormente desconhecido que pertence à família dos EDG. O GPCR identificado foi designado por EDG-7. Tem uma massa molecular de 40 kDa (353 aminoácidos). A análise *Northern blot* da expressão de EDG-7 em tecidos humanos revelou que é expresso no coração, pâncreas, próstata e testículos (Bandoh et al., 1999). Portanto, existem duas famílias distintas de receptores dos PLGF, a PSP24 e a EDG, com um total de dez PLGFR individuais (Figura 1). A lista continua a aumentar.

Estes diferentes receptores podem ser classificados com base nas suas especificidades para ligandos, para GPM ou SPM, como se indica na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Receptor de Factores de Crescimento Fosfolipídicos, Comprimento e Ligando Principal

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

O PSP24 de *Xenopus* e o PSP24 expresso em murinos transduzem de forma específica correntes de cloreto oscilatórias evocadas por GPM (LPA, Fischer *et al.*, 1998). Estes não são estruturalmente homólogos da família dos EDG (Tigyi e Miledi, 1992; Fernhout *et al.*, 1992). A família dos EDG pode ser dividida em dois subgrupos distintos. O primeiro grupo inclui EDG-2, EDG-4 e EDG-7 que servem de receptores apenas para os GPM (Hecht *et al.*, 1996; An *et al.*, 1998a; Bandoh *et al.*, 1999; An *et al.*, 1998b) e transmitem numerosos sinais em resposta à ligação aos ligandos. O segundo grupo engloba EDG-1, EDG-3, EDG-5, EDG-6 e EDG-8 e apresenta especificidade para os SPM (An *et al.*, 1997a; Im *et al.*, 2000; van Brocklyn *et al.*, 1998; van Brocklyn *et al.*, 2000; Spiegel e Milstein, 2000). A expressão tecidual principal dos vários PLGRF é apresentada abaixo na Tabela 2.

Tabela 2: Expressão nos tecidos humanos de receptores de factores de crescimento fosfolipídicos

PLGRF	Tecido humano com a expressão mais elevada
EDG-1	Ubíquo
EDG-2	Cardiovascular, SNC, tecidos das gónadas, GI
EDG-3	Cardiovascular, Leucócito
EDG-4	Leucócito, Testículos
EDG-5	Cardiovascular, SNC, tecidos das gónadas, Placenta
EDG-6	Tecido linfóide, Tecido hematopoiético
EDG-7	Coração, Pâncreas, Próstata, Testículos
EDG-8	Cérebro
PSP24	SNC

Os PLGF activam múltiplos episódios de transdução de sinais mediados pela proteína G. Estes processos são mediados através das famílias $G_{q/11}$, $G_{i/o}$, $G_{12/13}$ da proteína G heterotrimérica (Moolenaar, 1997; Spiegel e Milstein, 1995; Gohla et al., 1998).

A via da $G_{q/11}$ é responsável pela activação da fosfolipase C (PLC), que por sua vez induz a produção de trifosfato de inositol (IP_3) com a mobilização subsequente de Ca^{2+} numa grande diversidade de células (Tokumura, 1995). Em algumas células esta resposta é sensível à PTX, indicando que estão envolvidas múltiplas vias sensíveis e insensíveis à PTX (Tigyi et al., 1996). Esta via também é responsável pela activação mediada pelo diacilglicerol (DAG) da proteína-cinase C (PKC). A PKC activa a fosfolipase D (PLD) celular, que é responsável pela hidrólise da fosfatidilcolina em colina livre e PA (van der Bend et al., 1992a). Além disso, a PLC é capaz de activar a MAP-cinase directamente ou através da activação mediada pelo DAG da PKC em alguns tipos de células (Ghosh et al., 1997).

A via de sinalização mitogénica é mediada pela subunidade $G_{i/o}$ heterotrimérica da proteína G. Estudos de transfecção indicam que o dímero $G_{i\beta\gamma}$ é o responsável pela activação de Ras-MAP-cinase e não a subunidade α_i . A activação da Ras é precedida pela transactivação das tirosina-cinases receptoras (RTK) tais como os receptores do EGF (Cunnick et al., 1998) ou do PDGF (Herrlich et al., 1998). As RTK transactivadas activam a Ras, o que provoca a activação de MAP-cinases (ERK 1,2) por via de Raf. A subunidade $G_{i\alpha}$, que é sensível à PTX, inibe a adenililciclase (AC) resultando na união do dímero $\beta\gamma$ a uma cinase receptora acoplada à proteína G (GRK) que fosforila e dessensibiliza o receptor. O receptor fosforilado é recrutado pela arrestina β , recrutando depois a cinase src que fosforila o receptor do EGF, produzindo a sua conformação activa (Lin et al., 1997; Ahn et al., 1999; Luttrell et al., 1999). As RTK transactivadas activam, por sua vez, a Ras, produzindo a activação das MAP-cinases (ERK 1,2) por via de Raf. A subunidade $G_{i\alpha}$, que é sensível à PTX, inibe a AC produzindo níveis reduzidos de AMP cíclico (AMPc). Os efeitos celulares opostos do LPA, ou sejam, a mitogénese e a antimitogénese, são acompanhados por efeitos opostos ao nível do sistema de

segundos mensageiros do AMPc. A mitogénese é mediada através da via da $G_{i\alpha}$, que produz níveis reduzidos de AMPc (van Corven *et al.*, 1989; van Corven *et al.*, 1992), enquanto a antimitogénese é acompanhada por uma elevação do AMPc dependente de Ca^{2+} não sensível à PTX (Tigyi *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1998).

Pelo contrário, sabe-se muito pouco sobre a via de sinalização pela $G_{12/13}$ insensível à PTX que induz o rearranjo do citoesqueleto de actina. Esta via também pode envolver a transactivação de RTK (Lin *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999; Gohla *et al.*, 1998) e converge numa pequena GTPase, Rho (Moolenaar, 1997). Sabe-se muito mais sobre a sinalização a jusante de Rho porque foram isolados e identificados vários parceiros proteicos. A Rho activa as Ser/Thr-cinases, que fosforilam, e consequentemente inibem, a fosfatase para a cadeia leve da miosina (MLC-fosfatase) (Kimura *et al.*, 1996). Esta via resulta na acumulação da forma fosforilada da MLC, produzindo respostas citoesqueléticas que originam efeitos celulares como a retracção de neurites (Tigyi e Miledi, 1992; Tigyi *et al.*, 1996; Dyer *et al.*, 1992; Postma *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1997), a indução de fibras de stress (Ridley e Hall, 1992; Gonda *et al.*, 1999), a estimulação da quimiotaxia (Jalink *et al.*, 1993a), a migração de células (Zhou *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1992) e a capacidade invasiva das células tumorais (Imamura *et al.*, 1993; Imamura *et al.*, 1996). A capacidade invasiva das células tumorais, mediada pela Rho e induzida pelos PLGF, é bloqueada pela toxina C3 de *C. botulinum*, que ribosila especificamente a Rho através de um mecanismo dependente de ADP (Imamura *et al.*, 1996).

A Rho também tem a capacidade de estimular a síntese do ADN em fibroblastos quiescentes (Machesky e Hall, 1996; Ridley, 1996). A expressão da família Rho de GTPases activa o factor de resposta sérica (SRF) que medeia a transcrição génica precoce (Hill *et al.*, 1995). Além disso, o PLGF (LPA) induz a invasão de células tumorais (Imamura *et al.*, 1996); contudo, ainda não é claro se envolve alterações citoesqueléticas ou a transcrição génica, ou ambas.

Devido ao envolvimento de LPA/receptor do LPA em várias vias celulares e actividades de células, como a proliferação e/ou a migração, assim como a sua implicação na cicatrização de feridas e no cancro, seria desejável identificar novos compostos que sejam capazes de actuar, de preferência selectivamente, como antagonistas ou como agonistas nos receptores de LPA acima identificados.

Presentemente, são muito poucos os inibidores sintéticos ou endógenos dos receptores de LPA conhecidos. No que respeita aos antagonistas comunicados até à data, a maior parte do trabalho efectuado incidiu sobre a SPH, a SPP, a N-palmitoil-1-serina (Bittman *et al.*, 1996) e a N-palmitoil-1-tirosina (Bittman *et al.*, 1996). Sabe-se que os compostos acima mencionados inibem as correntes de cloreto induzidas pelo LPA no oócito de *Xenopus* (Bittman *et al.*, 1996; Zsiros *et al.*, 1998). Contudo estes compostos não foram estudados em todos os sistemas celulares. Sabe-se também que a SPP inibe a capacidade invasiva das células tumorais, mas não se sabe ao certo se a SPP o faz actuando como inibidor do LPA ou através de acções dos seus próprios receptores. A N-palmitoil-1-serina e a N-palmitoil-1-tirosina também inibiram a agregação plaquetária induzida pelo LPA (Sugiura *et al.*, 1994), mas continua por verificar se estes compostos actuam no receptor do LPA. O lisofosfatidilglicerol (LPG) foi o primeiro lípido que demonstrou um certo grau de inibição das acções do LPA (van der Bend *et al.*, 1992b), mas não foi detectado em vários tipos de células que respondem ao LPA (Lilliom *et al.*, 1996). Nenhum destes inibidores demonstrou actuar selectivamente em receptores específicos do LPA.

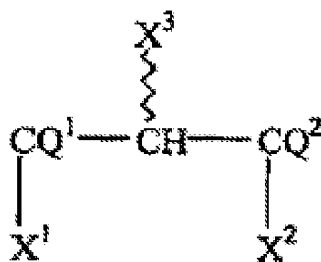
Demonstrou-se que um composto polissulfonado, a suramina, inibia a síntese do ADN induzida pelo LPA de maneira reversível e dependente da dose. Contudo, demonstrou-se que a suramina não tem qualquer especificidade para o receptor do LPA e que bloqueava as acções do LPA apenas em concentrações milimolares (mM) muito elevadas (van Corven *et al.*, 1992).

Afirmou-se que dois compostos, o ácido 2-[4-([3-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-di-hidropirimidin-5-il)propil]-{[(4-fosfono-oxibutylcarbamoíl)metilsulfanil]acetil}amino)benzoílamino]pentanodióico e o ácido 2-[4-{[3-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-di-hidropirimidin-5-il)propil]-(8-fosfono-oxioctanoíl)amino}benzoílamino]pentanodióico, inibem o transporte de 3H-metotrexato para o interior das células leucémicas do tipo T MOLT-4 (Beilstein Abs XP002239009).

A presente invenção tem como objectivo solucionar as deficiências associadas aos agonistas do LPA e antagonistas do LPA actuais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a compostos de acordo com a fórmula (I) seguinte:



(I)

na qual,

X^1 é $(HO)_2PO-Z^1-$ ou $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$;

X^2 e X^3 são ambos R^1-NR^2-A- , sendo cada um igual ou diferente;

A é uma ligação directa, $(CH_2)_k$ em que k é um número inteiro de 0 a 30, ou 0;

Z^1 é $-O(CH_2)_m-$, em que m é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$;

Z^2 é $-O(CH_2)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$;

Q^1 e Q^2 são independentemente H_2 ou $=O$;

R^1 é, independentemente, hidrogénio; um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada; um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel seleccionadas do grupo de alquilo, alcoxis, ácidos e álcoois; um acilo incluindo um anel aromático; um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia

C1 a C30 linear ou ramificada; um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; $-C(O)-O-R^7$; e R^2 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

R^7 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

em que, quando X^1 é $(HO)_2PO-O-$, X^2 é $NHCH_3$, Q^1 é H_2 , Q^2 é $=O$, então X^3 não é $-NHR_2$ em que R_2 é hidrogénio ou acilo substituído por metilo ou fenilo.

Também são divulgadas composições farmacêuticas que incluem um veículo farmaceuticamente aceitável e um composto da presente invenção.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de modulação da actividade dos receptores de LPA *in vitro* que inclui proporcionar um composto da presente invenção que tenha actividade como agonista dos receptores de LPA ou como antagonista dos receptores de LPA e contactar um receptor de LPA *in vitro* com o composto, em condições eficazes para modular a actividade do receptor de LPA.

Ainda outro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um composto da presente invenção para tratamento do cancro e à administração de uma quantidade eficaz do composto a um doente de maneira eficaz para tratar o cancro.

Ainda outro aspecto adicional da presente invenção refere-se à utilização de um composto da presente invenção com actividade como agonista de um receptor de LPA para

intensificação da proliferação celular e ao contacto do receptor de LPA numa célula com o composto de maneira eficaz para intensificar a proliferação da célula induzida pelo receptor do LPA.

Ainda outro aspecto adicional da presente invenção refere-se a um método para produzir os compostos da presente invenção. Uma abordagem para produzir os compostos da presente invenção inclui:

reagir $(Y^2O)_2PO-Z^{11}-Z^{13}$ ou $(Y^2O)_2PO-Z^{12}-P(OH)O-Z^{11}-Z^{13}$, onde

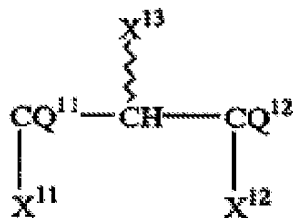
Z^{11} é $-O(CH_2)_m-$, em que m é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$;

Z^{12} é $-O(CH_2)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$;

Z^{13} é H ou um primeiro grupo de saída ou $-Z^{11}-Z^{13}$ formam juntos o primeiro grupo de saída, e

Y^2 é H ou um grupo protector,

com um composto intermediário de acordo com a fórmula (VI)



(VI)

na qual

X^{12} e X^{13} são ambos $R^{11}-NR^{12}-A-$ sendo cada um igual ou diferente;

X^{11} é OH, NH_2 , SH ou um segundo grupo de saída;

A é uma ligação directa, $(CH_2)_k$ em que k é um número inteiro de 0 a 30, ou 0;

Q^{11} e Q^{12} são, independentemente, H_2 ou $=O$;

R^{11} é, independentemente, hidrogénio; um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada; um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel seleccionadas do grupo de alquilos, alcoxis, ácidos e álcoois; um acilo incluindo um

anel aromático; um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; $-C(O)-O-R^{16}$; e

R^{12} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

R^{16} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

seguida de uma etapa de desprotecção, se necessário, em que as referidas etapas de reacção e de desprotecção são efectuadas em condições eficazes para formar um composto de acordo com a fórmula (I) na qual X^1 é $(HO)_2PO-Z^1-$ ou $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$.

Os compostos da presente invenção, que foram aqui identificados como agonistas ou antagonistas de um ou mais receptores do LPA são úteis, respectivamente, para inibir ou intensificar vias bioquímicas mediadas pela sinalização dos receptores do LPA. Através da modulação da sinalização dos receptores do LPA os antagonistas e os agonistas têm utilidades específicas e substanciais para tratamento do cancro e melhoramento da cicatrização de feridas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma árvore filogenética que ilustra a classificação e a relação de dez receptores de factores de crescimento fosfolipídicos, incluindo receptores do LPA, EDG-2, EDG-4, EDG-7 e PSP-24 (α, β).

A Figura 2 ilustra o esquema de síntese utilizado para preparação dos compostos de serinamida **35-43**.

A Figura 3 ilustra o esquema de síntese utilizado para preparação de compostos de fosfato de serinamida **55-59**.

A Figura 4 ilustra o esquema de síntese utilizado para preparação de compostos de bisfosfato **66-68**.

As Figuras 5A-B ilustram a síntese de compostos de bisfosfato. A Figura 5A ilustra o esquema de síntese utilizado para preparação de compostos de 1,2-bisfosfato **85-92**. A Figura 5B ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos de 1,3-bisfosfato.

As Figuras 6A-B ilustram esquemas de síntese para preparação de compostos de pirofosfato.

As Figuras 7A-C ilustram esquemas de síntese para preparação de monofosfatos e monofosfonatos substituídos a partir de um intermediário diéter protegido por tosilato.

A Figura 8 ilustra o esquema de síntese utilizado para preparação de compostos fosfatos de ácidos gordos de cadeia linear **106-110**.

A Figura 9 ilustra a síntese de ésteres monoalquílicos do ácido tiofosfórico de cadeia linear.

A Figura 10 ilustra a síntese do ácido alquilamidfosfórico de cadeia linear.

A Figura 11 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos de fosfato cíclico de conformação restrita.

A Figura 12 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos de fosfato cíclico de conformação restrita.

A Figura 13 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos de fosfato cíclico de conformação restrita.

A Figura 14 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos de conformação restrita com uma porção fosfato livre.

A Figura 15 ilustra um esquema de síntese alternativo para preparação de 2-monofosfatos.

A Figura 16 ilustra um esquema de síntese alternativo para preparação de compostos de 1,3-bisfosfato.

A Figura 17 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos possuindo como X^3 um grupo $-N(H)-acilo$.

A Figura 18 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos possuindo como X^3 um grupo $-N(H)-imidazole$.

A Figura 19 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos possuindo como X^3 um grupo $-N(H)-C(O)-O-R^7$.

A Figura 20 ilustra um esquema de síntese para preparação de compostos possuindo como X^3 um grupo $-N(H)-C(S)-O-R^7$.

A Figura 21 é um gráfico que ilustra a inibição dependente da dose das correntes de cloreto induzidas pelo LPA em oócitos de *Xenopus* por aplicação extracelular de **56** (SAP, 14:0).

A Figura 22 é um gráfico que ilustra a inibição dependente da dose das correntes de cloreto induzidas pelo LPA em oócitos de *Xenopus* por aplicação extracelular de **57** (SAP, 18:0).

As Figuras 23A-B são gráficos que ilustram a inibição dependente da dose das correntes de cloreto induzidas pelo LPA em oócitos de *Xenopus* por aplicação extracelular de **66** (MAGDP, 18:0). A seta indica o instante de injeção intracelular de **66** a 5 μ M seguida da aplicação extracelular de LPA.

A Figura 24 é um gráfico que ilustra o efeito inibidor da dose de **66** (MAGDP, 18:0). Foi aplicada uma quantidade constante de LPA (5 nM) a oócitos juntamente com quantidades crescentes de **66**. Os pontos de resultados representam a amplitude dos picos das correntes de cloreto medidas.

A Figura 25 é um gráfico que ilustra a inibição dependente da dose das correntes de cloreto induzidas pelo LPA em oócitos de *Xenopus* por aplicação extracelular de **92** (MAGDP, 22:0).

A Figura 26 é um gráfico que ilustra o efeito dependente da dose de **56a** (SDAP, 14:0/2:0) em oócitos de *Xenopus*.

A Figura 27 é um gráfico de barras que representa os efeitos dos compostos **56** (SAP, 14:0), **56a** (SDAP, 14:0/2:0) e **66** (MAGDP, 18:0) na migração de células HEY induzida pelo LPA. A concentração do composto de teste foi de 1 μ M; a concentração de LPA foi de 0,1 μ M.

As Figuras 28A-C são gráficos que ilustram a relação dose-resposta para respostas de Ca^{2+} em células RH7777 com expressão heteróloga de Edg-2 (28A), Edg-4 (28B) ou Edg-7 (28C). Cada ponto de resultados representa a média de pelo menos três medições \pm D.P.

As Figuras 29A-D são gráficos que ilustram a inibição por DGPP 8:0 das respostas de Ca^{2+} desencadeadas pelo LPA em células RH7777 que expressam Edg-2 e Edg-7, mas não Edg-4. As células RH7777 que expressam Edg-2, Edg-4 ou Edg-7 foram expostas a uma mistura de 100 nM de LPA 18:1 e 1 μ M de DGPP 8:0. As células de controlo foram expostas a 100 nM de LPA 18:1. As respostas representativas de Ca^{2+} estão indicadas para células com expressão estável de Edg-2 (29A), Edg-4 (29B) e Edg-7 (29C) ou células com expressão transitória de Edg-4 (29D).

As Figuras 30A-C são gráficos que ilustram a caracterização farmacológica da inibição da resposta de LPA pelo DGPP 8:0 em células RH7777 que expressam Edg-7 (células Edg-7). As células foram expostas a uma concentração de 250 nM de LPA 18:1 misturado com concentrações crescentes de DGPP 8:0 e foram medidas as áreas dos picos das respostas de Ca^{2+} resultantes (30A). As células também foram expostas a concentrações crescentes de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 500 nM de DGPP 8:0 (30B). As células Edg-7 foram expostas a uma concentração de 250 nM de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 500 nM do lípido indicado (30C). As áreas dos picos das respostas de Ca^{2+} estão

representadas como valores médios de um mínimo de três medições \pm D.P.

As Figuras 31A-C são gráficos que ilustram a caracterização farmacológica da inibição da resposta de LPA por DGPP 8:0 em células RH7777 que expressam Edg-2 (células Edg-2). As células Edg-2 estáveis foram expostas a uma concentração de 250 nM de LPA 18:1 misturado com concentrações crescentes de DGPP 8:0 e foram medidas as áreas dos picos das respostas de Ca^{2+} resultantes (31A). As células Edg-2 foram expostas a concentrações crescentes de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 10 μM de DGPP 8:0 (31B). As células Edg-2 foram expostas a uma concentração de 250 nM de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 10 μM do lípido indicado (31C). As respostas de estão representadas como valores médios de um mínimo de três medições \pm D.P.

As Figuras 32A-B são gráficos que ilustram a relação estrutura-actividade de DGPP em células RH7777 que expressam Edg-4. As células Edg-4 estáveis foram expostas a uma concentração de 500 nM de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 5 μM dos lípidos indicados (32A). As células com expressão transitória do Edg-4 foram expostas a uma concentração de 100 nM de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 1 μM dos lípidos indicados (32B). As áreas dos picos das respostas de Ca^{2+} foram medidas e estão representadas como valores médios de um mínimo de três medições \pm D.P.

As Figuras 33A-C são gráficos que ilustram a caracterização farmacológica de DGPP 8:0 nas correntes de Cl^- desencadeadas pelo LPA em oócitos de *Xenopus*. Os oócitos foram expostos a uma concentração de 5 nM de LPA 18:1 misturado com concentrações crescentes de DGPP 8:0 e foi medida a amplitude dos picos das correntes de Cl^- oscilatórias resultantes (33A). Os oócitos foram expostos a concentrações crescentes de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 200 nM de DGPP 8:0 (33B). Os pontos de resultados representam os valores médios de um mínimo de três medições \pm D.P. Os oócitos foram tratados com 5 nM de LPA 18:1 ou com uma mistura de 5 nM de LPA 18:1 e 1 μM de DGPP 8:0, como indicado (33C). A injeção intracelular de 1 μM de DGPP 8:0 está indicada pela seta.

As Figuras 34A-D são gráficos que ilustram a inibição por DGPP 8:0 das respostas de Ca^{2+} desencadeadas pelo LPA em fibroblastos NIH3T3 e em células HEY do cancro do ovário. Análise por RT-PCR das células NIH3T3 para transcritos de receptores Edg e PSP24 (34A). As células NIH3T3 foram expostas a uma concentração de 100 nM de LPA 18:1, ou S1P, misturado com uma concentração de 10 μM de DGPP 8:0 (34B). Análise por RT-PCR de células HEY para detecção da presença de transcritos de Edg e PSP24 (34C). As células HEY foram expostas a uma concentração de 100 nM de LPA 18:1, ou S1P, misturado com uma concentração de 1 μM de DGPP 8:0 (34D). As áreas dos picos das respostas de Ca^{2+} resultantes foram medidas e estão representadas como valores médios de um mínimo de três medições \pm D.P.

A Figura 35 é um gráfico que ilustra a inibição por DGPP 8:0 da proliferação de células NIH3T3 desencadeada pelo LPA. As células NIH3T3, após permanecerem num meio isento de soro durante 6 horas, foram expostas a uma concentração de 5 μM de LPA 18:1 misturado com uma concentração de 10 μM dos lípidos indicados. As células de controlo receberam solvente (BSA) em vez de LPA 18:1. As células foram incubadas com os lípidos durante 24 horas e contadas. Os dados são representativos de três experiências.

A Figura 36 é um gráfico que ilustra a caracterização farmacológica da inibição da resposta do LPA pelos compostos de fosfato de ácido gordo de cadeia linear **106-110** em oócitos de *Xenopus*.

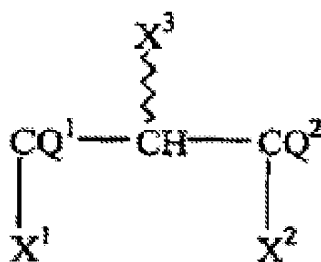
A Figura 37 é um gráfico que ilustra a caracterização farmacológica da inibição da resposta do LPA pelo composto de fosfato de ácido gordo de cadeia linear **108** em oócitos de *Xenopus*.

A Figura 38 é um gráfico que ilustra a caracterização farmacológica da resposta induzida por agonistas ou antagonistas, de células RH7777 que expressam individualmente os receptores Edg-2, Edg-4 ou Edg-7, após exposição das células ao composto de fosfato de ácido gordo de cadeia

linear **108**. Mediram-se as áreas dos picos das respostas de Ca^{2+} .

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Um aspecto da presente invenção refere-se a um composto de acordo com a fórmula (I)



(I)

na qual,

X^1 é $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^1-$ ou $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^2-\text{P}(\text{OH})\text{O}-\text{Z}^1-$;

X^2 e X^3 são ambos $\text{R}^1-\text{NR}^2-\text{A}-$, sendo cada um igual ou diferente;

A é uma ligação directa, $(\text{CH}_2)_k$ em que k é um número inteiro de 0 a 30, ou 0;

Z^1 é $-\text{O}(\text{CH}_2)_m-$, em que m é um número inteiro de 1 a 50, ou $-\text{O}-$;

Z^2 é $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 50, ou $-\text{O}-$;

Q^1 e Q^2 são independentemente H_2 ou $=\text{O}$;

R^1 é, independentemente, hidrogénio; um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada; um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel seleccionadas do grupo de alquilo, alcoxis, ácidos e álcoois; um acilo incluindo um anel aromático; um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$; e

R^2 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

R^7 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, ou um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

Em que, quando X^1 é $(HO)_2PO-O-$, X^2 é $NHCH_3$, Q^1 é H_2 , Q^2 é $=O$, então X^3 não é $-NHR_2$ em que R_2 é um hidrogénio ou acilo substituído por metilo ou fenilo.

Para cada um dos grupos R acima identificados (p. ex., R^1 , R^2 , R^7) pretende-se que os alquilos de cadeia linear tenham a fórmula $-(CH_2)_xCH_3$ em que x tem um valor entre 0 e 29; os alquilos de cadeia ramificada tenham a fórmula definida acima para o alquilo de cadeia linear, excepto que um ou mais grupos CH_2 são substituídos por grupos CHW em que W é uma cadeia lateral de alquilo; os alcenilos de cadeia linear tenham a fórmula $-(CH_2)_{xa}CH=CH(CH_2)_{xb}CH_3$ em que x_a e x_b têm cada um valor entre 0 e 27 e $(x_a + x_b)$ não é superior a 27; e os alcenilos de cadeia ramificada tenham a fórmula definida acima para o alcenilo de cadeia linear, excepto que um ou mais grupos CH_2 são substituídos por grupos CHW ou um grupo CH é substituído por um grupo CW, em que W é uma cadeia lateral de alquilo.

Os anéis aromáticos incluem, sem limitação, fenilos, indenos, naftalos e bifenilos. O anel aromático pode incluir mono-, di- ou trissubstituições do anel localizadas nas posições *orto*, *meta* ou *para* nos anéis relativamente à posição onde o anel se liga ao grupo NR^2 da cadeia R^1-NR^2-A- . As substituições nos anéis podem incluir, sem limitação, alquilo, alcoxi, ácidos, álcoois.

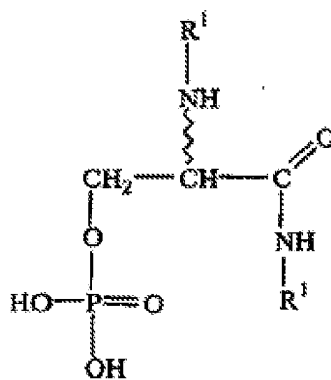
Os grupos acilo podem incluir alquilo, alcenilo ou anéis aromáticos, como se descreve acima.

Os grupos arilalquilo e ariloxialquilo podem incluir, sem limitação, grupos alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada como acima descrito, em que o grupo alquilo se liga ao grupo NH^2 da cadeia R^1-NR^2-A- .

Os seguintes compostos endógenos ou sintéticos anteriormente conhecidos são especificamente excluídos da definição acima descrita do composto de acordo com a fórmula (I): ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, ácido fosfatídico cíclico, alcenil-glicerolfosfato, dioctilglicerol-pirofosfato e N-palmitoil-L-serina.

Exemplos de compostos de acordo com a fórmula (I) são os compostos da subclasse de acordo com a fórmula (III) abaixo.

Nas estruturas da fórmula (III) Q^1 é H_2 ; Q^2 é $=O$; X^1 é $(HO)_2PO-Z^1-$, em que Z^1 é O ; e X^2 e X^3 são R^1-NR^2-A- , com A sendo uma ligação directa e NR^2 sendo $-NH-$ para cada. Cada R^1 é definido independentemente como indicado acima para a fórmula (I). As espécies preferidas no âmbito da fórmula III são aquelas em que X^3 é $-NH_2$ e X^2 é $-NHR^1$, em que R^1 é um alquilo C14 a C18, mais preferencialmente um alquilo C14 ou um alquilo C18; ou em que X^3 é $-NHR^1$, em que R^1 é um grupo acetilo, e X^2 é $-NHR^1$, em que R^1 é um alquilo C14.



(III)

Os compostos de acordo com a fórmula (I), assim como os compostos do sub-género de acordo com a fórmula (III), podem ser preparados utilizando os esquemas de síntese descritos a seguir.

Para sintetizar as séries de serinamidas (SA) e de fosfatos de serinamidas (SAP) (fórmula III), foi sintetizado primeiro o precursor β -lactona protegido por *t*-Boc (**25**). Começando com a *t*-Boc-L-serina disponível no mercado (Figura 2, **24**), introduziram-se a trifetilfosfina (PPh_3) e o dietilazidodicarboxilato (DEAD) de acordo com as condições de

Mitsunobo, dando o composto **25** com um rendimento de cerca de 50% (Sun *et al.*, 1996). As tentativas de abertura da β -lactona **25** extremamente lábil utilizando o procedimento desenvolvido por Sun *et al.* com várias aminas primárias para obter as hidroxiamidas **26-34** não foram bem sucedidas, apesar da utilização de vários reagentes (triethylamina, etc.). Em vez disso, por meio de refluxo das aminas primárias com a β -lactona em THF obtiveram-se as hidroxiamidas protegidas por *t*-Boc **26-34**. Os compostos **26-34** foram purificados utilizando cromatografia *flash* em coluna. A remoção do grupo protector *t*-Boc mediada pelo ácido trifluoroacético (TFA) originou os compostos **35-43** na forma de sais de TFA.

Para sintetizar os compostos **55-59**, as hidroxiamidas protegidas por *t*-Boc **26-30** foram fosforiladas. Um estudo cuidadoso do composto final sugeriu que o composto final possuiria uma região altamente hidrófoba e uma região altamente hidrófila. Ambas as regiões podem causar problemas durante o processo de extracção e/ou fixarem-se à coluna na fase de purificação. Para evitar estes problemas potenciais utilizou-se a química dos fosforamidatos. Utilizando a química dos fosforamidatos, foi posta a hipótese de que os grupos hidroxilo dos fosfatos podiam ser protegidos para tornar a molécula completamente hidrófoba, facilitando assim a sua purificação sem dificuldades.

Utilizou-se, essencialmente, uma combinação de procedimentos para obter os produtos desejados (**55-59**) (Lynch *et al.*, 1997; Bittman *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999). As hidroxiamidas (**26-30**) de partida foram lavadas repetidamente com piridina anidra e secas sob vácuo elevado durante mais de 48 horas. As hidroxiamidas lavadas com piridina foram mantidas sob uma atmosfera de argon. Adicionou-se depois 1H-tetrazole e uma mistura 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recentemente destilados. Adicionou-se o agente de fosforilação, fosforamidato de dibenzildisopropilo. Após monitorização da reacção por TLC, o fosfonato foi oxidado a fosfato *in situ* com ácido peracético. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna, obtendo-se os compostos **50-54** na forma de fosfatos protegidos por benzilo. A remoção dos grupos benzilo protectores foi efectuada em etanol submetendo os compostos **50-54** a redução catalítica utilizando paládio a 10%

em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ a 60 psi, para produzir os compostos **55-59** (Figura 3). Fazendo reagir **56** com anidrido acético obteve-se o composto **56a** (Figura 3).

Depois de elucidada a técnica de fosforilação para a síntese da série SAP (compostos **55-59**), utilizou-se um procedimento semelhante para a síntese de bisfosfatos (Figuras 4 e 5A-B). Os dióis **60-62** disponíveis no mercado foram lavados com piridina anidra e secos durante 48 horas sob vácuo elevado. Estes dióis secos (**60-62**) foram dissolvidos numa mistura 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recentemente destilados, seguindo-se a adição de 1H-tetrazole. A esta mistura agitada foi adicionado fosforamidato de dibenzildiisopropilo. A mistura reaccional foi monitorizada por TLC e, na altura apropriada, o fosfonato foi oxidado a fosfato *in situ* com ácido peracético. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna, obtendo-se os compostos **63-65** na forma de bisfosfatos protegidos por benzilo. A remoção dos grupos benzilo protectores foi efectuada em etanol submetendo os compostos **63-65** a redução catalítica utilizando paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ a 60 psi, para produzir os compostos **66-68** na forma de bisfosfatos. Seguiu-se um procedimento semelhante ao descrito acima para a síntese de **66-68** para se obterem os compostos **85-92**.

Embora os compostos **85-92** sejam 1,2-bisfosfatos, a Figura 5B ilustra a síntese de 1,3-bisfosfatos. Como substância de partida utilizou-se o 2-fenoxi-1,3-propanodiol comercialmente disponível. O composto de partida foi protegido primeiro com *t*-BuOK na presença de iodeto de metilo, seguido de hidrogenação catalítica para dar um intermediário que se fez reagir com um halogeneto (RX, em que R é como definido acima para R¹). O produto intermediário recuperado foi subsequentemente tratado com AlCl₃ na presença de etil-SH para produzir um 1,3-diol com o grupo RO ligado ao C2 do esqueleto. O 1,3-diol recuperado foi dissolvido em THF/CH₂Cl₂ 1:1 recentemente destilados, seguido de adição de 1H-tetrazole. A esta mistura agitada foi adicionado fosforamidato de dibenzildiisopropilo. A mistura reaccional foi monitorizada por TLC e, na altura apropriada, o fosfonato foi oxidado a fosfato *in situ* com ácido peracético. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna para dar compostos

bisfosfato protegidos por benzilo. A remoção dos grupos benzilo protectores foi efectuada em etanol submetendo os compostos a redução catalítica utilizando paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ a 60 psi, para produzir os compostos 1,3-bisfosfato.

Para sintetizar pirofosfatos utilizou-se tosilato de glicidal ((2R)(-) ou (2R)(+)) como substância de partida (Figuras 6A-B). A abertura do anel foi catalisada por um ácido de Lewis, como o BF₃, na presença de um álcool, dando um intermediário que foi protegido por tosilato na posição C1. Na etapa seguinte, o álcool na posição C2 foi substituído por um grupo R (por exemplo, R¹, tal como descrito acima) utilizando um excesso de R-triflato e de 2,6-di-*terc*-butil-4-metilpiridina, dando um intermediário diéter. O tratamento do diéter intermediário com hidrogenopirofosfato de tris(tetra-*n*-butilamónio) causou um ataque nucleofílico do tosilato, substituindo o tosilato por um substituinte pirofosfato na posição C1.

Para produzir um pirofosfato o intermediário protegido por tosilato foi tratado com álcool benzílico na presença de anidrido trifílico e de 2,6-di-*terc*-butil-4-metilpiridina, originando a benzilação do intermediário na posição C2. O grupo protector tosilato no intermediário benzilato foi removido primeiro por acção de superóxido de potássio na presença de 18-coroa-6, dando um grupo hidroxilo na posição C1 que foi substituído por um grupo R (por exemplo, R¹, como descrito acima) utilizando um excesso de R-triflato e de 2,6-di-*terc*-butil-4-metilpiridina. O diéter intermediário resultante ainda possuía o grupo protector benzilo na posição C2. O grupo protector benzilo foi removido por hidrogenação e o grupo hidroxilo subsequente foi tosilado por acção de piridina e de cloreto de *p*-toluenossulfonilo, produzindo um diéter com um grupo tosilo na posição C2. O grupo tosilato foi removido por ataque nucleofílico após tratamento com hidrogenopirofosfato de tris(tetra-*n*-butilamónio), substituindo o tosilato por um substituinte pirofosfato na posição C2.

Esquemas alternativos para a preparação de fosfatos e de bisfosfatos (assim como de pirofosfatos, fosfonatos, etc.) estão ilustrados nas Figuras 15 e 16.

Na Figura 15 utilizou-se brometo de glicidal como substância de partida juntamente com um álcool (ROH). As condições da reacção incluíram o tratamento com K_2CO_3 seguido de tratamento com o sal de amónio $C_6H_5CH_2N^+(C_2H_5)_3Cl^-$, resultando na substituição do brometo pelo grupo R. O anel do intermediário glicidal foi depois aberto após tratamento com HCl 1 M em éter e um álcool (R^1OH), dando um intermediário diéter com um grupo hidroxilo na posição C2. O diéter foi misturado com 1H-tetrazole e a esta mistura agitada foi adicionado fosforamidato de dibenzildiisopropilo. A mistura reaccional foi monitorizada por TLC e, na altura apropriada, o fosfonato foi oxidado a fosfato *in situ* com ácido peracético. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna para dar fosfatos protegidos por benzilo. A remoção dos grupos protectores benzilo foi efectuada em etanol submetendo os fosfatos protegidos por benzilo a redução catalítica utilizando paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 a 60 psi, para produzir compostos de monofosfato.

Na Figura 16 foi utilizado um esquema de reacção semelhante, excepto que em vez de se fazer reagir o brometo de glicidal com um álcool (ROH) utilizou-se BnOH para proteger a posição C3. As condições da reacção incluíram o tratamento com K_2CO_3 seguido de tratamento com o sal de amónio $C_6H_5CH_2N^+(C_2H_5)_3Cl^-$, resultando na substituição do brometo pelo grupo Bn. O anel do intermediário glicidal foi depois aberto após tratamento com HCl 1 M em éter e BnOH anidro, o que protegeu a posição C1. O diéter intermediário resultante possui um grupo hidroxilo na posição C2. O diéter foi misturado com um sal halogeneto (RX) em K_2CO_3 aquoso, produzindo um produto intermediário protegido com um grupo R unido por ligação éter à posição C2. Este intermediário foi desprotegido por redução catalítica utilizando paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 a 60 psi, para produzir um 1,3-diol. O diol foi combinado com 1H-tetrazole e a esta mistura agitada foi adicionado fosforamidato de dibenzildiisopropilo. A mistura reaccional foi monitorizada

por TLC e, na altura apropriada, o fosfonato foi oxidado a fosfato *in situ* com ácido peracético. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna para dar fosfatos protegidos por benzilo. A remoção dos grupos protectores benzilo foi efectuada em etanol submetendo os fosfatos protegidos por benzilo a redução catalítica utilizando paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ a 60 psi, para produzir 1,3-bisfosfatos.

Utilizando o intermediário diéter preparado como mostrado na figura 6A (por exemplo, com os substituintes R e R¹), podem ser ligados vários fosfatos e fosfonatos modificados à posição C1 após remoção do grupo tosilo. Como indicado na Figura 7A, faz-se reagir o intermediário em condições alcalinas com X⁴-Z¹-PO(O-grupo protector)₂ no qual Z¹ é -(R³)CH- e X⁴ é H. As condições alcalinas removem o grupo protector tosilo e permitem que o fosfato modificado -Z¹-PO(O-grupo protector)₂ forme uma ligação simples na posição C1. Os grupos protectores são removidos após tratamento com TMSBr, originando um grupo -(R³)CH-PO(OH)₂ na posição C1. Como indicado na Figura 7B, faz-se reagir o intermediário em condições alcalinas utilizando tris(tetra-n-butilamónio) com X⁴-Z¹-PO(OH)-Z²-PO(OH)₂ no qual Z¹ é -O-, Z² é -CH₂- e X⁴ é H. As condições alcalinas removem o grupo protector tosilo e permitem que o fosfonato modificado -Z¹-PO(OH)-Z²-PO(OH)₂ forme uma ligação simples na posição C1. Após tratamento em condições ácidas e CH₃CN, o grupo -O-PO(OH)-CH₂-PO(OH)₂ é instalado na posição C1. Como indicado na Figura 7C, faz-se reagir o intermediário em condições alcalinas com X⁴-Z¹-PO(O-grupo protector)₂ no qual Z¹ é -OCH₂CH₂- e X⁴ é H. As condições alcalinas removem o grupo protector tosilo e permitem que o fosfato modificado -Z¹-PO(O-grupo protector)₂ forme uma ligação simples na posição C1. Os grupos protectores são removidos após o tratamento por lavagem com TMSBr em colidina e água, originando um grupo -OCH₂CH₂-PO(OH)₂ na posição C1.

Para preparar o composto de fosfato cíclico de conformação restrita da fórmula (III) foram utilizados os compostos **26-30** como substâncias de partida no esquema de síntese ilustrado na Figura 11. Fizeram-se reagir os compostos **26-30** com 1H-tetrazole e o produto resultante foi tratado com fosforamido

de di-*terc*-butildiisopropilo causando uma ciclização intramolecular. A oxidação *in situ* do fosfonato com ácido peracético produziu um fosfato cíclico intermediário. A redução com TFA produziu os compostos da fórmula (III).

Também podem ser preparados outros compostos de conformação restrita.

Como indicado na Figura 12, é apresentado um esquema alternativo para preparação de fosfatos cíclicos nos quais X^1 e X^2 conjuntamente são $-O-PO(OH)-O-$. Faz-se reagir um intermediário 1,3-diol protegido por benzilo com $POCl_3$, produzindo uma ciclização intramolecular. O tratamento com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 (como descrito acima) origina um fosfato cíclico com um grupo hidroxilo ligado ao carbono C2. O intermediário cíclico é então tratado com um excesso de R-triflato e 2,6-di-*terc*-butil-4-metilpiridina para dar o composto final.

Como indicado na Figura 13, é apresentado um esquema para preparação de um fosfato cíclico no qual X^1 e X^3 conjuntamente são $-O-PO(OH)-NH-$. Utilizando como substâncias de partida os intermediários **35-43** preparados acima, estes são tratados com tris(1,2,4,-triazolo)fosfato seguido de lavagem com HCl a 2%, que resulta em ciclização intramolecular.

Como indicado na Figura 14, é apresentado um esquema para preparação de um composto cíclico no qual o grupo fosfato não faz parte do anel; especificamente, X^2 e X^3 conjuntamente são $-N(H)-C(O)-N(R^1)-$. Utilizando como substâncias de partida os intermediários **50-54** preparados acima, estes são tratados com $COCl_2$ anidro, o que insere um carbonilo entre as amins ligadas aos carbonos C2 e C3 durante a ciclização. Os grupos protectores benzilo são removidos do fosfato utilizando paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 (como descrito acima).

Outra classe de compostos que podem ser utilizados como agonistas ou antagonistas dos receptores de LPA são os fosfatos de ácidos gordos ou os fosfatos de cadeia linear. Como indicado na Figura 8, o n-alcanol anidro e o 1H-tetrazole podem ser dissolvidos em cloreto de metileno anidro. Pode

adicionar-se uma solução de fosforamidito de dibenzil-N,N-diisopropilo em cloreto de metileno anidro. Subsequentemente, pode adicionar-se gota a gota ácido peracético em cloreto de metileno anidro para dar os fosfatos de ácidos gordos protegidos por benzilo **101-105**. Os grupos protectores benzilo são removidos após tratamento em metanol anidro com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ (como descrito acima) para dar os fosfatos de ácidos gordos **106-110**.

Como alternativa para a preparação de fosfatos de ácidos gordos, também podem preparar-se tiofosfatos e amidofosfatos. Como indicado na Figura 9, por exemplo, podem dissolver-se n-mercaptoalcanos e 1*H*-tetrazole em cloreto de metileno anidro. Pode adicionar-se uma solução de fosforamidito de dibenzil-N,N-diisopropilo em cloreto de metileno anidro. Subsequentemente, pode adicionar-se gota a gota ácido peracético em cloreto de metileno anidro para dar os tiofosfatos de ácidos gordos protegidos por benzilo. Os grupos protectores benzilo são removidos após tratamento em metanol anidro com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ (como descrito acima), para dar os tiofosfatos de ácidos gordos. Como indicado na Figura 10, por exemplo, pode dissolver-se uma n-alquilamina e 1*H*-tetrazole em cloreto de metileno anidro. Pode adicionar-se uma solução de fosforamidito de dibenzil-N,N-diisopropilo em cloreto de metileno anidro. Subsequentemente, pode adicionar-se gota a gota ácido peracético em cloreto de metileno anidro para dar os amidofosfatos de ácidos gordos protegidos por benzilo. Os grupos protectores benzilo são removidos após tratamento em metanol anidro com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H₂ (como descrito acima) para dar os amidofosfatos de ácidos gordos.

Cada um dos esquemas de reacção acima identificados pode ser ainda modificado atacando um grupo amino primário como indicado nas Figuras 17-20. O intermediário é preparado, por exemplo, a partir dos compostos **50-54** que foram tratados com TFA para remover o grupo protector t-Boc, dando a amina primária na posição C2 e deixando ao mesmo tempo o fosfato protegido.

Na Figura 17, o composto intermediário que possui uma amina primária na posição C2 é atacado com um halogeneto ácido (por exemplo, R^1COCl), que converte a amina primária numa amida ($-N(H)-C(O)-R^1$). O fosfato protegido por benzilo pode ser então ser desprotegido utilizando o tratamento com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 (como descrito acima).

Na Figura 18, o composto intermediário que possui uma amina primária na posição C2 é atacado com N-acetilimidazolina em $POCl_3$, que converte a amina primária numa amina secundária ($-N(H)-imidazole$). Também se podem utilizar imidazolinas substituídas. O fosfato protegido por benzilo pode ser então desprotegido utilizando o tratamento com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 (como descrito acima).

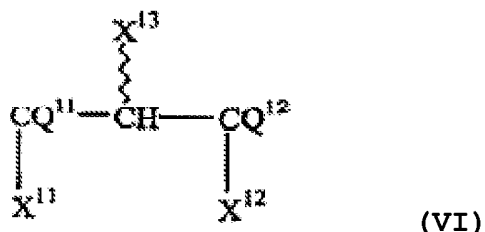
Na Figura 19, o composto intermediário que possui uma amina primária na posição C2 é atacado com $R^1OC(O)Cl$, que converte a amina primária num carbamato ($-N(H)-C(O)-O-R^1$). O fosfato protegido por benzilo pode ser então desprotegido utilizando o tratamento com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob atmosfera de H_2 (como descrito acima).

Na Figura 20, o composto intermediário que possui uma amina primária na posição C2 é atacado com R^1NCO ou com R^1NCS , que convertem a amina primária numa uramida ($-N(H)-C(O)-N(H)-R^1$) ou numa tiouramida ($-N(H)-C(S)-N(H)-R^1$). O fosfato protegido por benzilo pode ser então desprotegido utilizando o tratamento com paládio a 10% em carvão activado (Pd/C) sob uma atmosfera de H_2 (como descrito acima).

Portanto, os compostos não cíclicos da presente invenção podem ser preparados fazendo reagir $(Y^2O)_2PO-Z^{11}-Z^{13}$ ou $(Y^2O)_2PO-Z^{12}-P(OH)O-Z^{11}-Z^{13}$, nos quais Z^{11} é $-O(CH_2)_m-$ em que m é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$; Z^{12} é $-O(CH_2)_n-$ em que n é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$; Z^{13} é H ou um primeiro grupo de saída ou $-Z^{11}-Z^{13}$ formam juntos o primeiro grupo de saída e Y^2 é H ou um grupo protector; com um composto intermediário de acordo com a fórmula (VI), seguido de uma etapa de desprotecção, se necessária, ambas realizadas em condições eficazes para dar um composto de acordo com a

fórmula (I) na qual X^1 é $(HO)_2PO-Z^1-$ ou $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$ em que Z^1 e Z^2 são definidos como acima.

O composto intermediário de fórmula (VI) tem a seguinte estrutura:



na qual

X^{12} e X^{13} são ambos $R^{11}-NR^{12}-A-$ sendo cada um igual ou diferente;

X^{11} é OH, NH_2 , SH ou um segundo grupo de saída;

A é uma ligação directa, $(CH_2)_k$ em que k é um número inteiro de 0 a 30, ou 0;

Q^{11} e Q^{12} são independentemente H_2 ou $=O$;

R^{11} é, independentemente, hidrogénio; um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada; um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel seleccionadas do grupo de alquilos, alcoxis, ácidos e álcoois; um acilo incluindo um anel aromático; um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada; $-C(O)-O-R^{16}$; e

R^{12} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

R^{16} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono-, di- ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo C1

a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

seguido de uma etapa de desprotecção, se necessário, em que as ambas as referidas etapas de reacção e de desprotecção são efectuadas em condições eficazes para formar um composto de acordo com a fórmula (I) na qual X^1 é $(HO)_2PO-Z^1-$ ou $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$.

Tendo preparado os agonistas e antagonistas dos receptores de LPA da presente invenção, estes compostos podem ser utilizados para preparar composições farmacêuticas adequadas para o tratamento de doentes como descrito a seguir neste documento. Por conseguinte, um outro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que inclui um veículo farmacêuticamente aceitável e um composto da presente invenção. A composição farmacêutica também pode incluir excipientes ou estabilizadores adequados e pode ter a forma sólida ou líquida como comprimidos, cápsulas, pós, soluções, suspensões ou emulsões. A composição contém, tipicamente, cerca de 0,01 a 99 por cento, de preferência de cerca de 20 a 75 por cento de composto(s) activo(s), juntamente com o veículo, excipiente, estabilizador, etc.

As formas unitárias de dosagem sólidas podem ser do tipo convencional. A forma sólida pode ser uma cápsula, por exemplo do tipo normal de gelatina contendo os compostos da presente invenção e um veículo, por exemplo lubrificantes e aglutinantes inertes como lactose, sacarose ou amido de milho. Numa outra concretização, estes compostos são produzidos sob a forma de comprimidos com bases convencionais de comprimidos como lactose, sacarose ou amido de milho em associação com aglutinantes como goma arábica, amido de milho ou gelatina, agentes desintegrantes como amido de milho, amido de batata ou ácido algínico e um lubrificante como o ácido esteárico ou o estearato de magnésio.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados em formas de dosagem injectáveis ou de aplicação tópica, através da dissolução ou suspensão destes materiais num diluente fisiologicamente aceitável com um veículo farmacêutico. Estes veículos incluem líquidos estéreis como

água e óleos, com ou sem adição de um tensioactivo e outro veículo farmacêutica e fisiologicamente aceitável, incluindo adjuvantes, excipientes ou estabilizadores. Exemplos de óleos são os derivados do petróleo, os de origem animal, vegetal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja ou óleo mineral. Em geral, os veículos líquidos preferidos, especialmente para soluções injectáveis, são a água, solução salina, solução aquosa de dextrose e outro açúcar relacionado e glicóis, como por exemplo propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para utilização sob a forma de aerossóis, os compostos da presente invenção em solução ou em suspensão podem ser acondicionados em recipientes pressurizados juntamente com os propulsores adequados, por exemplo propulsores de hidrocarbonetos como propano, butano ou isobutano com adjuvantes convencionais. Os materiais da presente invenção também podem ser administrados numa forma não pressurizada, como por exemplo, num nebulizador ou num atomizador.

Consoante o tratamento a ser efectuado, os compostos da presente invenção podem ser administrados por via oral, tópica, transdérmica, parentérica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por instilação nasal, por instilação intracavitária ou intravesical, por via intra-ocular, intra-arterial, no interior da lesão ou por aplicação em membranas mucosas como as do nariz, garganta e brônquios.

As composições no âmbito da presente invenção incluem todas as composições nas quais o composto da presente invenção é incluído numa quantidade eficaz para realizar o fim pretendido. Embora as necessidades individuais variem, a determinação dos intervalos óptimos das quantidades eficazes de cada componente está no âmbito da competência na especialidade. As posologias típicas incluem cerca de 0,01 a 100 mg/kg do peso corporal. As posologias preferidas incluem cerca de 0,1 a cerca de 100 mg/kg do peso corporal. As posologias mais preferidas incluem cerca de 1 a cerca de 100 mg/kg do peso corporal. O regime de tratamento para a administração dos compostos da presente invenção também pode ser determinado facilmente pelas pessoas competentes na matéria.

Verificou-se que certos compostos da presente invenção são úteis como agonistas dos receptores de LPA enquanto que outros compostos da presente invenção são úteis como antagonistas dos receptores de LPA. Devido às diferenças nas suas actividades, os diversos compostos têm utilizações diferentes. O sujeito animal preferido da presente invenção é o mamífero, isto é, um indivíduo pertencente à classe dos Mamíferos. A invenção é especialmente útil para o tratamento de sujeitos humanos.

Um aspecto da presente invenção refere-se a um método de modulação da actividade dos receptores de LPA *in vitro* que inclui proporcionar um composto da presente invenção com actividade como agonista dos receptores de LPA ou como antagonista dos receptores de LPA e contactar um receptor de LPA *in vitro* com o composto em condições eficazes para modular a actividade do receptor de LPA.

O receptor de LPA está presente numa célula que expressa normalmente o receptor de LPA ou que, em vez disso, foi transformada para expressar um receptor de LPA específico. Os receptores de LPA adequados incluem, sem limitação, os receptores EDG-2, EDG-4, EDG-7 e PSP-24. Os tecidos que contêm células que expressam normalmente estes receptores estão indicados na Tabela 1 acima. Ao efectuar-se o contacto de uma célula com o agonista do receptor de LPA ou com o antagonista do receptor de LPA da presente invenção, o contacto pode ser efectuado enquanto a célula está *in vitro*.

Para expressar de forma heteróloga estes receptores em células hospedeiras que normalmente não os expressam, pode introduzir-se, em orientação de sentido directo, uma molécula de ácido nucleico que codifique um ou mais destes receptores num vector de expressão que inclui regiões reguladoras apropriadas da tradução e transcrição (isto é, promotores e sinais de terminação da transcrição) e depois as células hospedeiras podem ser transformadas com o vector de expressão. O vector de expressão pode integrar-se no genoma celular ou estar simplesmente presente como material nuclear extracromossómico. A expressão pode ser constitutiva ou indutível, embora a expressão constitutiva seja adequada para a maior parte dos fins.

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos do EDG-2 são conhecidas e são comunicadas em An *et al.* (1997b) e em Genbank N.º de acesso U80811, que aqui se incorporam como referência. Uma molécula de ácido nucleico que codifica o EDG-2 tem uma sequência de nucleótidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 1, indicada a seguir:

```

atggetgoca  totctacttc  catccctgta  atttcacagc  cccagttcac  agcoatgaat    60
gaaccacagt  gcttctacaa  cgagtcacat  gccttctttt  ataaccgaag  tggaaagcat   120
cttgccacag  aatggaacac  agtcagcaag  ctggtgatgg  gacttggaat  cactgtttgt   180
atcttcatca  tgttggccaa  cctattggtc  atggtggcaa  tctatgtcaa  ccgcgccttc   240
cattttccta  tttattacct  aatggetaat  ctggctgctg  cagacttcct  tgcctgggttg  300
gcctacttot  atctcatggt  caacacagga  cccaatactc  ggagactgac  tgttagcaca   360
tggctcctgc  gtcagggcct  cattgaacac  agcctgacgg  catctgtggo  caactacttg   420
gctattgcaa  tcgagaggca  cattaagggt  ttccgcctgc  agctccacac  acggatgagc   480
aaccggcggg  gcttgggtgg  cattgtggtc  atctggacta  tggccatcgt  tatgggtgct   540
atacccagtg  tgggctggaa  ctgtatctgt  gatattgaaa  attgttccaa  catggcaccc   600
ctctacagtg  actcttactt  agtctcttgg  gccatttcca  acttgggtgac  ctttgtggta   660
atggtgggtc  totatgotca  catctttggc  tatgttcgcc  agaggactat  gagaatgtct   720
cgccatagtt  ctggaccccg  gcggaatcgg  gataccatga  tgagtctctc  gaagactgtg   780
gtcattgtgc  ttggggcctt  tatcatctgc  tggactcctg  gattgggttt  gttacttcta   840
gacgtgtgct  gtccacagtg  cgacgtgctg  gcctatgaga  aattcttctc  tctccttgct   900
gaattcaact  ctgcoatgaa  ccccatcatt  tactctacc  ggcacaaaga  aatgagcgcc   960
acctttaggc  agatcctctg  ctgccagcgc  agtgagaacc  ccacgggccc  caccagaaagc 1020
tcagacggct  cggcttcttc  cctcaaacac  accatcttgg  ctggagtcca  cagcaatgac 1080
cactctgtgg  tttag                                     1095

```

O receptor EDG-2 codificado tem uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 2, indicada a seguir:

```

MAAISTSIPV  ISQPQFTAMN  EPQCFYNESI  AFFYNRSGKH  LATEWNTVSK  LVMSLGITVC    60
IFIMLANLLV  MVAIVNRRF  HFPIIYLMAN  LAAADFFAGL  AYFYLMFNTG  PNTRRLTVST   120
WLLRQGLIDT  SITASVANLL  ALAIERHITV  FRMQLHTMS  NRRVVVVIVV  IWTMAIVMGA   180
IPSVGWNCIC  DIENCSNMAP  LYSDSYLVFN  AIFNLVTFVV  NVVLYAHIFG  YVRQRTMRMS   240
RHSSGPRRNR  DTMNSLLKTV  VIVLGAFLIC  WTPGLVLLLL  DVCCPQCDVL  AVERFFLLLA   300
BFNSAMNPDI  YSYRDKEMSA  TFRQILCCQR  SENFTGPTES  SDRSASSLNH  TILAGVHSND   360
HSVY                                     364

```

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos do EDG-4 são conhecidas e são comunicadas em An *et al.* (1998b) e em Genbank, N.º de acesso NM_004720, que se incorporam como referência. Uma molécula de ácido nucleico que codifica o EDG-4 tem uma sequência de nucleótidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 3, indicada a seguir:

```

atggtcatca  tgggcccagt  ctactacaac  gagaccatcg  gcttcttcta  taacaacagt    60
ggcaaaagag  tcagctccca  ctggggggcc  aaggatgtgg  tcgtgggtgg  actggggctg   120
acgctcagcg  tgcgtggtgt  gctgaccaat  ctgctgggtc  tagcagccat  cgcctccaac   180
cgccgcttcc  accagcccat  ctaactacct  ctgggcaact  tggccggcgg  tgacctcttc   240
gcgggcggtg  cctacctctt  cctcatgttc  cacaactggt  cccgcacagc  ccgactttca   300
cttgaggggt  ggttctctgg  gcaggggctg  ctggacacaa  gcctcactgc  gtgggtggcc   360

```

```

acactgctgg ccactgcggt ggagcggcac cgcagtggtg tggcctgca gctgcacagc 420
cgctgcccc gtggcgcggt ggtcatgctc attgtggggc tgtgggtggc tgcctggggc 480
ctggggctgc tgcctgccc ctctggcac tgcctctgtg ccctggacgc ctgctcagc 540
atggcaccac tgcctcagcg ctctctattg gccgtctggg ctctgtcgag cctgcttgtc 600
ttctctgctca tgggtggctgt gtacacccgc attttctctc acgtgcggcg gcgagtgcag 660
cgcatggcag agcatgtcag ctgccacccc cgtaccgag agaccaogct cagcctggtc 720
aagactgttg tcatcatcct gggggcgctt gtgggtctgt ggacaccagg ccagggtggt 780
ctgctcctgg atgggttagg ctgtgagtc tgcaatgtcc tggctgtaga aaagtacttc 840
ctactgttgg ccgaggccaa ctcactggtc aatgctgtgt tgtactcttg ccgagatgct 900
gagatgcggc gcaccttcgc ccgccttctc tgcctggcgt gctcgcgca gtccaccgc 960
gagtcctgtc actatacctc ctctgccag ggaggtgcca gcactcgcat catgcttccc 1020
gagaacgggc acccactgat ggactccacc ctttag 1056

```

O receptor EDG-4 codificado tem uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 4, indicada a seguir:

```

MVIMGQCYYN ETIGFFYNNS GKELSSHWRP KDVVVALGL TVSVLVLLTN LLVIAAIASN 60
RRFHQPIYYL LGNLAAADLF AGVAYLFLMF HTGPRTARLS LEGWFLRQGL LDTSLTASVA 120
TLLAIIVERH RSVMAVQLHS RLPRGRVVML IVGVVVAALG LGLLPAHSWH CLCALDRCSR 180
MAPLLSRSYL AVNALSSLLV FLIMVAVYTR IFFYVRRVQ RMAEHVSCHP RYRETTLSLV 240
KTVVILSAF VVCWTPGQVV LLDGLGCS CNVLAVEKYF LLLAEANSLV NAAVYSCRDA 300
EMERTFRELL CCACLRQSTR ESVRYTSSAQ GGASTRIMLP ENGHPMDST L 361

```

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos do EDG-7 são conhecidas e são comunicadas em Bando *et al.* (1999) e em Genbank, N.º de acesso NM_012152, que se incorporam aqui como referência. Uma molécula de ácido nucleico que codifica o EDG-7 tem uma sequência de nucleótidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 5, indicada a seguir:

```

atgaatgagt gtcactatga caagcncatg gaattttttt ataataggag caacactgat 60
actgtcgatg actggacagg aacaaagctt gtgattgttt tgtgtgttgg gacgtttttc 120
tgcctgttta ttttttttct taattctctg gtcctcggcg cagtgcacaa aaacagaaaa 180
tttcaatttc ccttctacta cctgttggct aatttagctg ctgccgattt ctgcctgga 240
attgcctatg tattcctgat gtttaacaca ggcccagttt caaaaacttt gactgtcaac 300
cgctggtttc tccgtcaggg gcttctggac agtagcttga ctgcttcctt caccacttg 360
ctggttatcg ccgtggagag gcacatgtca atcatgagga tgcgggtcca tagcaacctg 420
accaaaaaga gggtagact gotcattttg ctgtctggg ccctcgccat ttttatggg 480
gaggtcccca caactggctg gaattgcctc tgcaacatct ctgcctgctc ttcctgggc 540
cccatttaca gcaggagtta ccttgttttc tggacagtgt ccaacctcat ggccttctc 600
atcatggttg tgggtgacct gcggatctac gtgtacgtca agaggaaaao caacgtcttg 660
tctcgcata caagtgggtc catcagccgc cggaggacac ccatgaagct aatgaagag 720
gtgatgactg ccttaggggc gtttgtggta tgcctggacc cgggcctggg ggttctgtc 780
ctcgaaggcc tgaactgcag gcagtgtggc gtgcagcatg tgaagggtg gttcctgctg 840
ctggcgctgc tcaactcgt cgtgaacccc atcatctact cctacaagga caggacatg 900
tatggcacca tgaagaagat gatctgctgc ttctctcagg agaaccaga gaggcgtccc 960
tctgcctcc cctccacagt cctcagcagg agtyacacag gcagccagta catagaggat 1020
agtattagcc aaggtgcagt ctgcataaa agcacttctt aa 1062

```

O receptor EDG-7 codificado tem uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 6, indicada a seguir:

MNECHYDKHM	DDFYNRSTND	TVDDWTGTKL	VIVLCVGTFF	CLPIFFSNLS	VIAAVIKNRK	60
FHFPPFYLLA	NLAAADFFAG	IAYVFLMENT	GEVSKTLTVN	RWFLRQGLLD	SSLTASLTNL	120
LVIIVERHMS	IMMRVHSNL	TKKRVTLIL	LVWAIIFMG	AVPTLGWNCL	CNISACSSLA	180
PIYSRSYLVF	WTVSNLMAFL	IMVVYLRIY	VYVRKTNVL	SENTGGSISR	RRTPMKLMKT	240
VMIVLGAFFV	CWTGGLVLL	LDGLNCRQCG	VQHVKNWFL	LALLNSVWNP	IIYSYKDEDM	300
YGTMKRMICC	FSQENPERRP	SRIPSTVLSR	SDTGSQYIED	SISQGAVCNK	STS	353

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos do PSP-24 são conhecidas e são comunicadas em Kawasawa *et al.* (2000) e em Genbank, N.º de acesso AB030566, que aqui se incorporam referência. Uma molécula de ácido nucleico que codifica o PSP-24 tem uma sequência de nucleótidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 7, indicada a seguir:

atggtctctct	eggcagtggt	gactgcgttc	cataccggga	catccaacac	aacatttgtc	60
gtgtatgaaa	acaactacat	gaatattaca	ctccctccac	cattccagca	tcctgacctc	120
agtcatttgc	ttagatatag	ttttgaaaac	atggctccca	ctggtttgag	ttccttgacc	180
gtgaatagta	cagctgtgcc	cacaacacca	gcagcattta	agagocataa	cttgccctct	240
cagatcaccc	ttctgtctat	aatgatattc	attctgtttg	tgtctttctt	tgggaacttg	300
gttgtttgcc	tcattggtta	ccaaaaagct	gccatgaggt	ctgcaattaa	catcctcctt	360
gccagcctag	cttttgcaga	catgttgctt	gcagtgttga	acatgccctt	tggcctggta	420
actattctta	ctaacogaty	gatttttggg	aaattctctt	gtagggtatc	tgctatgttt	480
ttctggttat	ttgtgataga	aggagtagec	atcctgtctc	tcattagcat	agatagggtc	540
cttattatag	tcagaggcca	ggataagota	aaccatata	gagctaagggt	totgatttgc	600
gtttcttggg	caacttcctt	ttgtgtagct	tttctttag	ccgtaggaaa	cccagacctg	660
cagatacctt	ccagagctcc	ccagtgtgtg	tttgggtaca	caaccaatcc	aggctaccag	720
gcttatgtga	ttttgatttc	tctcattctt	ttcttcatac	ccttctgggt	aatactgtac	780
tcatttatgg	gcatactcaa	caacottcgg	cacaatgcct	tgaggatcca	tagctaccct	840
gaaggtatat	gcctcagcca	ggccagcaaa	ctgggtctca	tgagtctgca	gagaccttcc	900
cagatgagca	ttgacatggg	ctttaaaaca	cgtgccttca	ccactatctt	gattctcttt	960
gctgcttcca	ttgtctgtcg	ggccccattc	accacttaca	gccttgttgc	aacattcagt	1020
aagcaccttt	actatcagca	caactttttt	gagattagca	cctggctact	gtggctctgc	1080
taactcaagt	ctgcattgaa	tcctgtgata	tactactgga	gyattaagaa	attcctatgat	1140
gcttgcctgg	acatgatgcc	taagtctctc	aagtttttgc	cgaagctccc	tggtcacaca	1200
aagcgacgga	taactcctag	tgctgtctat	gtgtgtgggg	aacatcggac	gggtggtgtga	1260

O receptor PSP-24 codificado tem uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ. ID. N.º 8, indicada a seguir:

MVPSAVLTAF	HIGTSNTTFV	VIENTYMNIT	LPPPFQHPDL	SPLLRYSFET	MAPTGLSSLT	60
VNSTAVPTTF	AAPKSLNLPL	QITLSAIMIF	ILFVSFLGNI	VVCLMVYQKA	AMRSAINILL	120
ASLAFADMLL	AVLNMPFALV	TILTTRWIFG	KFPCRVSAMF	FWLFVIEGVA	ILLIISIDRF	180
LLIVQRQDKL	NPYRAKVLIA	VSWATSEFVA	FFLAVGNPDL	QIPSRAPQCV	EGYTINPGYQ	240
AYVILESLIS	FFIPFLVILY	SFMGIILNTR	HNALRIESYP	EGICLSQASK	LGLMSLQRPF	300
QMSIDMGPKT	RAFTTILILF	AVFIVCWAPP	TTYSLVATFS	KHFYYQHNEF	EISTWLLWLC	360
YLKSALNPLI	YYWRIKKFHD	ACLDMMFKSF	KFLPQLPGHT	KRRIRPSAVY	VCGEHRTVV	419

Os agonistas dos receptores de LPA induzirão, caracteristicamente, actividade do tipo do LPA a partir de um receptor de LPA, que pode ser medida quimicamente, por exemplo, correntes de Ca^{2+} ou de Cl^- em oócitos, ou examinando as alterações da morfologia, mobilidade, proliferação, etc.,

das células. Pelo contrário, os antagonistas dos receptores do LPA bloquearão caracteristicamente a actividade do tipo do LPA a partir de um receptor de LPA. Isto, também, pode ser medido quimicamente, por exemplo, correntes de Ca^{2+} ou de Cl^- em oócitos, ou examinando as alterações da morfologia, mobilidade, proliferação, etc., das células.

Como se salientou acima, o LPA é uma molécula de sinalização que está envolvida em várias vias celulares diferentes que envolvem a sinalização através dos receptores do LPA, incluindo os receptores do LPA acima descritos. Portanto, prevê-se que os compostos da presente invenção modulem os efeitos do LPA sobre o comportamento celular, actuando como antagonistas dos receptores do LPA ou como agonistas dos receptores do LPA.

Um aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um composto da presente invenção para tratamento do cancro e à administração de uma quantidade eficaz do composto a um doente de maneira eficaz para tratar o cancro. Os tipos de cancro que podem ser tratados com os compostos da presente invenção incluem os cancros caracterizados por células cancerosas cujo comportamento pode ser atribuído, pelo menos em parte, à actividade mediada pelo LPA. Estes tipos de cancro são caracterizados tipicamente por células cancerosas que expressam um ou mais tipos de receptores do LPA. Exemplos de formas de cancro incluem, sem limitação, o cancro da próstata e o cancro do ovário.

Os compostos da presente invenção que são particularmente úteis para tratamento do cancro são os antagonistas dos receptores do LPA.

Quando se administram os compostos da presente invenção, eles podem ser administrados por via sistémica ou, alternativamente, podem ser administrados directamente num local específico onde as células do cancro estão presentes. Portanto, a administração pode ser realizada de qualquer maneira que seja eficaz para entregar o composto a células cancerosas. Sem se estar restringido à teoria, crê-se que os antagonistas dos receptores do LPA, após ligação aos receptores do LPA, irão inibir a proliferação ou a metástase

das células cancerosas ou de outro modo destruir essas células cancerosas. Tal como se indica no Exemplo 12 *infra*, vários compostos antagonistas do LPA da presente invenção foram citotóxicos para as linhas celulares do cancro da próstata que expressam um ou mais receptores do LPA do tipo acima descrito.

Quando os compostos antagonistas do LPA ou as composições farmacêuticas da presente invenção são administrados para tratar o cancro, a composição farmacêutica também pode conter, ou ser administrada juntamente com outros agentes terapêuticos ou regimes de tratamento presentemente conhecidos ou a virem a ser desenvolvidos para o tratamento de vários tipos de cancro.

A invasão cancerosa é um processo complexo de várias etapas no qual células individuais ou grupos de células se destacam do tumor primário e atingem a circulação sistémica ou os linfáticos para se disseminarem pelos diferentes órgãos (Liotta *et al.*, 1987). Durante este processo as células tumorais têm que ficar presas em capilares, extravasar e migrar para o estroma dos tecidos para produzirem focos secundários. Primeiro, as células tumorais têm que reconhecer sinais na célula endotelial que as prende quando estão na circulação. Segundo, as células tumorais têm que se ligar à glicoproteína laminina da membrana basal através dos receptores da laminina da superfície celular. Após ligação à membrana basal, as células tumorais segregam proteases para degradar a membrana basal. Após ligação e proteólise local, a terceira etapa da invasão é a migração das células tumorais. A motilidade celular desempenha um papel central na invasão e metástase das células tumorais. A relação entre a motilidade das células tumorais *in vitro* e o comportamento metastático em experiências em animais indicam uma correlação directa forte (Hoffman-Wellenhof *et al.*, 1995). É um facto bem documentado que os PLGF favorecem a proliferação e aumentam a capacidade invasiva das células cancerosas *in vitro*. Imamura e colaboradores estabeleceram que as células cancerosas necessitam de factores séricos para a sua invasão (Imamura *et al.*, 1991) e posteriormente identificaram o LPA como o componente sérico mais importante que é totalmente capaz de restabelecer a invasão de células tumorais em sistemas isentos de soro (Xu *et al.*, 1995a; Imamura *et al.*, 1993; Mukai *et al.*, 1993).

Demonstrou-se que os PLGFR são expressos em linhas celulares de cancro dos ovários, nomeadamente as células OCC1 e HEY. Análises por RT-PCR revelam especificamente a presença de receptores EDG-2 e EDG-7 nestas linhas celulares. Recentemente, Im *et al.* (2000) demonstraram que EDG-7 é expresso em linhas celulares do cancro da próstata, nomeadamente as células PC-3 e LNCaP. A análise por RT-PCR efectuada nas linhas celulares do cancro da próstata DU-145, PC-3 e LNCaP revelou que o EDG-2, EDG-4, EDG-5 e EDG-7 estão presentes nas três linhas celulares do cancro prostático, enquanto que o EDG-3 está presente nas linhas celulares LNCaP e DU-145 do cancro da próstata.

Como se indica nos exemplos, vários antagonistas dos receptores do LPA da presente invenção são capazes de atingir linhas celulares específicas do cancro da próstata e linhas celulares específicas do cancro do ovário. Portanto, os antagonistas do LPA da presente invenção proporcionam uma abordagem alternativa para o tratamento de cancros mediados pelo LPA, incluindo o cancro da próstata e o cancro do ovário.

Outro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de compostos da presente invenção para intensificação da proliferação celular. Esta utilização para intensificação da proliferação celular inclui as etapas de proporcionar um composto da presente invenção com actividade como agonista de um receptor de LPA e contactar o receptor de LPA numa célula com o composto de maneira eficaz para intensificar a proliferação da célula induzida pelo receptor do LPA.

Além das funções que o LPA desempenha na modulação da actividade das células cancerosas, existem fortes indicações que sugerem que o LPA também desempenha um papel fisiológico na cicatrização natural das feridas. Em locais com feridas, pensa-se que o LPA proveniente de plaquetas activadas é responsável, pelo menos em parte, pela estimulação da proliferação celular no local da lesão e inflamação, possivelmente em sincronização com outros factores derivados de plaquetas (Balazs *et al.*, 2000). Além disso, o LPA por si próprio estimula a agregação plaquetária, que por sua vez pode ser o factor que inicia um elemento de retro-regulação

positiva da resposta inicial de agregação (Schumacher *et al.*, 1979; Tokumura *et al.*, 1981; Gerrard *et al.*, 1979; Simon *et al.*, 1982).

Devido ao papel desempenhado pelo LPA na proliferação celular, os compostos que possuem uma actividade agonista dos receptores do LPA podem ser utilizados de maneira eficaz para promover a cicatrização de feridas.

O objectivo principal no tratamento de feridas é conseguir o encerramento da ferida. As feridas cutâneas abertas representam uma categoria importante de feridas e incluem queimaduras, úlceras neuropáticas, úlceras de decúbito, úlceras por estase venosa e úlceras diabéticas. As feridas cutâneas abertas cicatrizam habitualmente por um processo constituído por seis componentes principais: i) inflamação, ii) proliferação de fibroblastos, iii) proliferação de vasos sanguíneos, iv) síntese de tecido conjuntivo, v) epitelialização e vi) contracção da ferida. A cicatrização de feridas é prejudicada quando estes componentes, individualmente ou como um todo, não funcionam correctamente. Vários factores podem afectar a cicatrização das feridas, incluindo malnutrição, infecção, agentes farmacológicos (por exemplo, actinomicina e esteróides), diabetes e idade avançada (ver Hunt and e Goodson, 1988).

Demonstrou-se que os fosfolípidos são reguladores importantes da actividade celular, incluindo a mitogénese (Xu *et al.*, 1995b), apoptose, adesão celular e regulação da expressão génica. Especificamente, por exemplo, o LPA desencadeia efeitos semelhantes aos dos factores de crescimento sobre a proliferação celular (Moolenaar, 1996) e a migração celular (Imamura *et al.*, 1993). Também foi sugerido que o LPA desempenha um papel na cicatrização e regeneração de feridas (Tigyi e Miledi, 1992).

Em geral, os agentes que promovem um influxo mais rápido de fibroblastos e de células endoteliais e epiteliais as feridas devem aumentar a velocidade de cicatrização das feridas. Os compostos que são úteis para tratar a cicatrização de feridas podem ser identificados e testados em vários modelos *in vitro* e *in vivo*.

Os sistemas *in vitro* modelam componentes diferentes do processo de cicatrização das feridas, por exemplo o retorno de células a uma monocamada confluyente "ferida" de células de culturas de tecidos, tais como fibroblastos (Verrier *et al.*, 1992), células endoteliais (Miyata *et al.*, 1990) ou células epiteliais (Karthä *et al.*, 1992). Outros sistemas permitem a medição da migração e/ou proliferação das células endoteliais (Muller *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1988).

Os modelos *in vivo* para a cicatrização de feridas também são bem conhecidos na especialidade, incluindo modelos de epiderme de suínos ferida (Ohkawara *et al.*, 1977) ou lesões da mucosa oral induzidas por fármacos na bolsa jugal do *hamster* (Cherrick *et al.*, 1974).

Os compostos que são eficazes na cicatrização de feridas também podem ser administrados em associação, isto é, na composição farmacêutica ou administrados simultaneamente por vias diferentes, com um medicamento seleccionado do grupo que consiste num agente antibacteriano, um agente antiviral, um agente antifúngico, um agente antiparasitário, um agente anti-inflamatório, um agente analgésico, um agente antipruriginoso ou uma combinação dos mesmos.

Um modo preferido de administração para a cicatrização de feridas é a via tópica. Contudo, alternativa ou concomitantemente, o agente pode ser administrado pelas vias parentérica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou transdérmica. Como alternativa ou concomitantemente, a administração pode ser efectuada por via oral. A posologia administrada depende da idade, estado de saúde e do peso do receptor, do tipo de tratamento concomitante, se for o caso, frequência do tratamento e natureza do efeito desejado.

No caso das aplicações tópicas preferidas, especialmente para o tratamento de seres humanos e de animais com uma ferida, prefere-se administrar uma quantidade eficaz de um composto na área ferida, por exemplo, nas superfícies cutâneas. Esta quantidade varia geralmente entre cerca de 0,001 mg e cerca de 1 g por aplicação, dependendo da área a

ser tratada, da gravidade dos sintomas e da natureza do veículo tópico utilizado. Uma das preparações tópicas preferidas é uma pomada na qual se utilizam cerca de 0,01 a cerca de 50 mg de princípio activo por ml de base da pomada, como por exemplo o PEG-1000.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar, sem de maneira alguma limitarem, o âmbito da presente invenção tal como exposto nas reivindicações em anexo. Os compostos preparados de acordo com os Exemplos 3, 6, 7, 8 e 9 estão fora do âmbito das reivindicações.

Materiais e Métodos

Foi utilizado um aparelho para determinação dos pontos de fusão (p.f.) pelo método capilar de Thomas-Hoover para medir todos os pontos de fusão (p.f.), que não foram corrigidos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram registados num espectrómetro Bruker AX 300 (300, 75,5 MHz). Os valores dos desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) relativamente ao tetrametilsilano (TMS). Os picos são abreviados como se segue: s - singuleto, d - duplete, t - triplete, q - quarteto, sl - singuleto largo; m - multiplete.

Os espectros de ressonância magnética de protão, carbono 13 e fósforo 31 foram obtidos num espectrómetro Bruker AX 300. Os desvios químicos do protão e do carbono 13 são apresentados como partes por milhão (δ) relativamente ao tetrametilsilano (TMS). Os espectros de fósforo 31 são apresentados como partes por milhão (δ) relativamente ao trifenilfosfato 0,0485 M em acetona- d_6 com $\delta = 0$ ppm.

Os espectros de infravermelho (IV) foram registados num Sistema Perkin Elmer 200-FTIR.

Os espectros de massa (MS) foram registados num espectrómetro Bruker Esquire AG ou Bruker Esquire LC/MS por infusão directa utilizando uma interface por pulverização

electrostática (*Electrospray Interface* - ESI) em modo positivo ou negativo. Os dados dos espectros foram consistentes com as estruturas atribuídas.

A análise elementar foi realizada pela Atlantic Microlabs, Inc. (Norcross, GA) e os valores obtidos estão dentro do intervalo de $\pm 0,4\%$ dos valores teóricos.

Utilizou-se sílica gel (Merck, 230-400 *mesh* ou 200-425 *mesh*, 60A°) para a cromatografia *flash* em coluna.

A TLC analítica foi realizada em lâminas para TLC revestidas com sílica gel 60 F 254 da Sigma-Aldrich com suportes de alumínio (espessura de 200 ou 250 μm).

Salvo indicação em contrário, todos os reagentes, solventes e meios cromatográficos foram adquiridos junto da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) ou Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) sem purificação ulterior. O tetra-hidrofurano (THF) foi seco por destilação a partir de sódio metálico com benzofenona como indicador. O cloreto de metileno anidro (CH_2Cl_2) foi destilado a partir do hidreto de cálcio (CaH_2). Todos os monoglicéridos eram da Nu-Check-Prep (Minneapolis, MN). A *t*-Boc-serina foi adquirida da Fluka.

Todos os lípidos foram adquiridos a Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). A albumina de soro bovino sem ácidos gordos (BSA). Antes da utilização, o LPA foi complexado a uma razão molar de 1:1 com BSA 1 mM dissolvido em solução salina equilibrada de Hank sem Ca^{2+} , contendo EGTA 1 mM. Alíquotas de todos os outros lípidos foram dissolvidas em MeOH e misturadas com LPA antes da aplicação ou conforme indicado.

O reagente de transfecção, Cytofectene, era da Bio-Rad (Hercules, CA). O Fura-2 AM era da Molecular Probes (Eugene, OR).

Os meios de cultura, o soro bovino fetal (FBS) e o G418 foram adquiridos a Cellgro (Herndon, VA).

As células RH7777, que expressam de forma estável o Edg-4 humano, foram amavelmente cedidas pelo Dr. Kevin Lynch (University of Virginia, Charlottesville, VA). Os ADNc marcados com *Flag* que codificam Edg-4 e Edg-7 humanos, inseridos no plasmídeo de expressão pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA), foram generosamente oferecidos pelo Dr. Junken Aoki (Universidade de Tóquio, Tóquio, Japão). As células RH7777 e NIH3T3 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA). As células HEY foram fornecidas pela Dra. Lisa Jennings (University of Tennessee, Memphis). Todas as linhas celulares foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo FBS a 10% e glutamina 2 mM. Os oócitos foram obtidos de rãs adultas *Xenopus laevis*, como descrito anteriormente (Tigyi et al., 1999).

Transfecção estável

As células RH7777 foram transfectadas com as construções de ADNc codificantes de Edg-2, Edg-4 ou Edg-7 humanos, tendo depois sido subclonadas no vector de expressão pCDNA3 utilizando o reagente de transfecção Cytofectene, de acordo com o protocolo do fabricante. As células transfectadas foram seleccionadas em DMEM contendo FBS a 10% e 1 mg/ml de geneticina. As células resistentes foram recolhidas e subclonadas por diluição limitante. Os clones resultantes foram depois rastreados utilizando ensaios funcionais e análise por RT-PCR. Os dados são representativos de três clones individuais.

Transfecção transitória

As células RH7777 foram plaqueadas em lamelas de vidro revestidas com polilisina (Bellco, Vineland, NJ) um dia antes da transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas durante a noite (16-18 h) com 1 µg de ADN plasmídico misturado com 6 µl de Cytofectene. As células foram depois lavadas duas vezes com DMEM e cultivadas em DMEM contendo FBS a 10%. No dia seguinte, as células foram lavadas com DMEM e o soro foi retirado durante um mínimo de 2 horas antes da monitorização do Ca^{2+} intracelular.

Medição do Ca^{2+} intracelular e análise de dados

As alterações do Ca^{2+} intracelular foram monitorizadas utilizando o indicador fluorescente de Ca^{2+} , Fura-2 AM, como descrito anteriormente (Tigyi et al., 1999). Os pontos das medições de Ca^{2+} intracelular representam a área total dos picos dos transientes de Ca^{2+} produzidos, determinados pelo software FLWinLab (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Os pontos representam a média de pelo menos 3 medições \pm desvio padrão. A significância dos pontos foi determinada utilizando o teste t de Student e os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

Registos electrofisiológicos em oócitos de *Xenopus*

As correntes oscilatórias de Cl^- desencadeadas pelo LPA foram registadas utilizando um sistema de potencial imposto ("voltage-clamp") de dois eléctrodos, como descrito anteriormente (Tigyi et al., 1999).

Análise por RT-PCR do ARNm de Edg e PSP24

A identificação do ARNm dos receptores Edg e PSP24 foi realizada por RT-PCR como descrito anteriormente (Tigyi et al., 1999), utilizando as seguintes sequências oligonucleotídicas:

EDG-1

Iniciador directo 5'-₈₁TCATCGTCCGGCATTACAATA-3' (SEQ. ID N.º 9);

Iniciador inverso 5'-GAGTGAGCTTGTAGGTGGTG₃₅₁-3' (SEQ. ID N.º 10);

EDG-2

Iniciador directo 5'-₆₅AGATCTGACCAGCCGACTCAC-3' (SEQ. ID N.º 11);

Iniciador inverso 5'-GTTGGCCATCAAGTAATAAATA₄₂₂-3' (SEQ. ID N.º 12);

EDG-3

Iniciador directo 5'-₁₃₇CTTGATCATCTGCAGCTTCATC-3' (SEQ. ID N.º 13);

Iniciador inverso 5'-TGCTGATGCAGAAGGCAATGTA₅₉₇-3' (SEQ. ID N.º 14);

EDG-4

Iniciador directo 5'-₆₃₄CTGCTCAGCCGCTCCTATTTG-3' (SEQ. ID N.º 15);

Iniciador inverso 5'-AGGAGCACCCACAAGTCATCAG₁₁₈₅-3' (SEQ. ID N.º 16);

EDG-5

Iniciador directo 5'-₁₁ATGGGCAGCTTGTACTCGGAG-3' (SEQ. ID N.º 17);
Iniciador inverso 5'-CAGCCAGCAGACGATAAAGAC₇₂₀-3' (SEQ. ID N.º 18);

EDG-6

Iniciador directo 5'-₂₈₀TGAACATCACGCTGAGTGACCT-3' (SEQ. ID N.º 19);
Iniciador inverso 5'-GATCATCAGCACCGTCTTCAGC₇₉₀-3' (SEQ. ID N.º 20);

EDG-7

Iniciador directo 5'-₉₁AGCAACACTGATACTGTTCGATG-3' (SEQ. ID N.º 21);
Iniciador inverso 5'-GCATCCTCATGATTGACATGTG₄₄₆-3' (SEQ. ID N.º 22);

EDG-8

Iniciador directo 5'-₈₈ATCTGTGCGCTCTATGCAAGGA-3' (SEQ. ID N.º 23);
Iniciador inverso 5'-GGTGTAGATGATAGGATTCAGCA₁₁₆₁-3' (SEQ. ID N.º 24);

PSP24

Iniciador directo 5'-₃₂₀CTGCATCATCGTGTACCAGAG-3' (SEQ. ID N.º 25), e
Iniciador inverso 5'-ACGAACTCTATGCAGGCCTCGC₁₁₈₄-3' (SEQ. ID N.º 26).

Análise da proliferação celular

A proliferação das células NIH3T3 foi avaliada por contagem directa das células como descrito anteriormente (Tigyi *et al.*, 1999). As células NIH3T3 foram plaqueadas em placas de 24 poços com uma densidade de 10 000 células/poço, em DMEM contendo FBS a 10%. No dia seguinte as células foram lavadas e mantidas isentas de soro em DMEM durante 6 horas. Em seguida adicionaram-se os lípidos durante 24 horas. O número de células foi determinado efectuando a contagem num contador Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Incorporação de ³H-timidina

A incorporação de ³H-timidina em células RH7777 foi determinada como descrito anteriormente (Tigyi *et al.*, 1994).

Exemplo 1 - Síntese do composto intermediário 25, β-lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina

Um balão de três gargalos de 500 ml equipado com um termómetro de baixa temperatura e um funil de separação de 100 ml. Todo o material de vidro foi seco à chama e arrefecido até à temperatura ambiente em argon (Ar) antes da sua

utilização. No balão adicionou-se trifenilfosfina (Ph_3P) (10 g, 38 mmol, seca sobre P_2O_5 sob vácuo durante 72 horas) e THF recentemente destilado (190 ml). A solução foi arrefecida e agitada a -78°C (banho de neve carbónica-acetona) sob árgon. Com agitação vigorosa adicionou-se com uma seringa azodicarboxilato de dietilo (DEAD) recentemente destilado (6,2 ml, 39,9 mmol) durante um período de 30 minutos. Após a adição a mistura foi agitada até se obter uma pasta branca leitosa (cerca de 30 a 40 minutos). Uma solução de N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-serina (**24**) (7,79 g, 38 mmol, seca sobre P_2O_5 sob vácuo durante 72 horas) em THF recentemente destilado (75 ml) foi adicionada gota a gota à mistura reaccional durante um período de 45 minutos. A mistura foi agitada durante a noite a -78°C sob árgon e deixou-se aquecer até 0°C (o balão foi colocado num banho de gelo quando a temperatura atingiu -10°C). Decorridos 30 minutos (aproximadamente), o banho de gelo foi substituído por um banho-maria e a mistura reaccional foi agitada durante 2 horas e concentrada num evaporador rotativo até se obter um óleo amarelo pálido a 30°C . O óleo foi depois tratado com EtOAc/hexanos a 25% (100 ml), o sólido branco resultante foi removido por filtração e lavado com EtOAc/hexanos a 25% (2 x 70 ml), o filtrado combinado foi concentrado e o óleo residual foi sujeito a cromatografia *flash* em sílica gel com EtOAc/hexanos a 25% (500 ml) e a 30% (1500 ml), sucessivamente.

As fracções apropriadas foram combinadas para dar 3,4 g (47%) do composto **25** sob a forma de um sólido branco: p.f. 119°C – 121°C (Lit. $119,5$ – $120,5^\circ\text{C}$ dec.); ^1H RMN (CD_2Cl_2) δ 1,44 (s, 9H), 4,38–4,42 (m, 2H), 4,96–5,03 (q, $J_1=6,1$ Hz, $J_2=12,5$ Hz, 1H), 5,39 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CD_2Cl_2) δ 28,31, 60,01, 66,63, 81,50, 155,01, 169,94; IV (KBr) 3361, 2978, 1843, 1680, 1533, 1370, 1292 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_4$: C = 51,33; H = 6,94; N = 7,50. Detectado: C = 51,41; H = 7,01; N = 7,51.

Exemplo 2 – Síntese dos Compostos 26–34

O material de vidro utilizado foi seco à chama e arrefecido até à temperatura ambiente sob atmosfera de árgon. A reacção foi efectuada em atmosfera de árgon. O THF foi destilado antes da utilização.

**Composto 26: N-[1-(hidroximetil)-2-(nonilamino)-2-oxoetil]-
carbamato de terc-butilo**

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (300 mg, 1,60 mmol) a uma solução de decilamina (490 mg, 3,20 mmol) em THF (60 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante a noite sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo para dar 290 mg (52%) do composto **26** sob a forma de um pó ceroso branco: p.f. (50°C-52°C); ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,88 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,26 (s, 14H), 1,46 (s, 9H), 3,04 (sl, 1H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 4,06-4,15 (m, 2H), 5,53 (sl, 1H), 6,63 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3) 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; IV (KBr) 3282, 3098, 2929, 2856, 1666, 1547, 1467, 1369, 1300, 1248, 1179 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$: C = 62,76; H = 10,53; N = 8,13. Detectado: C = 63,00; H = 10,46; N = 7,98.

**Composto 27: N-[1-(hidroximetil)-2-oxo-2-(tetradecilamino)-
etil]carbamato de terc-butilo**

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (200 mg, 1,06 mmol) a uma solução de tetradecilamina (273 mg, 1,28 mmol) em THF (40 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante a noite sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo para dar 245 mg (57%) do composto **27** sob a forma de um pó branco: p.f. 59°C-62°C; ^1H RMN (CDCl_3) 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 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3) 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; IV (KBr)

3345, 2920, 2852, 1708, 1688, 1655, 1637, 1572, 1529, 1472, 1248, 1173 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$: C = 65,96; H = 11,07; N = 6,99. Detectado: C = 66,04; H = 11,17; N = 6,96.

Composto 28: N-[1-(hidroximetil)-2-(octadecilamino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (300 mg, 1,60 mmol) a uma solução de octadecilamina (516 mg, 2,08 mmol) em THF (60 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante a noite sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo para dar 300 mg (41%) do composto **28** sob a forma de um pó branco: p.f. 69°C - 71°C ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,88 (t, $J=6,3$ Hz, 3H), 1,25 (s, 30H), 1,46 (s, 9H), 3,03 (sl, 1H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 4,05-4,21 (m, 2H), 5,64 (sl, 1H), 6,62 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3) 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; IV (KBr) 3345, 2919, 2852, 1687, 1636, 1570, 1528, 1473, 1305, 1173 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 0,2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$: C = 67,86; H = 11,39; N = 5,91. Detectado: C = 67,59; H = 11,46; N = 6,1.

Composto 29: N-{1-(hidroximetil)-2-oxo-2-[4-(tetradeciloxi)-anilino]etil}carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (91 mg, 0,490 mmol) a uma solução de 4-(tetradeciloxi)anilina (150 mg, 0,490 mmol) em THF (40 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante 48 horas sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna (duas vezes) e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo para dar 110 mg (45%) do composto **29** sob a forma de um pó branco: p.f. 92°C - 94°C ; ^1H RMN (CDCl_3) 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, $J_1=4,9$ Hz, $J_2=7,2$ Hz, 1H), 3,92 (t, $J=6,5$ Hz, 2H), 4,23-4,26 (m, 2H), 5,65 (sl, 1H), 6,83-6,87 (m, $J_0=8,9$ Hz, 2H), 7,36-7,40 (m, $J_0=8,9$ Hz), 8,6 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3) 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; IV (KBr) 3304, 2920, 2852, 1658, 1514, 1472, 1238, 1174 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 0,05\text{CHCl}_3$: C = 67,56; H = 9,71; N = 5,62. Detectado: C = 67,80; H = 9,67; N = 5,60.

Composto 30: N-[1-(hidroximetil)-2-(4-(metoxianilino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (151 mg, 0,8 mmol) a uma solução de p-anisidina (100 mg, 0,8 mmol) em THF (20 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante a noite sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e foram cristalizadas a partir de CHCl_3 /hexanos para dar 135 mg (54%) do composto **30** sob a forma de um pó branco: p.f. 109°C - 111°C ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,48 (s, 9H), 3,68-3,73 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 4,24-4,27 (m, 2H), 5,68 (sl, 1H), 6,83-6,88 (m, $J_0=9$ Hz 2H), 7,37-7,42 (m, $J_0=9$ Hz, 2H), 8,61 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 28,29, 54,96, 55,47, 62,54, 81,00, 114,18, 121,78, 130,45, 156,64, 156,98, 169,59; IV (KBr) 3340, 2978, 1673, 1603, 1516, 1298, 1238, cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: C = 58,05; H = 7,15; N = 9,03. Detectado: C = 58,04; H = 7,17; N = 9,06.

Composto 31: N-{1-(hidroximetil)-2-oxo-2-[3-(tetradeciloxi)-anilino]etil}carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (91 mg, 0,490 mmol) a uma solução de 3-(tetradeciloxi)anilina (179 mg, 0,588 mmol) em THF (25 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante 48 horas sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo para dar 105 mg (43%) do composto **31** sob a forma de um pó branco: p.f. 70°C-72°C; ^1H RMN (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 (sl, 1H), 6,64-6,68 (m, 1H), 6,93-6,96 (m, 1H), 7,19 (t, $J_0=8,1$ Hz, 1H), 7,23 (t, $J_m=2$ Hz, 1H), 8,75 (sl, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3) 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; IV (KBr) 3368, 2918, 2851, 1679, 1618, 1498, 1472, 1286 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 0,05\text{CHCl}_3$: C = 67,56; H = 9,71; N = 5,62. Detectado: C = 67,44; H = 9,79; N = 5,57.

Composto 32: N-[1-(hidroximetil)-2-(3-(metoxianilino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (200 mg, 1,06 mmol) a uma solução de m-anisidina (171 mg, 1,38 mmol) em THF (30 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante a noite sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas para dar 154 mg (46%) do composto **32** sob a forma de um óleo amarelo: ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,48 (s, 9H), 3,68-3,73 (dd, $J_1=4,8$ Hz, $J_2=6,9$ Hz 1H), 3,75 (s, 3H), 4,22-4,25 (d, $J=10,23$ Hz, 2H), 5,66 (sl, 1H), 6,66-6,69 (m, 1H), 6,96-6,99 (m, 1H), 7,21 (m, $J_0=8,1$ Hz, 1H), 7,24 (m, 1H), 8,79 (sl, 1H); ^{13}C RMN (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.

Composto 33: N-{1-(hidroximetil)-2-oxo-2-[2-(tetradeciloxi)-anilino]etil}carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (102 mg, 0,545 mmol) a uma solução de 2-(tetradeciloxi)anilina (200 mg, 0,654 mmol) em THF (25 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante 48 horas sob árgon. A mistura reaccional foi

concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo para dar 33 mg (<10%) do composto **33** sob a forma de um óleo amarelo: ^1H RMN (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 (sl, 1H), 6,64-6,68 (m, 1H), 6,93-6,96 (m, 1H), 7,19 (t, $J_0=8,1$ Hz, 1H), 7,23 (t, $J_m=2$ Hz, 1H), 8,75 (sl, 1H); ^{13}C RMN (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.

Composto 34: N-[1-(hidroximetil)-2-(2-(metoxianilino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se β -lactona de N-(terc-butoxicarbonil)-L-serina (200 mg, 1,06 mmol) a uma solução de o-anisidina (238 mg, 1,93 mmol) em THF (30 ml) e a mistura foi submetida a refluxo durante 48 horas sob árgon. A mistura reaccional foi concentrada num evaporador rotativo. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e cristalizadas a partir de CHCl_3 /hexanos para dar 150 mg (45%) do composto **34** sob a forma de um pó amarelo: p.f. 92°C - 94°C ; ^1H RMN (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 (sl, 1H), 6,86-6,97 (m, 2H), 7,03-7,09 (m, $J_0=7,80$ Hz, $J_m=1,8$ Hz, 1H), 8,28-8,31 (dd, $J_0=8,9$ Hz, $J_m=1,5$ Hz, 1H), 8,9 (sl, 1H); ^{13}C RMN (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; IV (KBr) 3525, 3319, 2982, 1672, 1653, 1548, 1528, 1465, 1256, 1160, 1006 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: C = 58,05; H = 7,15; N = 9,03. Detectado: C = 58,04; H = 7,07; N = 8,85.

Exemplo 3 - Síntese dos Compostos 35-43**Composto 35: Trifluoroacetato de N-1-nonil-2-amino-3-hidroxiopropanamida**

Adicionou-se TFA (1 ml) gota a gota, em atmosfera de árgon, a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **26** (20 mg, 0,0580 mmol) em CH₂Cl₂ (1 ml). Após a adição, a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 19 mg (95%) do composto **35** sob a forma de um sólido branco: p.f. 168°C-170°C; ¹H RMN (CD₃OD), 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); ¹³C RMN (CD₃OD) 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; IV (KBr) 3280, 2919, 2850, 1654, 1573, 1464, 1231, 1141, 1089, 1059, cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₃H₂₈N₂O₂.CF₃COOH: C = 50,27; H = 8,16; N = 7,82. Detectado: C = 50,15; H = 8,30; N = 7,95.

Composto 36: Trifluoroacetato de N-1-tetradecil-2-amino-3-hidroxiopropanamida

Adicionou-se TFA (1,5 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **27** (50 mg, 0,124 mmol) em CH₂Cl₂ (1,5 ml), em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 48 mg (94%) do composto **36** sob a forma de um sólido branco: p.f. 168°C-171°C; ¹H RMN (CD₃OD), 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); ¹³C RMN (CD₃OD) 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; IV (KBr) 3277, 2919, 2850, 1656, 1573, 1464, 1231, 1141, 1089, 1059 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₇H₃₈N₂O₂.CF₃COOH: C = 55,06; H = 9,00; N = 6,76. Detectado: C = 54,94; H = 8,99; N = 6,58.

Composto 37: Trifluoroacetato de N-1-octadecil-2-amino-3-hidroxiopropanamida

Adicionou-se TFA (1 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **28** (25 mg, 0,0547 mmol) em CH₂Cl₂ (1 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 23 mg (92%) do composto **37** sob a forma de um sólido branco: p.f. 170°C-172°C; ¹H RMN (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); ¹³C RMN (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; IV (KBr) 3276, 2919, 2850, 1657, 1468, 1207, 1181, 1138, 1059 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₂₁H₄₄N₂O₂.CF₃COOH.0,15CH₂Cl₂: C = 57,53; H = 9,45; N = 5,80. Detectado: C = 57,45; H = 9,55; N = 5,81.

Composto 38: Trifluoroacetato de N-1-[4-(tetradeciloxi)-fenil]-2-amino-3-hidroxiopropanamida

Adicionou-se TFA (0,050 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **29** (54 mg, 0,110 mmol) em CH₂Cl₂ (0,050 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 55 mg (99%) do composto **38** sob a forma de um sólido branco: p.f. 135°C-139°C; ¹H RMN (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, J₀=9,0 Hz, 2H), 7,41-7,47 (m, J₀=9,0 Hz, 2H); ¹³C RMN (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; IV (KBr) 3281, 2920, 2852, 1672, 1604, 1559, 1515, 1240, 1210, 1132 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₂₃H₄₀N₂O₃.CF₃COOH: C = 59,27; H = 8,16; N = 5,53. Detectado: C = 59,48; H = 8,09; N = 5,49.

Composto 39: Trifluoroacetato de N-1-(4-metoxifenil)-2-amino-3-hidroxipropanamida

Adicionou-se TFA (0,049 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **30** (50 mg, 0,161 mmol) em CH₂Cl₂ (0,049 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca sob vácuo, para dar 50 mg (96%) do composto **39** sob a forma de um sólido branco: p.f. 182°C-183°C dec.; ¹H RMN (CD₃OD), δ 3,76 (s, 3H), 3,87-3,94 (m, 1H), 3,97-4,04 (m, 2H), 6,85-6,91 (m, J₀=9,1 Hz, 2H), 7,44-7,49 (m, J₀=9,0 Hz, 2H); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 55,86, 56,80, 61,73, 115,07, 122,95, 131,99, 158,31, 166,10; IV (KBr) 3278, 3099, 2964, 1673, 1562, 1517, 1196, 1131, cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₀H₁₄N₂O₃.CF₃COOH: C = 44,45; H = 4,66; N = 8,64. Detectado: C = 44,31; H = 4,67; N = 8,58.

Composto 40: Trifluoroacetato de N-1-[3-(tetradeciloxi)-fenil]-2-amino-3-hidroxipropanamida

Adicionou-se TFA (0,062 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **31** (45 mg, 0,091 mmol) em CH₂Cl₂ (0,062 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 45 mg (99%) do composto **40** sob a forma de um sólido verde amarelado: p.f. 115°C-119°C; ¹H RMN (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, J₀=8,1 Hz, 1H), 7,28 (t, J_m=2,1 Hz, 1H); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 14,44, 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; IV (KBr) 3266, 2920, 2852, 1676, 1608, 1566, 1496, 1438, 1211, 1130, 1045 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₂₃H₄₀N₂O₃.CF₃COOH: C = 59,27; H = 8,16; N = 5,53. Detectado: C = 59,49; H = 8,13; N = 5,41.

Composto 41: Trifluoroacetato de N-1-(3-metoxifenil)-2-amino-3-hidroxipropanamida

Adicionou-se TFA (1 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **32** (120 mg, 0,386 mmol) em CH₂Cl₂ (1 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 123 mg (98%) do composto **41** sob a forma de um sólido esbranquiçado: p.f. 137°C-140°C; ¹H RMN (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, J₀=8,1 Hz, 1H), 7,29 (t, J_m=2,1 Hz, 1H); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 55,70, 56,94, 61,67, 107,14, 111,11, 113,28, 130,73, 140,22, 161,61, 166,43; IV (KBr) 3265, 1675, 1609, 1566, 1496, 1433, 1268, 1196, 1044 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₀H₁₄N₂O₃.CF₃COOH: C = 44,45; H = 4,66; N = 8,64. Detectado: C = 44,52; H = 4,59; N = 8,66.

Composto 42: Trifluoroacetato de N-1-[2-(tetradeciloxi)-fenil]-2-amino-3-hidroxipropanamida

Adicionou-se TFA (1 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **33** (21 mg, 0,044 mmol) em CH₂Cl₂ (1 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 21 mg (95%) do composto **42** sob a forma de um sólido esbranquiçado: p.f. 63°C-66°C; ¹H RMN (CD₃OD), δ 0,88 (t, J=6,5 Hz, 3H), 1,27 (s, 21H), 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); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 14,43, 23,73, 27,07, 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; IV (KBr) 3282, 2925, 2851, 1679, 1556, 1496, 1458, 1213, 750 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₂₃H₄₀N₂O₃.CF₃COOH.0,5H₂O: C = 58,24; H = 8,21; N = 5,43. Detectado: C = 58,59; H = 8,09; N = 5,24.

Composto 43: Trifluoroacetato de N-1-(2-metoxifenil)-2-amino-3-hidroxipropanamida

Adicionou-se TFA (1 ml) gota a gota a uma solução arrefecida (0°C, banho de gelo) do composto **34** (80 mg, 0,257 mmol) em CH₂Cl₂ (1 ml) em atmosfera de árgon. Após a adição a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas, concentrada sob pressão reduzida à temperatura ambiente e seca numa bomba de vácuo, para dar 81 mg (97%) do composto **43** sob a forma de um sólido esbranquiçado: p.f. 131°C-133°C; ¹H RMN (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, J₀=8,1 Hz, 1H), 8,00-8,03 (t, J_m=2,1 Hz, 1H); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 56,27, 56,34, 56,47, 61,81, 111,94, 121,52, 123,21, 126,71, 127,54, 151,43, 166,80; IV (KBr) 3271, 1675, 1546, 1499, 1465, 1439, 1268, 1207, 1130 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₀H₁₄N₂O₃.CF₃COOH: C = 44,45; H = 4,66; N = 8,64. Detectado: C = 44,18; H = 4,57; N = 8,59.

Exemplo 4 - Síntese dos compostos intermediários 50-54

O material de vidro foi seco à chama e arrefecido até à temperatura ambiente em atmosfera de árgon. O álcool inicial foi lavado com piridina anidra (3 vezes) e seco (sob vácuo elevado durante 48 horas). A reacção foi efectuada em atmosfera de árgon. O THF e o CH₂Cl₂ foram destilados antes da utilização.

Composto 50: N-[1-{([di(benziloxi)fosforil]oxi)metil}-2-(nonilamino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se 1H-tetrazole (231 mg, 3,31 mmol) ao composto inicial **28** (252 mg, 0,551 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/CH₂Cl₂ (50 ml) recentemente destilados. Após 10 minutos, adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (1,14 mg, 3,31 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido

peracético. O THF e o CH_2Cl_2 foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (70 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x25 ml), NaHCO_3 (2x30 ml), água (2x30 ml) e salmoura (2x30 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 195 mg (49%) do composto **50** sob a forma de um óleo incolor: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,4$ Hz, 3H), 1,25 (m, 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 (sl, 1H), 6,33 (sl, 1H), 7,31-7,39 (m, 10H); ^{13}C (CDCl_3) 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, 128,64, 128,70, 128,72, 135,02, 168,50; MS m/z 603 (M-H^-); IV (KBr) 3349, 2919, 2852, 1717, 1685, 1654, 1516, 1470, 1457, 1242, 1163, 1037, 1025, 999 cm^{-1} .

Composto 51: N-[1-{([di(benziloxi)fosforil]oxi)metil}-2-oxo-2-(tetradecilamino)etil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se 1H-tetrazole (319 mg, 4,56 mmol) ao composto inicial **27** (305 mg, 0,761 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/ CH_2Cl_2 recentemente destilados (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (1,57 mg, 4,56 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e CH_2Cl_2 foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (70 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x30 ml), NaHCO_3 (2x40 ml), água (2x35 ml) e salmoura (2x35 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 451 mg (89%) do composto **51** sob a forma de um sólido ceroso branco: p.f. 33°C-35°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,4$ Hz, 3H), 1,23-1,25 (m_1 , 22H), 1,44 (s, 9H), 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 (sl, 1H), 6,34 (t, $J=5,0$ Hz, 1H), 7,31-7,40 (m, 10H); ^{13}C (CDCl_3) 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; Anal. Calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_7\text{P} \cdot 1\text{H}_2\text{O} \cdot 0,5\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$: C = 63,14; H = 8,78; N = 3,88. Detectado: C = 62,80; H = 8,38; N = 4,21.

Composto 52: N-[1-{([di(benziloxi)fosforil]oxi)metil}-2-(octadecilamino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se 1H-tetrazole (329 mg, 4,70 mmol) ao composto inicial **26** (270 mg, 0,783 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/ CH_2Cl_2 recentemente destilados (50 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (1,62 mg, 4,70 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e CH_2Cl_2 foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (50 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x25 ml), NaHCO_3 (2x25 ml), água (2x25 ml) e salmoura (2x25 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 135 mg (28%) do composto **52** sob a forma de um sólido branco: p.f. 52°C-54°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,4$ Hz, 3H), 1,23 (m_1 , 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 (sl, 1H), 6,32 (sl, 1H) 7,29-7,39 (m, 10H); ^{13}C (CDCl_3) 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; IV (KBr) 3349, 2919, 2852, 1717, 1685, 1654, 1516, 1242, 1163, 1037, 1025, 999 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_7\text{P} \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,1\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$: C = 64,56; H = 9,17; N = 3,42. Detectado: C = 64,23; H = 9,05; N = 3,78.

Composto 53: N-{1-([di(benziloxi)fosforil]oxi)metil}-2-oxo-2-[4-(tetradeciloxi)anilino]etil}carbamato de terc-butilo

Adicionou-se 1H-tetrazole (450 mg, 6,42 mmol) ao composto inicial **29** (310 mg, 0,647 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/ CH_2Cl_2 recentemente destilados (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (2,21 mg, 6,42 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e CH_2Cl_2 foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (70 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x25 ml), NaHCO_3 (2x35 ml), água (2x35 ml) e salmoura (2x35 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 81 mg (17%) do composto **53** sob a forma de um sólido branco: p.f. 74°C - 76°C ; ^1H RMN (CDCl_3) 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), 5,56 (sl, 1H), 6,80-6,86 (m, $J_0=9,0$ Hz, 2H) 7,31-7,39 (m, 12H), 8,82 (sl, 1H); ^{13}C (CDCl_3) 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; IV (KBr) 3340, 2920, 2852,

1717, 1677, 1513, 1457, 1237, 1059, 998 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_8\text{P} \cdot 1\text{H}_2\text{O} \cdot 0,45\text{C}_6\text{H}_{14}$: C = 66,31; H = 8,63; N = 3,46. Detectado: C = 65,92; H = 9,02; N = 3,84.

Composto 54: N-[1-{([di(benziloxi)fosforil]oxi)metil}-2-(4-(metoxianilino)-2-oxoetil]carbamato de terc-butilo

Adicionou-se 1H-tetrazole (254 mg, 3,625 mmol) ao composto inicial **30** (225 mg, 0,725 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/ CH_2Cl_2 recentemente destilados (20 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiiisopropirilo (1,25 mg, 3,625 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional mostrou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e o CH_2Cl_2 foram removidos num evaporador rotativo. O concentrado foi tratado com EtOAc (50 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x15 ml), NaHCO_3 (2x25 ml), água (2x25 ml) e salmoura (2x25 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 195 mg (47%) do composto **54** sob a forma de um sólido branco: p.f. 82°C - 84°C ; ^1H RMN (CDCl_3) 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 (sl, 1H), 6,78-6,82 (m, $J_0=9,0$ Hz, 2H) 7,26-7,33 (m, 10H), 7,36-7,41 (m, $J_0=9,0$ Hz, 2H), 8,41 (sl, 1H); ^{13}C (CDCl_3) 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; ^{31}P RMN (CDCl_3) δ 16,72 (1P); IV (KBr) 3337, 2969, 1716, 1689, 1665, 1514, 1457, 1304, 1245, 999 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$: C = 61,05; H = 6,18; N = 4,91. Detectado: C = 60,80; H = 6,20; N = 4,88.

Exemplo 5 - Síntese dos compostos 55-59**Composto 55: di-hidrogenofosfato de 2-amino-3-(nonilamino)-3-oxopropilo**

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **50** (100 mg, 0,165 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 50 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato concentrado sob pressão reduzida, para dar 48 mg (90%) do composto **55** sob a forma de um pó branco: p.f. 196°C-198°C; ^1H RMN (CF_3COOD) 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); ^{13}C RMN (CF_3COOD) 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^-); IV (KBr) 3314, 2920, 2853, 1670, 1575, 1477, 1246, 1063, 1043 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{P} \cdot 0,5\text{CH}_3\text{OH}$: C = 47,64; H = 9,18; N = 8,23. Detectado: C = 47,24; H = 8,84; N = 8,02.

Composto 56: di-hidrogenofosfato de 2-amino-3-oxo-3-(tetradecilamino)propilo

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **51** (145 mg, 0,219 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 3 horas a 45 psi. Após 3 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato concentrado sob pressão reduzida, para dar 75 mg (90%) do composto **56** sob a forma de um pó branco: p.f. 189°C-190°C; ^1H RMN (CF_3COOD) δ 0,81 (sl, 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); ^{13}C RMN (CF_3COOD) 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; ^{31}P RMN (CF_3COOD) δ 17,93 (1P); MS m/z 379 (M-H^-); IV (KBr) 3318, 2923, 2852, 1671, 1657, 1563, 1475, 1242, 1055 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$: C = 53,67; H = 9,80; N = 7,36. Detectado: C = 53,40; H = 9,73; N = 7,31.

Composto 56a: di-hidrogenofosfato de 2-(acetilamino)-3-oxo-3-(tetradecilamino)propilo

Adicionou-se um grande excesso de anidrido acético a uma amostra do composto **56** (20 mg, 0,052 mmol) em 0,5 ml de piridina. A mistura foi mantida com agitação à temperatura ambiente durante a noite. O excesso de piridina e de anidrido acético num evaporador rotativo. A mistura resultante foi agitada com 20 ml de HCl aquoso. A mistura ácida foi extraída com EtOAc (2x25 ml). A camada de EtOAc foi lavada com água (2x25 ml) e salmoura (2x25 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e filtrada. O eluato foi concentrado sob pressão reduzida para dar 15 mg (71%) do composto **56a** sob a forma de um sólido viscoso: ¹H RMN (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); ¹³C RMN(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; IV (KBr) 3316, 2923, 2853, 1671, 1657, 1560, 1467, 1247, 1059 cm⁻¹.

Composto 57: di-hidrogenofosfato de 2-amino-3-(octadecil-amino)-3-oxopropilo

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **52** (117 mg, 0,164 mol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 50 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 70 mg (98%) do composto **57** sob a forma de um pó branco: p.f. 190°C-192°C; ¹H RMN (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); ¹³C RMN(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)⁻; IV (KBr) 3325, 2922, 2852, 1674, 1655, 1560, 1472, 1045 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₂₁H₄₅N₂O₅P: C = 57,77; H = 10,39; N = 6,42. Detectado: C = 57,61; H = 10,22; N = 6,25.

Composto 58: di-hidrogenofosfato de 2-amino-3-oxo-3-[4-(tetradeciloxi)anilino]propilo

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **53** (40 mg, 0,054 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se uma hidrogenação durante 4 horas a 50 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato concentrado sob pressão reduzida, para dar 22 mg (88%) do composto **58** sob a forma de um pó branco: p.f. 187°C-190°C; ^1H RMN (CF_3COOD) 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, $J_0=9,0$ Hz, 2H), 7,32-7,35 (d, $J_0=9,0$ Hz, 2H); ^{13}C RMN (CF_3COOD) 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, 66,53, 73,66, 119,32, 126,55, 131,25, 158,87, 167,06; MS m/z 471 (M-H^-); IV (KBr) 3325, 2923, 2852, 1665, 1553, 1515, 1469, 1240, 1046 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 0,5\text{CH}_3\text{OH} \cdot 0,5\text{CHCl}_3$: C = 52,58; H = 8,00; N = 5,11. Detectado: C = 52,89; H = 7,83; N = 5,29.

Composto 59: di-hidrogenofosfato de 2-amino-3-(4-metoxianilino)-3-oxopropilo

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **54** (125 mg, 0,219 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 2 horas a 45 psi. Após as 2 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato concentrado sob pressão reduzida, para dar 82 mg (96%) do composto **59** sob a forma de um pó branco: p.f. 199°C-202°C; ^1H RMN (CF_3COOD) δ 3,93 (s, 3H), 4,65-4,75 (m, 1H), 4,88-4,94 (m, 2H), 7,01-7,04 (d, $J_0=9,0$ Hz, 2H), 7,31-7,34 (d, $J_0=9,0$ Hz, 2H); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 57,60, 58,00, 66,54, 117,69, 126,64, 131,07, 159,62, 167,07; MS m/z 289 (M-H^-); IV (KBr) 3317, 2961, 1680, 1565, 1515, 1478, 1236, 1045 cm^{-1} ; Anal. Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$: C = 41,39; H = 5,21; N = 9,65. Detectado: C = 41,25; H = 5,35; N = 9,73.

Exemplo 6 - Síntese dos compostos intermediários 63-65

O material de vidro utilizado foi seco à chama e arrefecido até à temperatura ambiente em atmosfera de árgon. O álcool inicial foi lavado com piridina anidra (3 vezes) e seco sob vácuo elevado durante 48 horas. A reacção foi efectuada em atmosfera de árgon. O THF e o CH₂Cl₂ foram destilados antes da utilização.

Composto 63: 1,2-(3-Octadeciloxipropano)-bis(dibenzilfosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (229 mg, 3,26 mmol) ao álcool *dl*-batílico inicial (**60**, 225 mg, 0,652 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recentemente destilados (50 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (1,12 mg, 3,26 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e o CH₂Cl₂ foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (70 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x25 ml), NaHCO₃ (2x30 ml), água (2x30 ml) e salmoura (2x30 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 303 mg (53%) do composto **63** sob a forma de um óleo límpido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,86 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,24 (ml, 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), 7,22-7,33 (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)⁺.

Composto 64: 1,2-(3-Dodeciloxypropano)-bis(dibenzilfosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (645 mg, 9,2 mmol) ao *dl*-3-O-*n*-dodecil-1,2-propanodiol inicial (**61**, 400 mg, 1,5 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recentemente destilados (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (3,18 mg, 9,2 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e o CH₂Cl₂ foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (80 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x35 ml), NaHCO₃ (2x40 ml), água (2x30 ml) e salmoura (2x30 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 100 mg (<10%) do composto **64** sob a forma de um óleo límpido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,86 (t, J=6,3 Hz, 3H), 1,23 (ml, 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; IV (NaCl, não diluído) 3427, 1276, 1000, 885, 499 cm⁻¹; MS m/z 781(M+H)⁺, m/z 803(M+Na)⁺.

Composto 65: 1,2-(3-Hexadeciloxypropano)-bis(dibenzilfosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (664 mg, 9,47 mmol) ao *dl*-3-O-*n*-hexadecil-1,2-propanodiol inicial (**62**, 500 mg, 1,57 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se uma mistura 1:1 de THF/CH₂Cl₂ recentemente destilados (50 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (3,27 mg, 9,47 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura

reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF e o CH₂Cl₂ foram removidos sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (80 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x35 ml), NaHCO₃ (2x40 ml), água (2x30 ml) e salmoura (2x30 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 205 mg (15%) do composto **65** sob a forma de um óleo límpido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,3 Hz, 3H), 1,25 (ml, 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; IV (NaCl, não diluído) 3423, 1269, 1016, 736 cm⁻¹; MS m/z 837(M+H)⁺, m/z 859(M+Na)⁺.

Exemplo 7 - Síntese dos compostos 66-68

Composto 66: 1,2-(3-Octadeciloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **63** (135 mg, 0,156 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 70 mg (89%) do composto **66** sob a forma de uma cera transparente: ¹H RMN (CD₃OD) δ 0,89 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,28 (s, 30H), 1,55 (m, 2H), 3,45-3,50 (m, 2H), 3,62-3,64 (m, 2H), 4,00-4,16 (m, 2H), 4,47 (m, 1H); ¹³C RMN (CD₃OD) 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)⁻; IV (NaCl não diluído) 1011 cm⁻¹.

Composto 67: 1,2-(3-Dodeciloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **64** (70 mg, 0,089 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 35 mg (94%) do composto **67** sob a forma de uma cera transparente: ¹H RMN (CD₃OD) 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); ¹³C RMN (CD₃OD) 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)⁻; IV (NaCl não diluído) 1008 cm⁻¹.

Composto 68: 1,2-(3-Hexadeciloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **65** (138 mg, 0,164 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 75 mg (96%) do composto **68** sob a forma de uma cera transparente: ¹H RMN (CD₃OD) 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); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 14,44, 23,74, 27,20, 30,48, 30,64, 30,80, 33,08, 72,80; MS m/z 475 (M-H)⁻; IV (NaCl não diluído) 1011 cm⁻¹.

Exemplo 8 - Síntese dos compostos intermediários 77-84

O material de vidro utilizado foi seco à chama e arrefecido até à temperatura ambiente em atmosfera de argón. O álcool inicial foi lavado com piridina anidra (3 vezes) e seco sob vácuo elevado durante 48 horas. A reacção foi efectuada em

atmosfera de árgon. O THF e o CH_2Cl_2 foram destilados antes da utilização.

Composto 77: 1,2-(3-Tetradecanoíloxipropano)-bis(dibenzil-fosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (1,01 mg, 14,5 mmol) à monomiristina inicial (**69**, 800 mg, 2,6 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (45 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (5,02 g, 14,5 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO_3 (2x75 ml), água (2x50 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 600 mg (28%) do composto **77** sob a forma de um óleo límpido: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,3$ Hz, 3H), 1,25 (ml, 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; IV (NaCl não diluído) 3422, 1742, 1457, 1274, 1035, 1001 cm^{-1} ; MS m/z 8823 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, m/z 845 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

Composto 78: 1,2-(3-Pentadecanoíloxipropano)-bis(dibenzil-fosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (970 mg, 13,9 mmol) à monopentadecanoína inicial (**70**, 800 mg, 2,5 mmol) lavado com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (45 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (4,80 g, 13,9 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO₃ (2x100 ml), água (2x50 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 741 mg (35%) do composto **78** sob a forma de um óleo límpido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,25 (ml, 22H), 1,53 (m, 2H), 2,17-2,32 (m, 2H), 3,95-4,24 (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, 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; IV (NaCl não diluído) 3421, 1742, 1457, 1275, 1035, 1014, 1001 cm⁻¹; MS m/z 837 (M+H)⁺, m/z 859 (M+Na)⁺.

Composto 79: 1,2-(3-Hexadecanoíloxipropano)-bis(dibenzil-fosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (1,00 g, 14,2 mmol) à monopalmitina inicial (**71**, 800 mg, 2,4 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (45 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato

de dibenzildiisopropilo (4,90 g, 14,2 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO₃ (2x100 ml), água (2x50 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 786 mg (38%) do composto **79** sob a forma de um óleo límpido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,25 (m₁, 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; IV (NaCl não diluído) 3421, 1742, 1457, 1273, 1035, 1016, 1001 cm⁻¹; MS m/z 851 (M+H)⁺, m/z 873 (M+Na)⁺.

Composto 80: 1,2-(3-Heptadecanoíloxipropano)-bis(dibenzil-fosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (980 mg, 13,9 mmol) à mono-heptadecanoína inicial (**72**, 800 mg, 2,32 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (4,81 g, 13,9 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido

peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO₃ (2x100 ml), água (2x50 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 1,48 g (74%) do composto **80** sob a forma de um óleo límpido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ml, 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, 173,07; IV (NaCl não diluído) 3483, 1743, 1457, 1281, 1035, 1013, 1000 cm⁻¹; MS m/z 865 (M+H)⁺, m/z 887 (M+Na)⁺.

Composto 81: 1,2-(3-Octadecanoóloxipropano)-bis(dibenzil-fosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (1,00 g, 14,2 mmol) à monoestearina inicial (**73**, 800 mg, 2,2 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (4,92 g, 14,2 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO₃ (2x100 ml), água (2x50 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 870 mg (45%) do composto **81** sob a forma de um óleo límpido: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,4$ Hz, 3H), 1,23-1,25 (ml, 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); ^{13}C (CDCl_3) 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; IV (NaCl não diluído) 3421, 1742, 1457, 1273, 1251, 1216, 1035, 1016, 1000 cm^{-1} ; MS m/z 879 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z 901 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Composto 82: 1,2-(3-Nonadecanoíloxipropano)-bis(dibenzil-fosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (977 mg, 13,9 mmol) à monononadecanoína inicial (**74**, 800 mg, 2,1 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (4,81 g, 13,9 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO_3 (2x125 ml), água (2x75 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 1,47 g (78%) do composto **82** sob a forma de um óleo límpido: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,3$ Hz, 3H), 1,23-1,25 (ml, 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); ^{13}C (CDCl_3) δ 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; IV (NaCl não diluído) 3483, 1743, 1457, 1273, 1282, 1216, 1035, 1013 cm^{-1} ; MS m/z 893 $(M+H)^+$, m/z 915 $(M+Na)^+$.

Composto 83: 1,2-(3-icosanoíloxipropano)-bis(dibenzilfosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (1,00 g, 14,2 mmol) à monoaraquidina inicial (**75**, 800 mg, 2,06 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (4,92 g, 14,2 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO_3 (2x125 ml), água (2x75 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 1,39 g (74%) do composto **83** sob a forma de um óleo límpido: ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,87 (t, $J=6,4$ Hz, 3H), 1,23-1,25 (ml, 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); ^{13}C (CDCl_3) δ 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; IV (NaCl não diluído) 3483, 1743, 1457, 1273, 1282, 1216, 1035, 1012, 1000 cm^{-1} ; MS m/z 907 $(M+H)^+$, m/z 929 $(M+Na)^+$.

Composto 84: 1,2-(3-Docosanoíloxipropano)-bis(dibenzilfosfato)

Adicionou-se 1H-tetrazole (1,00 g, 14,2 mmol) à monobenina inicial (**76**, 800 mg, 1,92 mmol) lavada com piridina. A esta mistura adicionou-se THF recentemente destilado (40 ml). Após 10 minutos adicionou-se fosforamidato de dibenzildiisopropilo (5,14 g, 14,8 mmol) e a mistura reaccional foi agitada em atmosfera de árgon durante 90 minutos. A TLC da mistura reaccional confirmou a formação do produto. Esta mistura foi arrefecida a 0°C (banho de gelo) e foi adicionado um grande excesso de ácido peracético. A mistura foi agitada durante mais 35 minutos, seguido da adição de metabissulfito de Na para suprimir o excesso de ácido peracético. O THF foi removido sob pressão reduzida. O concentrado foi tratado com EtOAc (100 ml) e lavado com metabissulfito de Na (2x50 ml), NaHCO₃ (2x125 ml), água (2x75 ml) e salmoura (2x50 ml). A porção orgânica foi seca sobre NaSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a cromatografia *flash* em coluna e eluído com EtOAc/hexanos de diferentes composições.

As fracções apropriadas foram agrupadas e concentradas até à secura em vácuo, para dar 1,27 g (71%) do composto **84** sob a forma de um composto branco semelhante a cera: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,4 Hz, 3H), 1,23-1,25 (ml, 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 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)⁺.

Exemplo 9 - Síntese dos compostos 85-92**Composto 85: 1,2-(3-Tetradecanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)**

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **77** (385 mg, 0,468 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura

reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 210 mg (98%) do composto **85** sob a forma de uma cera branca: ^1H RMN (CD_3OD) 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); ^{13}C RMN(CD_3OD) 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); IV (NaCl não diluído) 3386, 1702, 1216, 1019 cm^{-1} .

Composto 86: 1,2-(3-Pentadecanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (quantidade catalítica) a uma solução do composto **78** (451 mg, 0,538 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 250 mg (97%) do composto **86** sob a forma de uma cera branca: ^1H RMN (CD_3OD) 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); ^{13}C RMN(CD_3OD) 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) $^-$; IV (NaCl não diluído) 3380, 1728, 1216, 1031 cm^{-1} .

Composto 87: 1,2-(3-Hexadecanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (610 mg) a uma solução do composto **79** (561 mg, 0,659 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 300 mg (92%) do composto **87** sob a forma de uma cera branca: ^1H RMN (CD_3OD) 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); ^{13}C RMN (CD_3OD) 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)⁻; IV (NaCl não diluído) 3357, 1729, 1216, 1029 cm⁻¹.

Composto 88: 1,2-(3-Heptadecanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (724 mg) a uma solução do composto **80** (636 mg, 0,736 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 365 mg (98%) do composto **88** sob a forma de uma cera branca: ¹H RMN (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); ¹³C RMN (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)⁻; IV (NaCl não diluído) 3357, 1710, 1216, 1032 cm⁻¹. Anal. Calc. para C₂₀H₄₂O₁₀P₂.1H₂O: C = 45,97; H = 8,49. Detectado: C = 46,32; H = 8,73.

Composto 89: 1,2-(3-Octadecanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (617 mg) a uma solução do composto **81** (530 mg, 0,603 mmol) em EtOH (15 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 305 mg (97%) do composto **89** sob a forma de uma cera branca: ¹H RMN (CD₃OD) δ 0,89 (t, J=6,3 Hz, 3H), 1,28 (s, 28H), 1,58-1,61 (m, 2H), 2,42-2,38 (m, 2H), 3,91-4,17 (m, 4H), 4,24-4,42 (m, 1H); ¹³C RMN(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)⁻; IV (NaCl não diluído) 3388, 1731, 1216, 1020 cm⁻¹.

Composto 90: 1,2-(3-Nonadecanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (1,00 g) a uma solução do composto **82** (952 mg, 1,06 mmol) em EtOH (25 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 555 mg (98%) do composto **90** sob a forma de uma cera branca: ^1H RMN (CD_3OD) 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); ^{13}C RMN (CD_3OD) 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^-); IV (NaCl não diluído) 1735, 1216, 1012 cm^{-1} .

Composto 91: 1,2-(3-Icosanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (813 mg) a uma solução do composto **83** (711 mg, 0,784 mmol) em EtOH (25 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob pressão reduzida, para dar 419 mg (97%) do composto **91** sob a forma de uma cera branca: ^1H RMN (CD_3OD) 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); ^{13}C RMN (CD_3OD) 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^-); IV (NaCl não diluído) 3418, 1735, 1261, 1019 cm^{-1} .

Composto 92: 1,2-(3-Docosanoíloxipropano)-bis(di-hidrogeno-fosfato)

Adicionou-se Pd/C a 10% (710 mg) a uma solução do composto **84** (663 mg, 0,709 mmol) em EtOH (25 ml). Efectuou-se a hidrogenação durante 4 horas a 60 psi. Após 4 horas determinou-se por TLC o fim da reacção e a mistura reaccional foi filtrada através de celite e o eluato foi concentrado sob

pressão reduzida, para dar 400 mg (98%) do composto **92** sob a forma de uma cera branca: ^1H RMN (CD_3OD) 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); ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) 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^-); IV (NaCl não diluído) 3431, 1739, 1254, 1177 cm^{-1} .

Exemplo 10 - Ensaio do oócito de *Xenopus*

Utilizaram-se oócitos de *Xenopus* que expressam de forma endógena o PLGFR PSP24 para seleccionar os compostos agora concebidos e sintetizados quanto à sua actividade inibidora do LPA.

Os oócitos foram obtidos de rãs adultas *Xenopus laevis* anestesiadas com xilazina (Carolina Scientific, Burlington, NC) em condições assépticas e preparados para a experiência. A camada de células foliculares de oócitos de Fase V-VI foi removida por tratamento com collagenase tipo A (Boehringer, IN) a 1,4 mg/ml numa solução de Ringer 2 para ovário isenta de Ca^{2+} ((OR-2) NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,5, com NaOH). Os oócitos foram mantidos em solução de Barth numa incubadora entre 17°C–20°C e foram utilizados durante 2 a 7 dias após isolamento.

Os registos electrofisiológicos foram efectuados utilizando um amplificador padrão de potencial imposto de dois eléctrodos que mantém o potencial da membrana a -60 mV (GeneClamp 500, Axon Instruments, CA). Os compostos de teste foram dissolvidos em MeOH, complexados com BSA isento de ácidos gordos, diluídos com solução de Ringer- Na^+ para rã (NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 1,8 mM, HEPES 5 mM, pH 7,0) e aplicados por super-perfusão nos oócitos a um caudal de 5 ml/min. As correntes de membrana foram registadas com um osciloscópio digital NIC-130 (Nicolet, Madison, WI). As aplicações foram efectuadas a intervalos de 15 minutos (mínimo) para permitir a eliminação apropriada e recuperação da dessensibilização.

As Figuras 21-27 apresentam a inibição dependente da dose das correntes de cloreto induzidas pelo LPA, produzida pelos compostos **56**, **57**, **66** e **92**.

Dos derivados não fosforilados, o composto **36** foi o melhor inibidor. Quando o composto **36** foi injectado no interior da célula para verificar se os seus efeitos inibidores eram consequência das suas acções na superfície da célula ou se a inibição era consequência das suas acções no interior da célula, esta aplicação intracelular do composto **36** não deu qualquer informação sobre o seu local de acção. Portanto, abandonando a ideia de compostos com um hidroxilo livre (**35-43**), foram sintetizados compostos fosforilados (**55-59**) para interagir a nível da superfície celular e impedir a penetração dos compostos na célula.

Os compostos **56**, **57**, **66** e **92** foram inibidores das correntes de cloreto induzidas pelo LPA no oócito de *Xenopus*. Os compostos **56**, **57**, **66** e **92** conseguiram bloquear as acções do LPA de maneira dependente da dose. Além disso, por lavagem do oócito de *Xenopus* verificou-se uma recuperação completa da resposta ao LPA; esta experiência implica que os compostos **56**, **57**, **66** e **92** conseguiram inibir as correntes de cloreto induzidas pelo LPA de maneira reversível. O composto **66**, a uma concentração de 5 μM , suprimiu completamente o efeito do LPA nos oócitos de *Xenopus*, com uma CI_{50} de cerca de 1,2 μM (Figuras 23 e 24). Além disso, quando se efectuou a micro-injecção do composto **66** no interior da célula (seta, Figura 23B), seguida da aplicação extracelular de LPA (10 nM), não houve inibição da resposta ao LPA; esta experiência sugere que as acções inibidoras do composto **66** foram de natureza extracelular.

Os compostos **35** e **37-43** foram estudados em oócitos de *Xenopus*, no entanto os resultados não foram conclusivos. O composto **55**, a uma concentração de 1 μM , demonstrou uma ligeira inibição (38% para uma concentração de 2 nM de LPA). Na série SAP, os compostos **58** e **59** ainda não foram estudados no ensaio do oócito de *Xenopus*. Na série dos bisfosfatos, o composto **89** inibiu a resposta induzida pelo LPA (59% para uma concentração de 2 nM de LPA). Contudo, isolados, cada um dos compostos **67** (valor limite $\sim 1 \mu\text{M}$), **68** (valor limite $\sim 10 \text{ nM}$) e

85 (valor limite ~100 nM) conseguiu desencadear uma resposta; os compostos **86**, **87**, **88**, **90** e **91** ainda têm de ser avaliados. O composto **56a** foi concebido e sintetizado para testar a importância do grupo amino livre. Quando o composto **56a** foi avaliado no ensaio do oócito de *Xenopus*, intensificou a resposta ao LPA quando aplicado em associação com LPA. O composto **56a** não desencadeou uma resposta a 2 µM (não apresentado), mas a 10 µM o composto **56a** conseguiu desencadear uma resposta por si mesmo (Figura 26); esta experiência sugere que é necessário um grupo amino livre para a actividade inibidora.

Exemplo 11 - Migrações de células HEY do ovário

Sabe-se que dois receptores do LPA, o EDG-2 e o EDG-7, são expressos nas células HEY do cancro do ovário; portanto, os compostos **56**, **56a** e **66** foram avaliados quanto à sua capacidade para inibirem a motilidade celular induzida pelo LPA (concentração dos compostos: 1 µM para 0,1 µM de LPA).

As células do ovário HEY foram mantidas em meio RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina (GIBCO BRL) suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS, Hyclone). Todas as células foram sincronizadas na fase G₀/G₁ cultivando-as até à confluência durante 2 dias. As células foram novamente plaqueadas e foram colhidas para experiências quando atingiram uma confluência de cerca de 50 a 60% no frasco de cultura. Após remoção das células do frasco, estas foram expostas durante 5 minutos a EDTA 0,53 mM em PBS a 37°C. O EDTA foi neutralizado com um volume igual de RPMI 1640 mais 2 mM de L-glutamina e FBS a 10%. As células foram centrifugadas a 800 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células colhidas foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina e ressuspensas a uma concentração de 1 x 10⁶ células/ml, foram deixadas depois em repouso durante 1 hora a 37°C.

Utilizou-se um ensaio quantitativo modificado da migração celular (N.º Cat. ECM500 da Chemicon, Temecula, CA) para analisar a motilidade celular. A membrana da câmara da Chemicon foi revestida com fibronectina com poros de 8 micron de diâmetro. Pipetaram-se 400 µl de RPMI/L-glutamina 2 mM sem inibidores ou com inibidores (1 µM) para a câmara inferior. Adicionaram-se cerca de 5 x 10⁴ células em RPMI 1640/L-

glutamina 2 mM na câmara superior. As placas de 24 poços com insertos foram incubadas a 37°C durante 4 horas num incubador com CO₂ a 5%. No fim da incubação as câmaras foram removidas para uma nova placa de 24 poços e as células da câmara interior foram removidas esfregando várias vezes com uma zaragatoa e colocadas na *Cell Stain Solution* (Solução de Coloração Celular) preparada durante 30 minutos à temperatura ambiente. No fim da incubação, a *Cell Stain Solution* foi removida dos poços. As câmaras foram lavadas 3 vezes com 1 ml de PBS por poço. Após a última lavagem com PBS, examinaram-se as câmaras para confirmar a morfologia correcta das células e contaram-se as células aderentes utilizando um microscópio invertido.

Na Figura 27 apresenta-se um efeito dos compostos agora sintetizados sobre a migração de células HEY de cancro do ovário induzida pelo LPA. O composto **66** inibiu a motilidade celular induzida pelo LPA em cerca de 70%; contudo, o composto **55** (ligeiramente) e o composto **56a** potenciaram a motilidade celular induzida pelo LPA.

Exemplo 12 - Citotoxicidade dos compostos

Im *et al.* (2000) e dados obtidos por RT-PCR demonstraram a presença de PLGFR nas linhas celulares DU-145, PC-3 e LNCaP de cancro da próstata. Devido à prometedora actividade inibidora em oócitos de *Xenopus* e no ensaio da motilidade celular, examinaram-se os efeitos inibidores do crescimento de vários compostos nas linhas celulares DU-145, PC-3 e LNCaP do cancro da próstata.

As células DU-145, PC-3 e LNCaP foram propagadas em frascos de cultura de 150 cm² contendo RPMI-1640 ou meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com soro bovino fetal (FBS) a 10%. As células foram removidas de frascos de culturas mãe utilizando tripsina e foram centrifugadas, ressuspensas em meios frescos e plaqueadas a uma densidade de aproximadamente 2000 células/poço em placas de cultura com 96 poços. As concentrações finais dos fármacos variaram entre 0,05 e 10 ou 50 µM. Efectuaram-se simultaneamente experiências de controlo sem adição de fármaco (controlo negativo) e com adição de 5-fluorouracilo (controlo positivo). Os meios foram removidos e substituídos ao fim de 48 horas para minimizar os

efeitos da degradação do fármaco com o decorrer da experiência. Após 96 horas de exposição ao fármaco as células foram fixadas por adição de ácido tricloroacético (TCA) frio a 50% e incubação a 4°C durante 1 hora. As células fixadas foram coradas com sulforodamina B (SRB) e o número de células foi determinado por comparação da absorvância a 540 nm com uma curva padrão do número de células em função da absorvância. As experiências foram realizadas em duplicado. Traçou-se um gráfico do número de células expresso como percentagem do controlo (poços não tratados) em função da concentração do fármaco e da concentração que inibiu o crescimento celular em 50% (CI_{50}) determinada por regressão não linear (WinNonLin, Pharsight Corporation).

Os estudos de citotoxicidade realizados nas linhas celulares DU-145, PC-3 e LNCaP do cancro da próstata, juntamente com os compostos de referência 5F-uracilo, LPA (18:1), SPH (13:0), SPP (13:0) e ácido N-palmitoíl-L-serina-fosfórico (15:0) são apresentados na Tabela 3 seguinte.

Tabela 3: Citotoxicidade de compostos sintetizados em linhas celulares do cancro da próstata

Composto	CI ₅₀ ± EPM (µM) ^x		
	DU145	PC-3	LNCaP
Fluorouracilo	6,8±3,3	10,2±4,1	2,8±1,6
LPA (18:1)	AF	28,5±6,3	AF
SPP (13:0)	>10	AF	NA
SPH (13:0)	13,9±1,1	11,7±2,3	5,7±2,1
N-palmitoil-L-serina (15:0)	AF	AF	AF
27	19,7±6,0	AF	10,9±2,7
38	38,9±8,9	?	?
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
56a	0,7±0,1	AF	30,3±7,9
57	9,1±0,8	AF	10,7±2,1
66	NA	NA	3,1±3,2
67	AF	AF	25,2±12,3
68	AF	AF	29,3±21,7
85	NA	NA	11,6±10,3
86	NA	NA	?
87	NA	NA	AF
88	NA	NA	?
89	AF	NA	?
90	>50	AF	AF
91	42,2±1,9	AF	AF
92	AF	AF	AF

^x Traçou-se o gráfico do número de células expresso como percentagem do controlo (poços não tratados) em função da concentração do fármaco e da concentração que inibiu o crescimento celular em 50% (IC₅₀) determinada por regressão não linear (WinNonLin, Pharsight Corporation).

AF = Actividade fraca; NA = Nenhuma actividade; ? = A inibição máxima foi 50%.

Os compostos **55**, **56**, **56a**, **66** e **85** apresentaram uma gama de actividades inibidoras do crescimento. O composto **56** foi um inibidor mais potente do crescimento celular de DU-145 e de PC-3 do que o 5-fluorouracilo. É interessante observar que o composto **56a** inibiu selectivamente o crescimento das células DU-145, mas foi menos potente contra as células PC-3; o composto **55** foi um inibidor mais potente do crescimento das células LNCaP do que das células DU-145 e PC-3. O composto **66** inibiu selectivamente o crescimento das células LNCaP, mas não mostrou qualquer actividade sobre as células PC-3 e LNCaP. O composto **85** foi o mais activo dos bisfosfatos (*sn*-1 acilo).

Discussão dos Exemplos 1-12

Foram especificamente sintetizados e analisados três conjuntos de compostos (**35-43**, **55-59**, **66-68** e **85-92**). O primeiro e o segundo conjuntos dizem respeito à amalgamação dos inibidores endógenos SPH e SPP com o inibidor sintético ácido N-palmitoíl-L-serina-fosfórico, enquanto a terceira série envolve os bisfosfatos. Os compostos **56**, **57**, **66** e **92** foram inibidores das correntes de cloreto induzidas pelo LPA no ensaio do oócito de *Xenopus*. Os bisfosfatos com cadeia mais curta na posição (*sn*-1) também conseguiram produzir correntes de cloreto em oócitos de *Xenopus* [**67** (valor limite ~1 µM), **68** (valor limite ~10 nM) e **85** (valor limite ~100 nM)]. Demonstrou-se que o composto **66** inibe a motilidade celular induzida pelo LPA nas linhas celulares HEY do cancro do ovário. Ao avaliarem-se os efeitos inibidores do crescimento dos compostos sintetizados acima sobre as linhas celulares DU-145, PC-3 e LNCaP do cancro da próstata, encontraram-se três compostos altamente potentes e selectivos (**56**, **56a** e **66**).

Os dados acima (Tabela 3) sugerem que (i) os compostos que contêm um álcool sem fosfato são menos activos (**27** vs. **56**), (ii) os compostos com a porção fosfato protegida são menos activos (**51** vs. **56**), (iii) a alquilação da amina não reduz a actividade (**56a**), (iv) o bisfosfato mais potente tem uma ligação éter na posição *sn*-1, (v) a diminuição do comprimento da cadeia na série SAP (**55** vs. **56**) diminuiu a potência em relação às células DU-145 e PC-3 (contudo, foi mais potente contra as células LNCaP), (vi) ao diminuir o comprimento da cadeia nos compostos bisfosfato (*sn*-1 alquilo) a potência diminuiu, embora se mantivesse a selectividade para com as células LNCaP e (vii) a substituição na posição *sn*-1 (acilo vs. alquilo) não aumentou a potência. O local alvo para estas moléculas é provavelmente na membrana celular (por exemplo, um receptor que abrange toda a membrana) dado que é pouco provável que os derivados fosfato polares atravessem facilmente a membrana celular (embora haja a possibilidade de existir um sistema de transporte activo). Estes resultados sugerem que diferenças nos PLGFR ou episódios de transdução de sinal a jusante, podem desempenhar um papel significativo nas propriedades inibidoras do crescimento destes compostos em células do cancro prostático.

Exemplo 13 - Preparação e caracterização de linhas celulares estáveis que expressam Edg-2, Edg-4 e Edg-7

Para tentar desenvolver antagonistas selectivos dos receptores Edg-2, Edg-4 e Edg-7, estabeleceu-se em primeiro lugar um sistema para selecção de compostos potenciais. Escolheram-se as células RH7777 como sistema modelo, dado terem sido descritas como não respondendo ao LPA em diversos ensaios celulares e ter-se verificado que eram desprovidas de ARNm para qualquer dos receptores Edg conhecidos (Fukushima *et al.*, 1998). Estabeleceram-se em células RH7777 linhas celulares estáveis transfectadas com os receptores EDG, assim como linhas celulares de controlo transfectadas com vector vazio.

Os clones resultantes foram rastreados por monitorização de transientes intracelulares de Ca^{2+} e por RT-PCR. Este processo de selecção levou à identificação de pelo menos três linhas celulares positivas expressando Edg-2 e Edg-7, embora não se pudessem identificar linhas celulares expressando Edg-4. Verificou-se também que as células transfectadas com vector não respondiam ao LPA. Embora não se tenham isolado clones estáveis expressando Edg-4, a expressão transitória de Edg-4 resultou na activação mediada pelo LPA de transientes intracelulares de Ca^{2+} , demonstrando que a construção era funcionalmente activa nestas células. A linha celular estável expressando Edg-4 utilizada nestas experiências foi isolada e caracterizada por Im *et al.*, que amavelmente nos cederam o mesmo clone (Im *et al.*, 2000).

As linhas celulares foram posteriormente caracterizadas para tentar identificar um ensaio adequado para o rastreio de antagonistas potenciais. A activação desencadeada pelo LPA de ERK 1/2 foi observada em células que expressavam Edg-2 e, de forma transitória, Edg-4, enquanto que o ERK 1/2 não foi activado em células que expressavam Edg-7. O LPA produziu transientes de Ca^{2+} em todas as linhas celulares estáveis que expressavam Edg-2, Edg-4 e Edg-7. As curvas da relação dose-resposta revelaram valores de CE_{50} de 378 ± 53 , 998 ± 67 e 214 ± 26 nM para as células expressando respectivamente Edg-2, Edg-4 e Edg-7 (Figuras 28A-C). Como o valor de CE_{50} determinado no clone estável de Edg-4 foi diferente do valor

anteriormente comunicado, também foi definida uma curva da relação dose-resposta para células que expressam transitoriamente Edg-4 (Figura 28B, An et al., 1998a; An et al., 1998b) que originou um valor de CE_{50} de 186 ± 39 .

A capacidade do LPA de estimular a síntese do ADN nas linhas celulares estáveis foi examinada por medição da incorporação de 3H -timidina. Nem o tipo selvagem nem as células RH7777 transfectadas com vector apresentaram um aumento de incorporação de 3H -timidina após incubação durante 24 horas com $10 \mu M$ de LPA, o que contraria uma comunicação anterior de que o LPA é mitogénico nestas células. As células que expressam Edg-2 apresentaram um aumento da incorporação de 3H -timidina de 1,8 vezes, enquanto as células que expressam Edg-4 e Edg-7 não apresentaram um aumento da incorporação de 3H -timidina, em comparação com as células de controlo.

Exemplo 14 - Actividade de fosfatidatos de cadeia curta nos receptores Edg-2 e Edg-7

Como os transientes de Ca^{2+} foram desencadeados nas três linhas celulares estáveis que expressam Edg-2, Edg-4 e Edg-7 (Figuras 28A-C), este ensaio foi utilizado para a selecção de antagonistas potenciais. Para tentar identificar antagonistas selectivos para os membros activados pelo LPA da família de receptores Edg, Edg-2, Edg-4 e Edg-7, baseámo-nos nas características estruturais do farmacóforo LPA como ponto de partida. O LPA de cadeia curta (8:0) ou uma mistura de LPA (8:0) e LPA (18:1) foram avaliados como inibidores de Edg-2, Edg-4 ou Edg-7. Quando as células foram provocadas com a mistura de LPA 8:0 e LPA 18:1, as respostas de Ca^{2+} não se efectuaram em nenhuma das três linhas celulares estáveis (ver as Figuras 30A-C, 31A-C e 32A-B). O LPA 8:0 sozinho não foi capaz de provocar respostas de Ca^{2+} em nenhuma das células, em concentrações tão elevadas como $10 \mu M$.

Com base nestes resultados, os requerentes puseram a hipótese de que uma modificação do farmacóforo LPA que restringia estereoquimicamente a mobilidade da cadeia de ácido gordo, podia também afectar as suas propriedades de ligando. Por esta razão, compostos com um segundo ácido gordo de cadeia curta na posição *sn*-2 também foram analisados. Estes

fosfatidatos de cadeia curta possuem maior hidrofobicidade do que o LPA de cadeia curta correspondente, o que pode restringir a sua interação com a bolsa de ligação ao ligando do receptor.

O ácido fosfatídico (PA) e o diacilglicerol-pirofosfato (DGPP) são lípidos de ocorrência natural que partilham algumas das principais propriedades químicas com o farmacóforo LPA, possuindo um ou mais grupos fosfato iónico e cadeias de ácidos gordos. Nenhum deles é agonista dos receptores Edg (ver abaixo). Tendo em atenção esta semelhança, foram preparados DGPP de cadeia curta e avaliados como inibidores de Edg-2, Edg-4 e Edg-7. As Figuras 29A-D mostram o efeito de um excesso 10 vezes maior de DGPP (8:0) nas respostas de Ca^{2+} produzidas pelo LPA nas linhas celulares estáveis. As respostas de Ca^{2+} em células que expressam Edg-2 foram inibidas aproximadamente 50% (Figura 29A), enquanto as respostas nas células que expressam Edg-7 foram completamente suprimidas (Figura 29C). Pelo contrário, as respostas de Ca^{2+} em células que expressam Edg-4 não foram afectadas pelo DGPP 8:0 (Figura 29B). Devido à discrepância nos valores de CE_{50} para as expressões estável e transitória de Edg-4 (Figura 29B), o DGPP 8:0 foi similarmente estudado em células que foram transfectadas de forma transitória com Edg-4. As respostas de Ca^{2+} , em concordância com os resultados das experiências em células estáveis, não foram afectadas pelo DGPP 8:0 em células que expressam Edg-4 transitoriamente (Figura 29D). Obtiveram-se observações semelhantes com PA 8:0 em cada um dos ensaios acima descritos para o DGPP 8:0 (ver abaixo).

Determinaram-se curvas de inibição em células que expressam Edg-2 e Edg-7 utilizando concentrações crescentes de DGPP 8:0, mantendo-se a concentração de LPA constante na CE_{50} respeitante ao receptor estudado. Determinaram-se valores de CI_{50} de 285 ± 28 nM para Edg-7 (Figura 30A) e $11,0 \pm 0,68$ μM para Edg-2 (Figura 31A) a partir das curvas. Utilizando uma quantidade constante de DGPP 8:0 próximo do valor da CI_{50} (250 nM para Edg-7, 3 μM para Edg-2), as curvas da relação dose-resposta para Edg-7 (Figura 30B) e Edg-2 (Figura 31B) sofreram um desvio para a direita, indicando um mecanismo de inibição competitivo.

Com o objectivo de definir melhor a relação actividade-estrutura do DGPP, estudaram-se as espécies de cadeia curta (8:0) e de cadeia longa (18:1) de LPA, DGPP; PA e DAG nas linhas celulares que expressam Edg-2 e Edg-7. A Figura 30C apresenta o efeito destes lípidos nas respostas de Ca^{2+} em células que expressam Edg-7 quando expostas a uma associação de LPA 18:1 com cada um destes lípidos. Para estas experiências escolheu-se a concentração de LPA próxima de CE_{50} , enquanto os lípidos de teste foram aplicados a uma concentração igual à da CI_{50} de DGPP 8:0. O LPA 8:0 não teve qualquer efeito sobre Edg-7, enquanto que tanto o DGPP 8:0 como o PA 8:0 inibiram significativamente as respostas de Ca^{2+} , respectivamente em 50% e 56%. Em contraste, o DAG 8:0 aumentou significativamente as respostas de Ca^{2+} . Quando se aumentou o comprimento da cadeia de DGPP e de PA para 18:1, estes análogos já não foram inibidores de Edg-7 (Figura 30C). Analogamente, o DAG 18:1 não teve um efeito inibidor sobre Edg-7.

Estudou-se o mesmo conjunto de lípidos em células que expressam Edg-2 (Figura 31C). Os análogos de cadeia de octilo de DGPP, PA e DAG, quando utilizados na concentração de 10 μM , diminuíram as respostas respectivamente para 50%, 19% e 64% do controlo. Quando se aumentou o comprimento da cadeia para 18:1, o DGPP e o DAG deixaram de ter um efeito inibidor, enquanto o PA 18:1 manteve um efeito inibidor modesto, diminuindo a resposta de Ca^{2+} em 18%. O painel de lípidos também foi estudado em células que expressam Edg-4 (Figuras 32A-B). Quando estes lípidos foram analisados na linha celular estável que expressa Edg-4, nenhum dos lípidos de cadeia curta ou de cadeia longa teve efeito inibidor, enquanto que tanto o PA 8:0 como o PA 18:1 aumentaram significativamente as respostas de Ca^{2+} , respectivamente para 162% e 137% do controlo. Para confirmar os resultados obtidos com o clone estável, estudou-se o painel de lípidos em células que expressam transitoriamente Edg-4 (Figura 32B). Mais uma vez, nenhuma das espécies de cadeia curta ou de cadeia longa de DGPP ou PA tiveram um efeito inibidor na resposta de Ca^{2+} , em conformidade com os resultados obtidos com a linha celular estável. Em contraste com o clone que expressa Edg-4 de forma estável, nenhum dos análogos de PA aumentou a resposta de Ca^{2+} em células com expressão transitória de Edg-4. Nenhuma das

espécies de PA, quando aplicada sozinha em concentrações até 10 μM , desencadeou uma resposta em células que expressam Edg-4 de forma estável ou transitória.

Também se examinou o efeito do DGPP 8:0 em células que expressam de forma endógena os receptores de LPA. Verificou-se que o DGPP 8:0 inibe as correntes de Cl^- no sentido da entrada mediadas por Ca^{2+} desencadeadas pelo LPA em oócitos de *Xenopus* com uma CI_{50} de 96 ± 21 nM (Figura 33A). Na presença de uma concentração de 200 nM de DGPP 8:0, a curva da relação dose-resposta de LPA 18:1 foi desviada para a direita, indicando um mecanismo de acção competitivo, como o detectado nos clones de Edg-2 e Edg-7 (Figura 33B). Com o objectivo de examinar se o DGPP 8:0 actua através de um mecanismo intracelular ou extracelular, injectou-se intracelularmente DGPP 8:0 e o oócito foi exposto a LPA 18:1. A Figura 32C mostra que, após a injeção intracelular de DGPP 8:0 que se estimou atingir uma concentração >300 nM, a aplicação extracelular de 5 nM de LPA 18:1 desencadeou uma resposta de grandeza igual à do controlo. Em comparação, a resposta desencadeada normalmente pelo LPA 18:1 foi completamente inibida quando se aplicou DGPP 8:0 por via extracelular (Figura 33C). O efeito inibidor de DGPP 8:0 foi reversível, dado que após uma lavagem de 10 minutos a resposta recuperou para o nível de controlo (Figura 33C).

Para demonstrar a especificidade de DGPP 8:0 para os receptores de LPA expressos no oócito, induziu-se a expressão de receptores de neurotransmissores por injeção de poliA+ARNm de cérebro de rato. Isto resultou na expressão dos receptores acoplados à proteína G para a serotonina e a acetilcolina, que não são expressos em oócitos não injectados. Estes neurotransmissores activam a mesma via de sinalização de inositol trisfosfato- Ca^{2+} que é activada pelo LPA (Tigyi et al. 1990). Nestes oócitos o DGPP 8:00 não inibiu as respostas desencadeadas pela serotonina ou pelo carbacol, demonstrando a especificidade de DGPP 8:00 para os receptores do LPA. O PA 8:0, quando utilizado em concentrações semelhantes, também foi eficaz para inibir as respostas desencadeadas pelo LPA nos oócitos.

O efeito do DGPP 8:0 nas respostas desencadeadas pelo LPA também foi examinado em sistemas de mamíferos que expressam de

forma endógena os receptores de LPA. As células NIH3T3 foram analisadas por RT-PCR quanto à presença de ARNm para os receptores Edg e PSP24. A Figura 34A mostra que se detectaram transcritos de ARNm para Edg-2, Edg-5 e PSP-24 em células NIH3T3. Para demonstrar a especificidade do DGPP 8:0 para inibição das respostas de Ca^{2+} desencadeadas pelo LPA, mas não das desencadeadas por S1P, expuseram-se células NIH3T3 a 100 nM de LPA ou S1P na presença de 10 μM de DGPP 8:0. Como mostrado na Figura 34B, o DGPP 8:0 inibiu significativamente as respostas de Ca^{2+} desencadeadas pelo LPA, enquanto que a resposta desencadeada por S1P não foi afectada.

Demonstrou-se que o LPA é produzido no cancro do ovário onde desempenha um papel (Xu *et al.*, 1995a). Portanto, o DGPP 8:0 também foi estudado em células HEY do cancro do ovário para determinar se tinha algum efeito num alvo com relevância terapêutica. A Figura 34D mostra que o DGPP 8:0 inibiu a resposta de Ca^{2+} desencadeada pelo LPA para 12% do controlo, enquanto que o DGPP 18:1 não teve qualquer efeito. Analogamente, o PA 8:0 inibiu a resposta de Ca^{2+} para 6% do controlo, enquanto que o PA 18:1 não teve qualquer efeito. As células HEY expressam transcritos de ARNm para os receptores Edg-1, Edg-2, Edg-5 e Edg-7 (Figura 34C).

Exemplo 15 - Inibição da proliferação de células NIH3T3

O efeito distintivo de um factor de crescimento é a sua capacidade para desencadear a proliferação celular. Como se demonstrou que o LPA estimula a proliferação de vários tipos celulares diferentes (Goetzi *et al.*, 2000), examinou-se a capacidade do DGPP 8:0 para inibir a proliferação celular em células NIH3T3. A Figura 35 mostra que o DGPP 8:0 inibiu significativamente a proliferação das células NIH3T3 induzida pelo LPA, diminuindo o número de células para os níveis do controlo, enquanto que não teve efeito nas células de controlo tratadas com solvente. Com o objectivo de definir a relação estrutura-actividade para o efeito inibidor do DGPP 8:0 incluíram-se no ensaio espécies de cadeia curta e de cadeia longa do DGPP, PA e DAG. Como mostrado na Figura 35, nenhum dos lípidos incluídos no painel de teste teve um efeito inibidor ou estimulador significativo nas células de controlo tratadas com solvente. Apenas o DGPP 8:0 inibiu a proliferação

induzida pelo LPA. Nem o DGPP 18:1 nem os PA e DAG de cadeia longa e curta tiveram qualquer efeito na proliferação induzida pelo LPA. É interessante observar que neste ensaio o PA 8:0 não teve inibição significativa.

Discussão dos Exemplos 13-15

As células RH7777 foram utilizadas para a expressão heteróloga dos receptores Edg-2, Edg-4 e Edg-7 para seleccionar antagonistas potenciais. Com base no nosso modelo computacional anterior dos receptores Edg (Parrill et al. 2000) e nos dados disponíveis sobre estrutura-actividade (Jalink et al., 1995), os resultados experimentais supracitados indicam que o fosfatidato de cadeia curta DGPP 8:0 é um antagonista selectivo e competitivo de Edg-7, com um valor CI_{50} de 285 ± 28 nM. Verificou-se que a mesma molécula é um inibidor fraco do Edg-2, com um valor de CI_{50} de $11,0 \pm 0,68$ μ M, ao passo que não inibiu o Edg-4. O DGPP 8:0 inibiu a resposta endógena do LPA em oócitos de *Xenopus* com um valor de CI_{50} de 96 ± 21 nM. O PA 8:0 apresentou propriedades inibidoras semelhantes. Portanto, estes fosfatidatos de cadeia curta mostram uma selectividade 40 a 100 vezes maior para o Edg-7 em relação ao Edg-2.

Os resultados anteriores obtidos com os fosfatidatos de cadeia curta confirmam os de Bando et al. (2000), que demonstraram que o LPA com uma cadeia acilo igual ou inferior a doze carbonos não desencadeia respostas em células de insecto que expressam Edg-2, Edg-4 ou Edg-7. Como se demonstrou acima, o LPA 8:0 não foi agonista nem antagonista de Edg-2, Edg-4 ou Edg-7 num sistema de expressão de mamífero. O Edg-7 tem uma preferência 10 vezes maior para o LPA com a cadeia de ácido gordo esterificada em *sn*-2, em comparação com a posição *sn*-1 (Bando et al., 2000). Portanto, a distância da cadeia de hidrocarboneto em relação à porção fosfato não suprime a ligação ao receptor e a activação deste último. O Edg-7 também mostra uma preferência pelos ácidos gordos insaturados de cadeia longa em relação às suas contrapartidas saturadas. A presença de uma ligação éter ou de uma cadeia lateral de éter vinílico também diminuiu a CE_{50} em duas ordens de grandeza (Bando et al., 2000). Além disso, existe um comprimento óptimo da cadeia de hidrocarboneto de 18 carbonos,

enquanto que os análogos com 20 carbonos foram agonistas mais fracos. Estas propriedades farmacológicas de Edg-7 sugerem que a activação do receptor depende do comprimento da cadeia, assim como da flexibilidade da cadeia lateral (ligação éster vs. éter).

O modelo computacional do receptor Edg-1 identificou três resíduos carregados que são necessários para a ligação ao ligando. Um destes resíduos, a arginina 120, que se prevê interagir com o grupo fosfato, é conservado em todos os membros da família Edg. O segundo resíduo, a arginina 292, ocorre numa posição na qual todos os membros da família Edg, com excepção do Edg-8, possuem um resíduo catiónico próximo. O terceiro resíduo, o glutamato 121, não é conservado entre os receptores Edg específicos do LPA, com uma glutamina no local correspondente em Edg-2, Edg-4 e Edg-7. Prevê-se que este resíduo de glutamina vá interagir com a porção hidroxilo do LPA. A substituição deste resíduo pela alanina produziu uma perda da ligação ao ligando e da activação do receptor, sugerindo que é necessária a interacção iónica entre as porções carregadas do farmacóforo PLGF e estes três resíduos para a ligação ao ligando em Edg-1 (Parrill *et al.*, 2000). Além disso, a interacção entre o receptor e a cadeia de hidrocarboneto propriamente dita não foi suficiente para a ligação ao ligando e a sua activação (Parrill *et al.*, 2000). Portanto, colocou-se a hipótese de que é necessária uma combinação de interacções que englobam a âncora iónica e a cauda hidrófoba para activação do agonista. Os resultados supracitados apoiam esta hipótese, demonstrando que o LPA 8:0 de cadeia curta não conseguiu activar Edg-2, Edg-4 ou Edg-7, realçando a importância da interacção entre a cauda hidrófoba e a bolsa de ligação ao ligando. Em consequência, os requerentes designaram a cauda hidrófoba como a região "de comutação" (*switch*) do farmacóforo PLGF. Devido à tolerância relativa das substituições *sn*-1 e *sn*-2 dos ácidos gordos demonstrada por estes receptores, os requerentes concentraram-se nos fosfatidatos de cadeia curta, que se julgou não conseguirem activar os receptores devido às suas cadeias de hidrocarboneto truncadas. A mobilidade estrutural das cadeias de acilo nos fosfatidatos também é limitada pela porção adjacente de ácido gordo. Os requerentes também exploraram os efeitos de uma porção pirofosfato, que não

altera o carácter carregada negativamente da região de ancoragem mas que, pelo contrário, aumenta a carga.

Este desenho conceptual de fármacos foi testado em linhas celulares clonais que expressam os receptores Edg-2, Edg-4 e Edg-7. Verificou-se que as propriedades farmacológicas de DGPP 8:0 e de PA 8:0 eram dramaticamente diferentes nos três receptores. As duas moléculas foram eficazes para inibirem o Edg-7, mas foram menos eficazes em mais de uma ordem de grandeza para o Edg-2. Nenhuma molécula teve eficácia no Edg-4. Também se verificou que o DGPP 8:0 foi um inibidor competitivo do Edg-2 e do Edg-7, desviando as curvas da relação dose-resposta para a direita com um aumento subsequente dos valores de CE_{50} do LPA nos dois receptores. A ausência de actividade agonista nas espécies correspondentes de cadeia longa do PA e do DGPP faz realçar as restrições que predominam na bolsa de ligação. A importância da âncora iónica na união do ligando na bolsa de ligação é apoiada pela ausência de inibição demonstrada pelo DAG 8:0, embora os seus efeitos celulares sejam provavelmente confundidos com as suas acções intracelulares noutros alvos moleculares, como a PKC.

Tanto o PA como o DGPP são fosfolípidos de ocorrência natural. O DGPP (8:0) foi descoberto em 1993 em plantas como um novo lípido e é um produto da fosforilação do PA pela fosfatidato-cinase (Wissing e Behrbohm, 1993; Munnik *et al.*, 1996). O DGPP foi identificado em bactérias, leveduras e plantas, mas não em células de mamífero. Estudos recentes revelaram que o DGPP activa os macrófagos e estimula a produção de prostaglandinas através da activação da fosfolipase A_2 citosólica, sugerindo um papel para o DGPP na resposta inflamatória (Balboa *et al.*, 1999; Balsinde *et al.*, 2000). Estes autores puseram de parte a possibilidade de que estes efeitos fossem mediados através dos receptores do LPA. Os resultados anteriores com os análogos de cadeia longa do DGPP e do PA confirmaram esta noção, dado que estes compostos não possuíam propriedades agonistas nas linhas celulares que expressam os receptores Edg em concentrações até 10 μ M.

O efeito dos fosfatidatos de cadeia curta também foi examinado nos receptores do LPA expressos de forma endógena em três tipos de células diferentes. Verificou-se que o DGPP 8:0

e o PA 8:0 foram inibidores eficazes das correntes de Cl^- desencadeadas pelo LPA em oócitos de *Xenopus*. Com o objectivo de determinar o local de acção, o DGPP 8:0 foi injectado em oócitos seguido da aplicação extracelular de LPA. O DGPP 8:0 apenas foi eficaz na inibição das correntes de Cl^- desencadeadas pelo LPA quando foi aplicado por via extracelular, demonstrando que exerce o seu efeito antagonista na superfície da célula. A especificidade de DGPP 8:0 para os receptores do LPA foi demonstrada em oócitos e em células NIH3T3. Nestas células, o DGPP 8:0 apenas foi eficaz para inibir as respostas de Ca^{2+} desencadeadas pelo LPA e não as respostas desencadeadas pelo S1P, acetilcolina ou serotonina.

A análise por RT-PCR revelou que só o receptor Edg-2 é expresso em células NIH3T3 e não os receptores Edg-4 e Edg-7. Nas células NIH3T3, um excesso de 100 vezes de DGPP 8:0 só inibiu as respostas de Ca^{2+} em 40%. Este grau de inibição é equivalente ao que foi observado na linha celular estável que expressa Edg-2, na qual também foi um inibidor fraco. Quando se avaliaram o DGPP e o PA de cadeia curta em células HEY do cancro do ovário, em quantidade 10 vezes superior à de LPA, ambos foram inibidores eficazes, enquanto que nenhuma das moléculas de cadeia longa teve qualquer efeito. A RT-PCR revelou que em células HEY o ARNm predominante foi para o Edg-7, enquanto que só se detectou um vestígio de ARNm para o Edg-2. Este grau de inibição é equivalente ao que foi observado na linha celular estável que expressa Edg-7, em que tanto o DGPP 8:0 como o PA 8:0 foram inibidores eficazes.

Os dois fosfatidatos de cadeia curta foram avaliados quanto à sua capacidade para bloquear a proliferação das células NIH3T3 induzida pelo LPA. O DGPP 8:0 inibiu eficazmente a proliferação induzida pelo LPA, enquanto que o DGPP de cadeia longa não o fez. Embora o PA 8:0 fosse eficaz para inibir as respostas de Ca^{2+} , não foi eficaz para inibir a proliferação celular. Estes resultados estão de acordo com uma comunicação anterior que cita que o PA (12:0) não inibiu o efeito mitogénico do PA 18:1 (van Corven *et al.*, 1992). A estabilidade das moléculas em ensaios prolongados constitui um problema dado que as fosfatases lipídicas podem inactivar o antagonista. O facto de que o PA e o DAG não conseguiram inibir a proliferação sugere que o DGPP 8:0 é provavelmente o

mais estável para o período de duração deste ensaio. A estabilidade do DGPP também foi demonstrada por Balboa *et al.* (1999), que comunicaram que o DGPP não foi metabolizado durante o decorrer das suas experiências.

O DGPP 8:0 proporciona uma nova ferramenta importante para a área que está a ser estudada, não só dos receptores Edg mas também de outros receptores dos PLGF. O conceito de uma âncora iónica e de uma região de comutação hidrófoba do farmacóforo PLGF, que teve origem em modelos computacionais da família dos Edg, deve auxiliar a concepção e síntese de novos inibidores.

Exemplo 16 - Síntese de fosfatos intermediários de cadeia linear 101-105

Composto 101: Éster dibenzilbutílico do ácido fosfórico

Dissolveram-se 74 mg (1,00 mmol) de n-butanol anidro e 365 mg (5,17 mmol) de 1H-tetrazole em 34 ml de cloreto de metileno anidro num balão de fundo redondo de 100 ml. Adicionou-se com uma seringa uma solução de 0,895 g (2,58 mmol) de dibenzil-N,N-diisopropil-fosforamidito em 5 ml de cloreto de metileno anidro em atmosfera de árgon, com agitação. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. A mistura reaccional foi depois arrefecida num banho de álcool isopropílico/neve carbónica a -38°C. Adicionou-se gota a gota através de um funil de adição, 0,815 g (3,43 mmol) de ácido peracético a 32% em 28 ml de cloreto de metileno anidro. Após a adição, a temperatura da mistura reaccional foi aumentada para ~0°C com um banho de gelo. A mistura reaccional foi agitada no banho de gelo durante 1 hora. A mistura reaccional foi transferida para um funil de separação e diluída com 200 ml de cloreto de metileno. A camada orgânica foi lavada com metabissulfito de sódio a 10% (2 x 40 ml), bicarbonato de sódio saturado (2 x 40 ml), água (30 ml) e salmoura (40 ml). A camada orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob vácuo até à secura. O produto bruto foi depois purificado por cromatografia com sílica-gel utilizando como eluente uma mistura 1:1 de hexanos/acetato de etilo, para dar o composto **101** (309 mg que continham uma ligeira quantidade de impurezas resultantes do excesso de reagente de fosforilação) sob a

forma de um óleo límpido: ^1H RMN (CDCl_3) 0,88 (t, $J=7,2$ Hz, 3H, CH_3), 1,34 (sexteto, $J=7,2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,59 (quinteto, $J=6,6$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,99 (dt, $J=6,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 5,02 (d, $J=1,8$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 5,05 (d, $J=2,1$ Hz, 2H, OCH_2Ar), 7,35 (sl, 10H, 2 x ArH); ^{13}C RMN (CDCl_3) 13,55, 18,60, 32,16 (d, $J_{\text{C,P}} = 6,8$ Hz), 67,72 (d, $J_{\text{C,P}} = 6,1$ Hz), 69,13 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,5$ Hz), 127,90, 128,47, 128,55, 136,00 (d, $J_{\text{C,P}} = 6,8$ Hz); ^{31}P RMN (CDCl_3) 16,84; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]$ para m/z 357,3.

Composto 102: Éster dibenziloctílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 130 mg (1,00 mmol) de n-octanol anidro e realizou-se um procedimento análogo ao do composto **101**. O produto bruto foi depois purificado por cromatografia em sílica-gel utilizando como eluente uma mistura 7:3 de hexanos/acetato de etilo, para dar o composto **102** (351 mg, 90%) sob a forma de um óleo límpido. ^1H RMN (CDCl_3) 0,88 (t, $J=6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,24 (sl, 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 (sl, 10H, 2 x ArH); ^{13}C RMN (CDCl_3) 14,09, 22,62, 25,38, 29,06, 29,14, 30,17 (d, $J_{\text{C,P}} = 6,9$ Hz), 31,75, 68,05 (d, $J_{\text{C,P}} = 6,2$ Hz), 69,12 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,5$ Hz), 127,90, 128,47, 128,56, 135,97 (d, $J_{\text{C,P}} = 6,9$ Hz); ^{31}P RMN (CDCl_3) 16,83; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ para m/z 413,4.

Composto 103: Éster dibenzildodecílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 186 mg (1,00 mmol) de n-butanol anidro e realizou-se um procedimento análogo ao do composto **101**. O produto bruto foi depois purificado por cromatografia em sílica-gel utilizando como eluente uma mistura 7:3 de hexanos/acetato de etilo, para dar o composto **103** (361 mg, 81%) sob a forma de um óleo límpido: ^1H RMN (CDCl_3) 0,88 (t, $J=7,2$ Hz, 3H, CH_3), 1,24 (sl, 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 (sl, 10H, 2 x ArH); ^{13}C RMN (CDCl_3) 14,13, 22,69, 25,38, 29,12, 29,35, 29,49, 29,56, 29,63, 30,18 (d, $J_{\text{C,P}} = 7,0$ Hz), 31,92, 68,05 (d, $J_{\text{C,P}} =$

6,1 Hz), 69,12 (d, $J_{C,P} = 5,4$ Hz), 127,89, 128,46, 128,55, 135,97 (d, $J_{C,P} = 6,8$ Hz); ^{31}P RMN (CDCl_3) 16,84; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ para m/z 469,1.

Composto 104: Éster dibenziloctadecílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 270 mg (1,00 mmol) de octadecanol e realizou-se o mesmo procedimento que para o composto **101**. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica-gel utilizando como eluente uma mistura 7:3 de hexanos/acetato de etilo, para dar o composto **104** (474 mg, 89%) sob a forma de um sólido branco higroscópico: p.f.: 32°C–33°C; ^1H RMN (CDCl_3) 0,88 (t, $J=6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,25 (sl, 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 (sl, 10H, 2 x ArH); ^{13}C RMN (CDCl_3) 14,12, 22,70, 25,40, 29,13, 29,38, 29,51, 29,58, 29,68, 29,72, 30,20 (d, $J_{C,P} = 6,9$ Hz), 31,94, 68,06 (d, $J_{C,P} = 6,1$ Hz), 69,14 (d, $J_{C,P} = 5,4$ Hz), 127,90, 128,47, 128,55, 136,00 (d, $J_{C,P} = 6,8$ Hz); ^{31}P RMN (CDCl_3) 16,83; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ para m/z 553,3.

Composto 105: Éster dibenzildocosanílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 327 mg (1,00 mmol) de docosanol e realizou-se um procedimento análogo ao do composto **101**. O produto bruto foi depois purificado por cromatografia em sílica-gel utilizando como eluente uma mistura 7:3 de hexanos/acetato de etilo, para dar o composto **105** (516 mg, 88%) sob a forma de um sólido branco higroscópico: p.f.: 43,5–44,5°C; ^1H RMN (CDCl_3) 0,88 (t, $J=6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,25 (sl, 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 (sl, 10H, 2 x ArH); ^{13}C RMN (CDCl_3) 14,13, 22,70, 25,39, 29,12, 29,37, 29,50, 29,57, 29,66, 29,71, 30,18 (d, $J_{C,P} = 6,9$ Hz), 31,93, 68,06 (d, $J_{C,P} = 6,0$ Hz), 69,13 (d, $J_{C,P} = 5,6$ Hz), 127,89, 128,47, 128,55, 135,98 (d, $J_{C,P} = 6,9$ Hz); ^{31}P RMN (CDCl_3) 16,83; MS (modo positivo): $[\text{M} + ^{23}\text{Na}]^+$ para m/z 609,3.

Exemplo 17 - Síntese de compostos de fosfato de cadeia linear 106-110**Composto 106: Éster monobutílico do ácido fosfórico**

Dissolveram-se 200 mg (0,60 mmol) do composto **101** em 30 ml de metanol anidro num recipiente de pressão de parede reforçada. Purgou-se o recipiente com árgon e adicionaram-se ~200 mg de Pd/C a 10%. O recipiente foi ligado a um aparelho de hidrogenação e manteve-se uma atmosfera de hidrogénio de ~50 psi no interior do recipiente de reacção à temperatura ambiente durante 8 horas. A mistura reaccional foi depois filtrada por acção de vácuo através de uma camada de celite que foi lavada com metanol. O solvente foi evaporado sob vácuo deixando 70 mg (86%) de um óleo amarelo **106**. ^1H RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 0,95 (t, $J=7,2$ Hz, 3H, CH_3), 1,43 (sexteto, $J=7,5$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,66 (quinteto, $J=6,9$, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,99 (td, $J=6,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 13,71, 19,02, 32,72 (d, $J_{\text{C,P}} = 7,2$ Hz), 66,86 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,5$ Hz); ^{31}P RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 18,84; MS (modo negativo): $[\text{M} - 1]^-$ para m/z 153,0.

Composto 107: Éster mono-octílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 200 mg (0,51 mmol) do composto **102** e, utilizando um procedimento análogo ao do composto **106**, isolaram-se 100 mg (93%) do composto **107** sob a forma de um sólido viscoso branco/amarelo: ^1H RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 0,89 (t, $J=6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,29 (sl, 10H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1,67 (quinteto, $J=6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 3,97 (dt, $J=6,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$); ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 14,18, 22,98, 25,89, 29,57, 29,58, 30,76 (d, $J_{\text{C,P}} = 7,3$ Hz), 32,18, 67,16 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,2$ Hz); ^{31}P RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 20,55; MS (modo negativo): $[\text{M} - 1]^-$ para m/z 209,1.

Composto 108: Éster monododecílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 200 mg (0,45 mmol) do composto **103** e utilizou-se um procedimento análogo ao do composto **106** para dar 112 mg (94%) do composto **108** sob a forma de um sólido branco. ^1H RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) 0,88 (t, $J=6,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,27 (sl, 18H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 1,67 (quinteto, $J=6,6$ Hz, 2H,

$\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 3,97 (dt, $J=6,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$); ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14,21, 22,98, 25,84, 29,57, 29,67, 29,89, 29,92, 29,96, 29,98, 30,69 (d, $J_{\text{C,P}} = 7,4$ Hz), 32,25, 67,22 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,7$ Hz); ^{31}P RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 21,22; MS (modo negativo): $[\text{M} - 1]^-$ para m/z 265,0.

Composto 109: Éster mono-octadecílico do ácido fosfórico

Utilizaram-se 200 mg (0,38 mmol) do composto **104** e utilizou-se um procedimento análogo ao do composto **106** que produziu 104 mg (79%) do composto **109** sob a forma de um sólido branco. ^1H RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0,89 (t, $J=6,9$ Hz, 3H, CH_3), 1,27 (sl, 30H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 1,68 (quinteto, $J=6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$), 3,98 (dt, $J=6,6$ Hz, 6,9 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$); ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14,26, 23,14, 26,01, 29,74, 29,84, 30,06, 30,09, 30,16, 30,87 (d, $J_{\text{C,P}} = 7,2$ Hz), 32,42, 67,32 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,8$ Hz); ^{31}P RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 21,69; MS (modo negativo): $[\text{M} - 1]^-$ para m/z 349,1.

Composto 110: Éster monodocosílico do ácido fosfórico

Dissolveram-se 200 mg (0,34 mmol) do composto **105** e utilizou-se o mesmo procedimento do composto **106** produzindo 98 mg (71%) do composto **110** sob a forma de um sólido branco. ^1H RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 0,88 (t, $J=6,9$ Hz, 3H), 1,26 (sl, 38H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 1,66 (quinteto, $J=6,9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$), 3,97 (td, $J=6,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{19}\text{CH}_3$); ^{13}C RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 14,22, 23,01, 25,87, 29,61, 29,71, 29,93, 29,97, 30,04, 30,73 (d, $J_{\text{C,P}} = 7,4$ Hz), 32,29, 67,27 (d, $J_{\text{C,P}} = 5,6$ Hz); ^{31}P RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) 20,66; MS (modo negativo): $[\text{M} - 1]^-$ para m/z 405,1.

Exemplo 18 - Compostos de fosfato de cadeia linear 106-110

Os oócitos de *Xenopus* que expressam endogenamente os PLGFR PSP24 foram utilizados para rastrear os compostos **106-110** no que respeita à sua actividade inibidora do LPA. Os oócitos foram obtidos de rãs adultas *Xenopus laevis* anestesiadas com xilazina (Carolina Scientific, Burlington, NC) em condições assépticas e preparados para a experiência. A camada de células foliculares de oócitos de Fase V-VI foi removida por tratamento com colagenase tipo A (Boehringer, IN) a 1,4 mg/ml

numa solução de Ringer 2 para ovário isenta de Ca^{2+} ((OR-2) NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,5, com NaOH). Os oócitos foram mantidos numa solução de Barth numa incubadora entre 17–20°C e foram utilizados durante 2 a 7 dias após isolamento.

Os registos electrofisiológicos foram efectuados utilizando um amplificador padrão de potencial imposto de dois eléctrodos mantendo o potencial da membrana a -60 mV (GeneClamp 500, Axon Instruments, CA). Os compostos de teste foram dissolvidos em MeOH, complexados com BSA isento de ácidos gordos, diluídos com solução de Ringer- Na^+ para rã (NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 1,8 mM, HEPES 5 mM, pH 7,0) e aplicados por super-perfusão nos oócitos a um caudal de 5 ml/min. As correntes de membrana foram registadas com um osciloscópio digital NIC-310 (Nicolet, Madison, WI). As aplicações foram efectuadas a intervalos de 15 minutos (mínimo) para permitir a eliminação apropriada e recuperação da dessensibilização.

Na Figura 36 apresenta-se a inibição dependente da dose das correntes de cloreto induzidas pelo LPA produzida pelos compostos **106–110**. O composto **108** foi o melhor inibidor, com um valor de CI_{50} de cerca de 8,1 nM. Os compostos com grupos alquilo de cadeia linear mais longa ou mais curta demonstraram possuir uma eficácia decrescente na inibição das correntes de cloreto induzidas pelo LPA, embora o composto **107** apresentasse uma eficácia semelhante, com um valor de CI_{50} de cerca de 10,2 nM. A Figura 37 compara os valores de CE_{50} da solução de controlo positivo (LPA sozinho), 25 nM, e de uma solução contendo LPA e 100 nM do composto **108**, 343 nM. Portanto, o composto **108** inibe eficazmente a sinalização pelo LPA de receptores PSP24 nos oócitos de *Xenopus*.

Com base nos resultados acima, o composto **108** também foi examinado no que respeita à sua eficácia como antagonista dos receptores Edg-2, Edg-4 e Edg-7 em células RH7777 que expressam os receptores individuais de forma heteróloga.

Na Figura 38 apresenta-se o efeito do composto **108** nas respostas de Ca^{2+} de células que expressam Edg-2, Edg-4 e Edg-7 quando expostas a uma combinação de LPA 18:1 e do

composto **108**. Para estas experiências escolheu-se uma concentração de LPA próxima do valor de CE_{50} . O composto **108** inibiu significativamente as respostas de Ca^{2+} para cerca de 63% e 56% do controlo, respectivamente, nas linhas celulares que expressam Edg-2 e Edg-7. Pelo contrário, o composto **108** aumentou significativamente as respostas de Ca^{2+} para cerca de 148% do controlo em linhas celulares que expressam Edg-4.

Portanto, prevê-se que os fosfatos de cadeia linear inibem selectivamente a actividade de Edg-2 e de Edg-7 *in vivo* e aumentam selectivamente a actividade de Edg-4 *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

Cada uma das referências listada abaixo está integralmente incorporada por referência na descrição deste pedido de patente.

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).

An et al., "Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids", *FEBS Lett.* **417**:279-282 (1997a).

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).

An et al., "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid", *J. Biol. Chem.* **273**:7906-7910 (1998a).

An et al., "Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization", *Mol. Pharmacol.* **54**:881-888 (1998b).

Balazs et al., "Topical application of LPA accelerates wound healing", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **905**:270-273 (2000).

Balboa et al., "Proinflammatory macrophage-activating properties of the novel phospholipid diacylglycerol pyrophosphate", *J. Biol. Chem.* **274**:522-526 (1999).

Balsinde et al., "Group IV cytosolic phospholipase A2 activation by diacylglycerol pyrophosphate in murine P388D1 macrophages", *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:11-15(2000).

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).

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).

Bishop and Bell, "Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation", *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:579-610 (1988).

Bittman et al., "Inhibitors of lipid phosphatidate receptors: N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids", *J. Lipid Res.* **37**:391-398 (1996).

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 PC 12 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).

Fernhout 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 vzg-1/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. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:14367-14372 (1996).

Hecht et al., "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic 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, Rac1, 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, em: *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way, Appleton & Lange), pp. 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. Natl. 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, 1-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).

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.* **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, pp. 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).

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).

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).

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).

Tigyi and Miledi, "Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells", *J. Biol. Chem.* **267**:21360-21367 (1992).

Tigyi et al., "Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1908-1912 (1994).

Tigyi et al., "Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC 12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho", *J. Neurochem.* **66**:537-548 (1996).

Tigyi et al., "Pharmacological characterization of phospholipid growth factor receptors", *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:34-53 (2000).

Tokumura et al., "Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acid on the arterial blood pressure of different animal species", *Lipids* **13**:572-574 (1978).

Tokumura et al., "Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats", *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **245**:74-83 (1980).

Tokumura et al., "Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**:391-398 (1981).

Tokumura *et al.*, "Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma", *Biochim. et. Biophys. Acta.* **875**:31-38 (1986).

Tokumura *et al.*, "Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta", *Am. J. Physiol.* **267**:204-210 (1994).

Tokumura, "A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism, and bioactions", *Prog. Lipid Res.* **34**:151-184 (1995).

Umansky *et al.*, "Prevention of rat neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by stimulated in vitro ischemia and reperfusion", *Cell Death Diff.* **4**:608-616 (1997).

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).

van Brocklyn *et al.*, "Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6", *Blood* **95**:2624-2629 (2000).

van Corven *et al.*, "Lysophosphatidic-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins", *Cell* **59**:45-54 (1989).

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).

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).

van der Bend et al., "Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid", *EMBO*. **11**:2495-2501 (1992b).

Verrier et al., "Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene", *EMBO J.*, **5**:913-917 (1986).

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).

Xu et al., "Effect of lysophospholipids on signaling in the human Jurkat T cell line", *J. Cell. Physiol.*, **163**:441-450 (1995b).

Yatomi et al., "Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets", *Blood* **86**:193-202 (1995).

Zhou et al., "Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes", *J. Biol. Chem.* **270**:25549-25556 (1995).

Zsiros et al., "Naturally occurring inhibitors of lysophosphatidic acid", *Abstr. 6th. International Congress on Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators*, p.128 (1998).

Embora as concretizações preferidas tenham sido representadas e descritas em detalhe neste documento, será evidente para os peritos na especialidade relevante que podem ser feitas diversas modificações, adições, substituições e outras semelhantes sem nos desviarmos do princípio da invenção e, portanto, considera-se que estas estão dentro do âmbito da invenção, tal como definido nas reivindicações que se seguem.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> The University of Tennessee Research Corporation

<120> AGONISTAS E ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DO LPA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

<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

```

atggctgcca tctctacttc catccctgta atttcacagc cccagttcac agccatgaat 60
gaaccacagt gcttctacaa cgagtcacatt gccttctttt ataaccgaag tggaaagcat 120
cttgccacag aatggaacac agtcagcaag ctggtgatgg gacttggaat cactgtttgt 180
atcttcatca tgttggccaa cctatiggtc atggtggcaa tctatgtcaa ccgcgccttc 240
cattttccta tttattacct aatggctaata ctggctgctg cagacttctt tgcctgggtg 300
gctacttct atctcatgtt caacacagga cccaatactc ggagactgac tgttagcaca 360
tggctectgc gtcagggcct cattgacacc agcctgaagg catctgtggc caacttactg 420
gctattgcaa tcgagaggea cattacggtt ttccgcctgc agctccacac aaggatgagc 480
aaccgggggg tagtggtggt cattgtgggc atctggacta tggccatcgt tatgggtgct 540
ataccacagt tgggtggaa ctgtatctgt gatattgaaa attgttccaa catggcaccc 600
ctctacagtg actcttactt agtcttctgg gccattttca ccttgggtgac ctttgttggt 660
atggtgggtc tctatgctca catctttggc tatgttgcgc agaggactat gagaatgtct 720
cggcatagtt ctggaccccg gcggaatcgg gataccatga tgagtcttct gaagactgtg 780
gtcattgtgc ttggggcctt tatcatctgc tggactcttg gattgggttt gttacttcta 840
gacgtgtgct gtccacagtg cgacgtgctg gcctatgaga aattcttctt tctccttgc 900
gaattcaact ctgccatgaa ccccatcatt tactctacc ggcacaaaga aatgagcgcc 960
acctttaggc agatcctctg ctgccagcgc agtgagaacc ccnccggccc cacagaaagc 1020
tcagaccgct cggcttctct cctcaaacac accatcttgg ctggagttca cagcaatgac 1080
cactctgtgg tttag

```

1095

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 2

Met	Ala	Ala	Ile	Ser	Thr	Ser	Ile	Pro	Val	Ile	Ser	Gln	Pro	Gln	Phe	1	5	10	15
Thr	Ala	Met	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Phe	Tyr	Asn	Glu	Ser	Ile	Ala	Phe	20	25	30	
Phe	Tyr	Asn	Arg	Ser	Gly	Lys	His	Leu	Ala	Thr	Glu	Trp	Asn	Thr	Val	35	40	45	
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
His	Phe	Pro	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Phe	85	90	95	
Phe	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Met	Phe	Asn	Thr	Gly	Pro	Asn	100	105	110	
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	
Glu	Arg	His	Ile	Thr	Val	Phe	Arg	Met	Gln	Leu	His	Thr	Arg	Met	Ser	145	150	155	160
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	
Glu	Asn	Cys	Ser	Asn	Met	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Ser	Tyr	Leu	Val	195	200	205	
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

Arg His Ser Ser Gly Pro Arg Arg Asn Arg Asp Thr Met Met Ser Leu
 245 250 255
 Leu Lys Thr Val Val Ile Val Leu Gly Ala Phe Ile Ile Cys Trp Thr
 260 265 270
 Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp
 275 280 285
 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
 Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys Cys Gln Arg Ser Glu Asn Pro Thr Gly
 325 330 335
 Pro Thr Glu Ser Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile
 340 345 350
 Leu Ala Gly Val His Ser Asn Asp His Ser Val Val
 355 360

<210> 3

<211> 1056

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 3

atggtcatca tgggccagtg ctactacaac gagaccatcg gcttcttcta taacaacagt 60
 ggcaaagagc tcagctacca ctggggggccc aaggatgtgg tegtgggtggc aotggggctg 120
 accgtcagcg tgctggtgct gctgaccaat ctgctggtea tagcagccat cgcctccaac 180
 cgcgcttcc accagcccat ctactacctg ctggcaate tggccgcggc tgacctcttc 240
 gggggcgtag cctacctctt cctcatgttc cacaactggc cccgcacagc cgcactttca 300
 cttgagggct ggttctctgc gcagggcttg ctggacacaa gctcactgc gtgggtggcc 360
 acaactgctg ccctgcgcgt ggagcggcac cgcagtgtga tggccgtgca gctgcacagc 420
 cgcctgcccc gtggccgcgt ggtcatgttc attgtggcg tgtgggtggc tgccctgggc 480
 ctggggctgc tgctgcccc ctcttgccac tgctctgtg ccttgaccg ctgctcacgc 540
 atggcaccoc tgctcagccg ctctattttg gccgtctggg ctctgtcgag cctgcttgtc 600
 ttctgtctca tgggtgctgt gtacaccgcg attttctct aagtgcggcg gcgagtgcag 660
 cgcattggcag agcatgtcag ctgccacccc cgtaccgag agaccacgct cagcctggtc 720
 aagactgttg tcatcatcct gggggcgctt gtgggtctgt ggacaccagg ccagggtggt 780
 ctgctcctgg atggtttagg ctgtgagtc tgcaatgtcc tggctgtaga aaagtacttc 840
 ctactgttgg ccgaggccaa ctcaactggc aatgctgctg tgtactcttg ccgagatgct 900
 gagatgcgcc gcaccttcgc ccgccttctc tgetgcgcgt gctccgcca gtccaccgc 960

gagttctgtcc actatacacc ctctgcccag ggaggtgccg gcactcgcac catgcttccc 1020
 gagaacgggc acccactgat ggactccacc cttag 1056

<210> 4

<211> 351

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Ile Phe Phe Tyr Val Arg Arg Arg Val Gln Arg Met Ala Glu
 210 215 220
 His Val Ser Cys His Pro Arg Tyr Arg Glu Thr Thr Leu Ser Leu Val
 225 230 235 240
 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
 Val Leu Ala Val Glu Lys Tyr Phe Leu Leu Leu Ala Glu Ala Asn Ser
 275 280 285
 Leu Val Asn Ala Ala Val Tyr Ser Cys Arg Asp Ala Glu Met Arg Arg
 290 295 300
 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 Gln Gly Gly Ala Ser Thr Arg
 325 330 335
 Ile Met Leu Pro Glu Asn Gly His Pro Leu Met Asp Ser Thr Leu
 340 345 350

<210> 5

<211> 1062

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 5

atgaatgagt gtcactatga caagcacatg gacttttttt ataataggag caacactgat 60
 actgtcgatg actggacagg aacaaagctt gtgattgttt tgtgtgttgg gacgtttttc 120
 tgccgtgttta tttttttttc taattctctg gtcctcggg cagtgatcaa aaacagaaaa 180
 tttcatttcc ccttctacta cctgttggct aatttagctg ctgccgattt ctccgctgga 240
 attgcctatg tattcctgat gtttaacaca ggcccagttt caaaaacttt gactgtcaac 300
 cgctggtttc tccgtcaggg gcttctggac agtagcttga ctgcttccct caaccaacttg 360
 ctggttatcg ccgtggagag gcacatgtca atcatgagga tgcgggtcca tagcaacctg 420
 accaaaaaga gggtgacact gctcattttg cttgtctggg ccctcggcat ttttatgggg 480
 ggggtcccca cactgggctg gaattgctc tgaacatct ctgctgtctc ttccctggcc 540
 ccattttaca gcaggagtta ccttgttttc tggacagtgt ccaacctcat ggcttctc 600
 atcatggttg tgggtgtacct gggatctac gtgtacgtca agaggaaac caacgtcttg 660
 tctccgcata caagtgggtc catcagccgc cggaggacac ccctgaagct aatgaagacg 720
 gtgatgactg tcttaggggc gtttgtggtg tgcctggacc cgggcctggt ggttctgctc 780

```

ctcgaaggcc tgaactgcag gcagtggtgc gtgcagcatg tgaasaggtg gttcctgctg 840
ctggcgctgc tcaactccgt cgtgaacccc atcactact cctacaagga cgaggacatg 900
tatggcacca tgaagaagat gatctgctgc ttctctcagg agaaccaga gaggcgtccc 960
tctcgcatcc cctccacagt cctcagcagg agtgacacag gcagccagta catagaggat 1020
agtattagcc aaggtgcagt ctgcaataaa agcacttct aa 1062

```

<210> 6

<211> 353

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 6

```

Met Asn Glu Cys His Tyr Asp Lys His Met Asp Phe Phe Tyr Asn Arg
 1           5           10           15

```

```

Ser Asn Thr Asp Thr Val Asp Asp Trp Thr Gly Thr Lys Leu Val Ile
          20           25           30

```

```

Val Leu Cys Val Gly Thr Phe Phe Cys Leu Phe Ile Phe Phe Ser Asn
          35           40           45

```

```

Ser Leu Val Ile Ala Ala Val Ile Lys Asn Arg Lys Phe His Phe Pro
          50           55           60

```

```

Phe Tyr Tyr Leu Leu Ala Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Phe Ala Gly
          65           70           75           80

```

```

Ile Ala Tyr Val Phe Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Val Ser Lys Thr
          85           90           95

```

```

Leu Thr Val Asn Arg Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp Ser Ser
          100          105          110

```

```

Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asn Leu Leu Val Ile Ala Val Glu Arg His
          115          120          125

```

```

Met Ser Ile Met Arg Met Arg Val His Ser Asn Leu Thr Lys Lys Arg
          130          135          140

```

```

Val Thr Leu Leu Ile Leu Leu Val Trp Ala Ile Ala Ile Phe Met Gly
          145          150          155          160

```

```

Ala Val Pro Thr Leu Gly Trp Asn Cys Leu Cys Asn Ile Ser Ala Cys
          165          170          175

```

```

Ser Ser Leu Ala Pro Ile Tyr Ser Arg Ser Tyr Leu Val Phe Trp Thr
          180          185          190

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 7

<211> 1260

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 7

atggtattct cggcagtgtt gactgcgttc cataccggga catccaacac aacatttgtc 60
gtgtatgaaa acacctacat gaatattaca ctccctccac cattccagca tccctgacctc 120
agtcacattgc ttagatatag ttttgaaacc atggctccca ctggtttgag ttccttgacc 180
gtgaatagta cagctgtgcc cacaacacca gcagcattta agagcctaaa cttgcctctt 240
cagatcacco tttctgctat aatgatattc attctgtttg tgtcttttct tgggaacttg 300
gttggttgcc tcatggttta ccaaaaagct gccatgaggt ctgcaattaa cctcctcctt 360
gccagcctag cttttgcaga catgttgctt gcagtgtctg acatgcctt tgccttggtg 420

```

actattctta ctaccogatg gatttttggg aaattcttct gtagggtatc tgctatgttt 480
ttctggttat ttgtgataga aggagtagcc atcctgctca tcattagcat agatagggtc 540
cttattatag tccagaggca ggataagcta aacccatata gagctaaggt totgattgca 600
gtttcttggg caacttctt ttgtgtagct ttctctttag ccgtaggaaa ccccgacctg 660
cagatacctt cccgagctcc ccagtgtgtg tttgggtaca caaccaatcc aggctaccag 720
gcttatgtga ttttgatttc tctcatttct ttcttcatac ccttctgtgt aatactgtac 780
tcatttatgg gcataactca cacccttcgg cacaatgcct tgaggatcca tagctaccct 840
gaaggatatat gctcagcca ggccagcaaa ctgggtctca tgagtctgca gagaccttcc 900
cagatgagca ttgacatggg ctttaaaaca cgtgccttca ccactatttt gattctcttt 960
gotgtcttca ttgtctgctg ggccccattc accacttaca gccttgtggc aacattcagt 1020
aagcactttt actatcagca caactttttt gagattagca cctggctact gtggctctgc 1080
taoctcaagt ctgcattgaa tccgtgtgac tactactgga ggattaagaa attocatgat 1140
gcttgcttgg acatgatgcc taagtccttc aagtttttgc cgcagctccc tggtcacaca 1200
aagcgacgga tacgtcttag tgctgtctat gtgtgtgggg aacatcggac ggtggtgtga 1260

```

<210> 8

<211> 419

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 8

```

Met Val Phe Ser Ala Val Leu Thr Ala Phe His Thr Gly Thr Ser Asn
  1             5             10             15

Thr Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Thr Tyr Met Asn Ile Thr Leu Pro
          20             25             30

Pro Pro Phe Gln His Pro Asp Leu Ser Pro Leu Leu Arg Tyr Ser Phe
          35             40             45

Glu Thr Met Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Ser Thr
          50             55             60

Ala Val Pro Thr Thr Pro Ala Ala Phe Lys Ser Leu Asn Leu Pro Leu
          65             70             75             80

Gln Ile Thr Leu Ser Ala Ile Met Ile Phe Ile Leu Phe Val Ser Phe
          85             90             95

Leu Gly Asn Leu Val Val Cys Leu Met Val Tyr Gln Lys Ala Ala Met
          100            105            110

Arg Ser Ala Ile Asn Ile Leu Leu Ala Ser Leu Ala Phe Ala Asp Met
          115            120            125

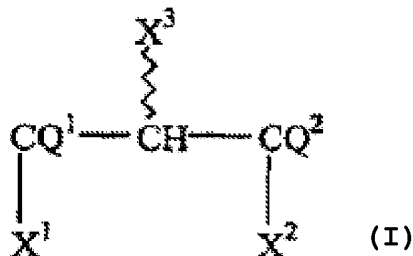
Leu Leu Ala Val Leu Asn Met Pro Phe Ala Leu Val Thr Ile Leu Thr
          130            135            140

```

Thr	Arg	Trp	Ile	Phe	Gly	Lys	Phe	Phe	Cys	Arg	Val	Ser	Ala	Met	Phe	145	150	155	160
Phe	Trp	Leu	Phe	Val	Ile	Glu	Gly	Val	Ala	Ile	Leu	Leu	Ile	Ile	Ser	165	170	175	
Ile	Asp	Arg	Phe	Leu	Ile	Ile	Val	Gln	Arg	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Pro	180	185	190	
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	
Arg	Ala	Pro	Gln	Cys	Val	Phe	Gly	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	225	230	235	240
Ala	Tyr	Val	Ile	Leu	Ile	Ser	Leu	Ile	Ser	Phe	Phe	Ile	Pro	Phe	Leu	245	250	255	
Val	Ile	Leu	Tyr	Ser	Phe	Met	Gly	Ile	Leu	Asn	Thr	Leu	Arg	His	Asn	260	265	270	
Ala	Leu	Arg	Ile	His	Ser	Tyr	Pro	Glu	Gly	Ile	Cys	Leu	Ser	Gln	Ala	275	280	285	
Ser	Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Ser	Leu	Gln	Arg	Pro	Phe	Gln	Met	Ser	Ile	290	295	300	
Asp	Met	Gly	Phe	Lys	Thr	Arg	Ala	Phe	Thr	Thr	Ile	Leu	Ile	Leu	Phe	305	310	315	320
Ala	Val	Phe	Ile	Val	Cys	Trp	Ala	Pro	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Val	325	330	335	
Ala	Thr	Phe	Ser	Lys	His	Phe	Tyr	Tyr	Gln	His	Asn	Phe	Phe	Glu	Ile	340	345	350	
Ser	Thr	Trp	Leu	Leu	Trp	Leu	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	355	360	365	
Leu	Ile	Tyr	Tyr	Trp	Arg	Ile	Lys	Lys	Phe	His	Asp	Ala	Cys	Leu	Asp	370	375	380	
Met	Met	Pro	Lys	Ser	Phe	Lys	Phe	Leu	Pro	Gln	Leu	Pro	Gly	His	Thr	385	390	395	400

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de acordo com a fórmula (I)



na qual

X^1 é $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^1-$ ou $(\text{HO})_2\text{PO}-\text{Z}^2-\text{P}(\text{OH})\text{O}-\text{Z}^1-$;

X^2 e X^3 são ambos $\text{R}^1-\text{NR}^2-\text{A}-$, sendo cada um igual ou diferente;

A é uma ligação directa, $(\text{CH}_2)_k$ em que k é um número inteiro de 0 a 30, ou 0;

Z^1 é $-\text{O}(\text{CH}_2)_m-$, em que m é um número inteiro de 1 a 50, ou $-\text{O}-$;

Z^2 é $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 50, ou $-\text{O}-$;

Q^1 e Q^2 são independentemente H_2 ou $=\text{O}$;

R^1 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono, di ou trissubstituições do anel seleccionadas do grupo de alquilos, alcoxis, ácidos e álcoois, um acilo incluindo um anel aromático, um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$; e

R^2 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono, di ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

R^7 é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono, di ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada,

na qual, quando X^1 é $(HO)_2PO-O-$, X^2 é $NHCH_3$, Q^1 é H_2 , Q^2 é $=O$, então X^3 não é $-NHR_2$, em que R_2 é um hidrogénio ou acilo substituído por metilo ou fenilo.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, no qual

Q^1 é H_2 ;

Q^2 é $=O$;

X^1 é $(HO)_2PO-Z^1-$; e

X^2 e X^3 são cada um R^1-NH- .

3. Composto de acordo com a reivindicação 2, no qual X^3 é $-NH_2$ e X^2 é R^1-NH- em que R^1 é um alquilo de cadeia C14 a C18 linear.

4. Composto de acordo com a reivindicação 3, no qual R^1 é um alquilo C14.

5. Composto de acordo com a reivindicação 3, no qual R^1 é um alquilo C18.

6. Composto de acordo com a reivindicação 2, no qual X^3 é $-NHR^1$ em que R^1 é um grupo acetilo e X^2 é $-NHR^1$ em que R^1 é um alquilo C14.

7. Composição farmacêutica compreendendo:
um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico e
um composto de acordo com a reivindicação 1.

8. Método de modulação da actividade dos receptores do LPA *in vitro* compreendendo:

proporcionar um composto de acordo com a reivindicação 1, com actividade como agonista dos receptores do LPA ou como antagonista dos receptores do LPA e

contactar um receptor de LPA *in vitro* com o composto em condições eficazes para modular a actividade do receptor do LPA.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, no qual o receptor do LPA está presente numa célula mantida em cultura.

10. Método de acordo com a reivindicação 8, no qual o receptor do LPA é seleccionado do grupo constituído por EDG-2, EDG-4, EDG-7 e PSP-24.

11. Método de acordo com a reivindicação 8, no qual o composto tem actividade como agonista dos receptores do LPA e o referido contacto é efectuado em condições eficazes para induzir a actividade do receptor do LPA.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, no qual o composto tem actividade como antagonista dos receptores do LPA e o referido contacto é efectuado em condições eficazes para reduzir a actividade do receptor do LPA.

13. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, com actividade como antagonista dos receptores do LPA para o fabrico de um medicamento anticanceroso.

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, na qual o medicamento anticanceroso se destina ao tratamento do cancro da próstata ou do cancro do ovário.

15. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1, com actividade como agonista dos receptores do LPA para o fabrico de um medicamento que induz a proliferação celular.

16. Método para produzir um composto de acordo com a reivindicação 1, compreendendo:

reagir $(Y^2O)_2PO-Z^{11}-Z^{13}$ ou $(Y^2O)_2PO-Z^{12}-P(OH)O-Z^{11}-Z^{13}$,

no qual

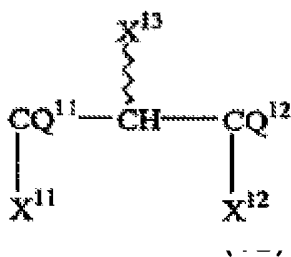
Z^{11} é $-O(CH_2)_m-$, em que m é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$;

Z^{12} é $-O(CH_2)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 50, ou $-O-$;

Z^{13} é H ou um primeiro grupo de saída ou $-Z^{11}-Z^{13}$ formam juntos o primeiro grupo de saída, e

Y^2 é H ou um grupo protector,

com um composto intermediário de acordo com a fórmula (VI)



na qual

X^{12} e X^{13} são ambos $R^{11}-NR^{12}-A-$ sendo cada um igual ou diferente;

X^{11} é OH, NH_2 , SH ou um segundo grupo de saída;

A é uma ligação directa, $(CH_2)_k$ em que k é um número inteiro de 0 a 30, ou 0;

Q^{11} e Q^{12} são, independentemente, H_2 ou $=O$;

R^{11} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono, di ou trissubstituições do anel seleccionadas do grupo de alquilos, alcoxis, ácidos e álcoois, um acilo incluindo um anel aromático, um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, $-C(O)-O-R^{16}$; e

R^{12} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono, di ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 ou um anel aromático, um

arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

R^{16} é, independentemente, hidrogénio, um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada, um alcenilo de cadeia C2 a C30 linear ou ramificada, um anel aromático com ou sem mono, di ou trissubstituições do anel, um acilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 ou um anel aromático, um arilalquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada ou um ariloxialquilo incluindo um alquilo de cadeia C1 a C30 linear ou ramificada;

seguido de uma etapa de desprotecção, se necessário, em que ambas as referidas etapas de reacção e de desprotecção são efectuadas em condições eficazes para formar um composto de acordo com a fórmula (I) na qual X^1 é $(HO)_2PO-Z^1$ ou $(HO)_2PO-Z^2-P(OH)O-Z^1-$.

Lisboa, 2008-03-04

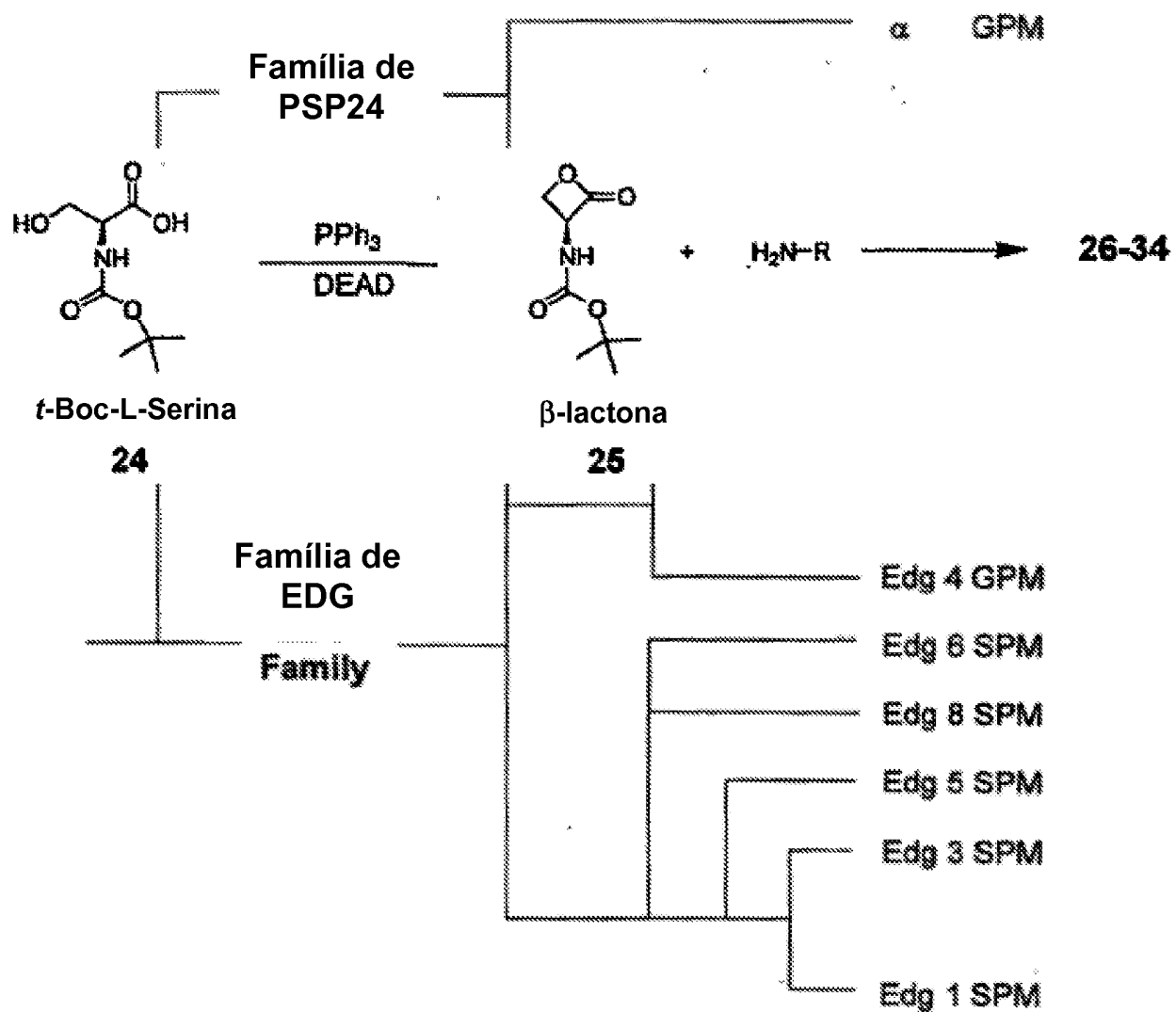
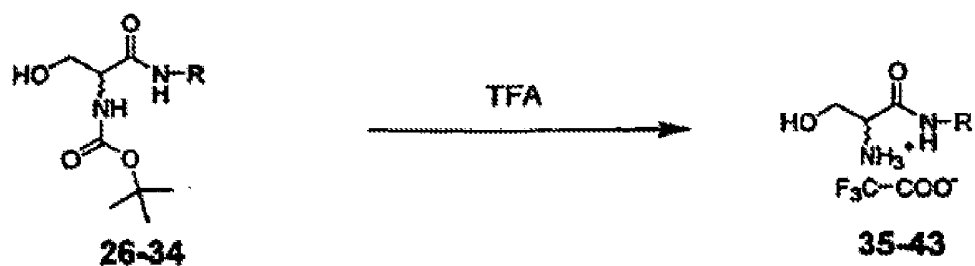


Figura 1



- 26 $R = (\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$
 27 $R = (\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 28 $R = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
 29 $R = p\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 30 $R = p\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$
 31 $R = m\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 32 $R = m\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$
 33 $R = o\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 34 $R = o\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$

- 35 $R = (\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$
 36 $R = (\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 37 $R = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
 38 $R = p\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 39 $R = p\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$
 40 $R = m\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 41 $R = m\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$
 42 $R = o\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 43 $R = o\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$

Figura 2

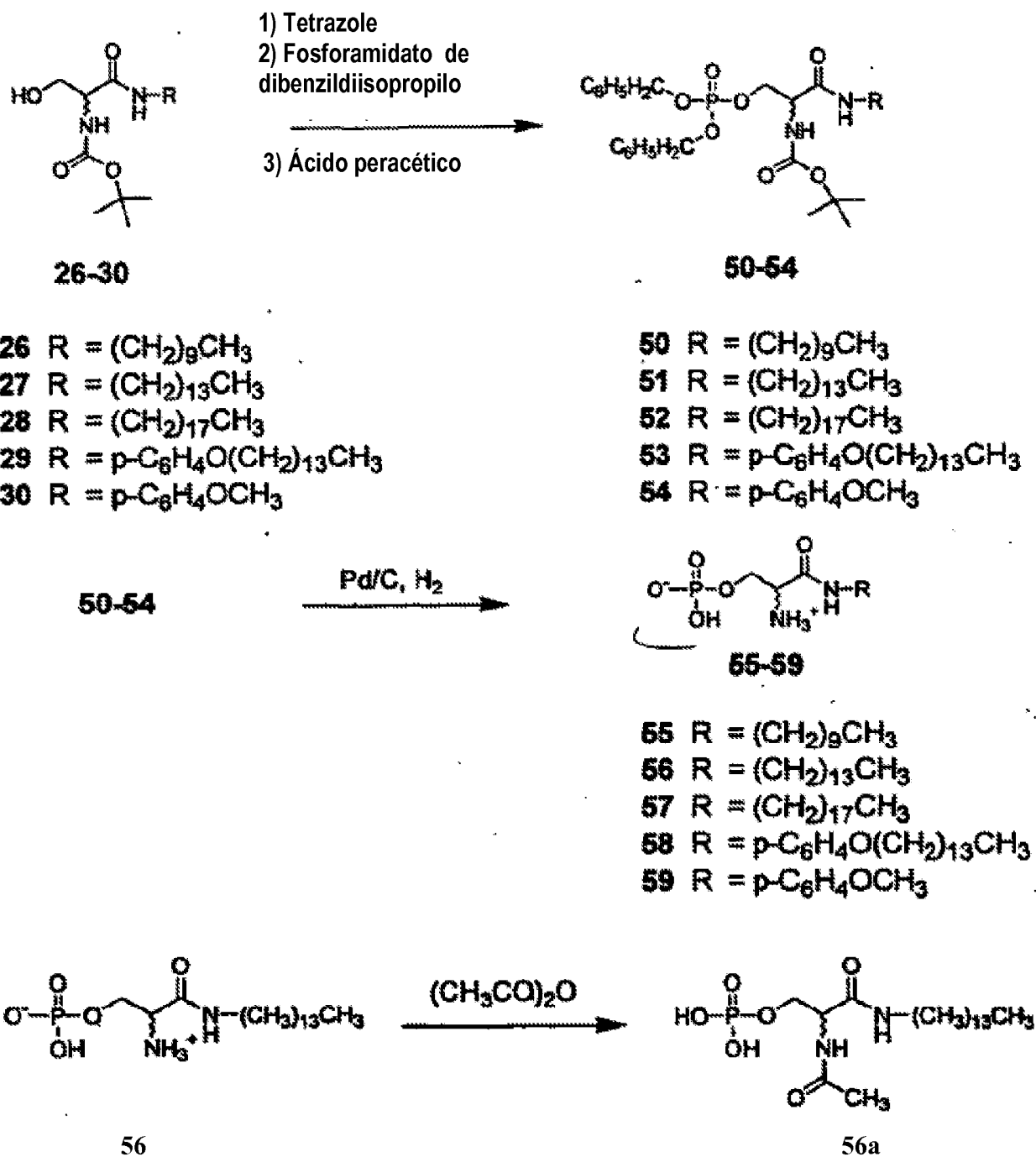
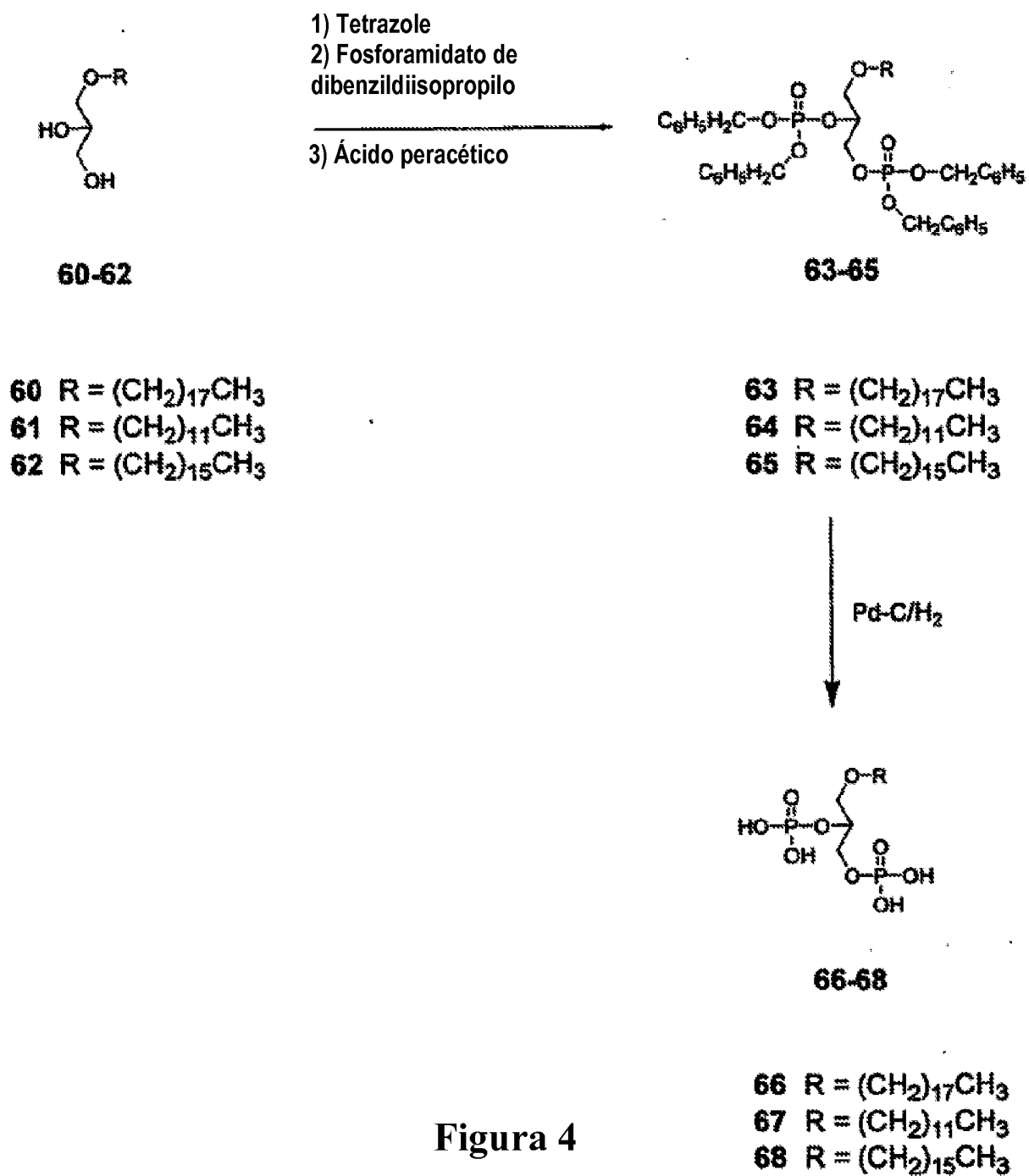
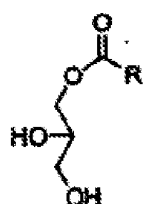


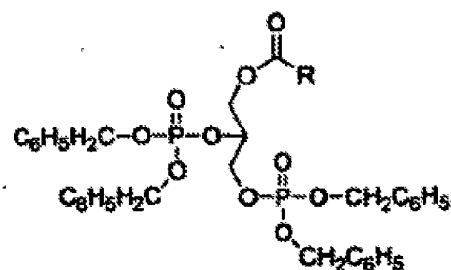
Figura 3



**69-76**

1) Tetrazole
2) Fosforamidata de
dibenzildiisopropilo

3) Ácido peracético

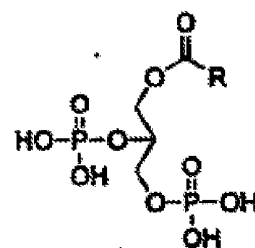
**77-84**

- 69** R = (CH₂)₁₂CH₃
70 R = (CH₂)₁₃CH₃
71 R = (CH₂)₁₄CH₃
72 R = (CH₂)₁₅CH₃
73 R = (CH₂)₁₆CH₃
74 R = (CH₂)₁₇CH₃
75 R = (CH₂)₁₈CH₃
76 R = (CH₂)₂₀CH₃

- 77** R = (CH₂)₁₂CH₃
78 R = (CH₂)₁₃CH₃
79 R = (CH₂)₁₄CH₃
80 R = (CH₂)₁₅CH₃
81 R = (CH₂)₁₆CH₃
82 R = (CH₂)₁₇CH₃
83 R = (CH₂)₁₈CH₃
84 R = (CH₂)₂₀CH₃

77-84

Pd-C/H₂

**85-92**

- 85** R = (CH₂)₁₂CH₃
86 R = (CH₂)₁₃CH₃
87 R = (CH₂)₁₄CH₃
88 R = (CH₂)₁₅CH₃
89 R = (CH₂)₁₆CH₃
90 R = (CH₂)₁₇CH₃
91 R = (CH₂)₁₈CH₃
92 R = (CH₂)₂₀CH₃

Figura 5A

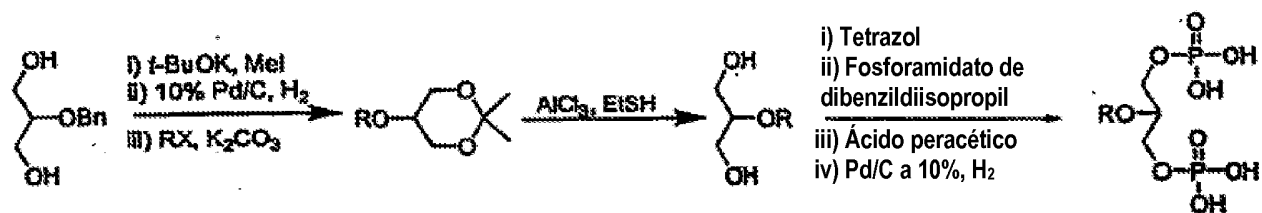


Figura 5B

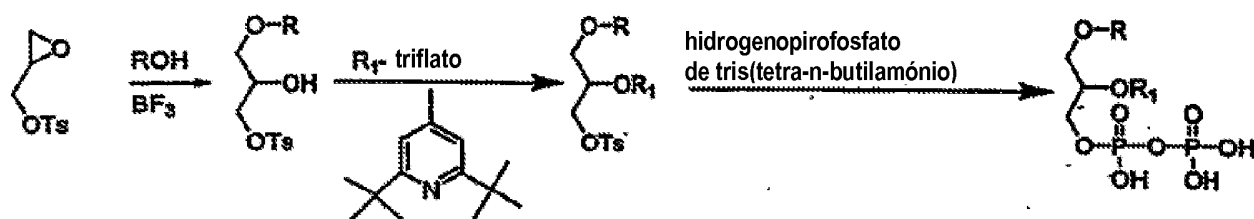


Figura 6A

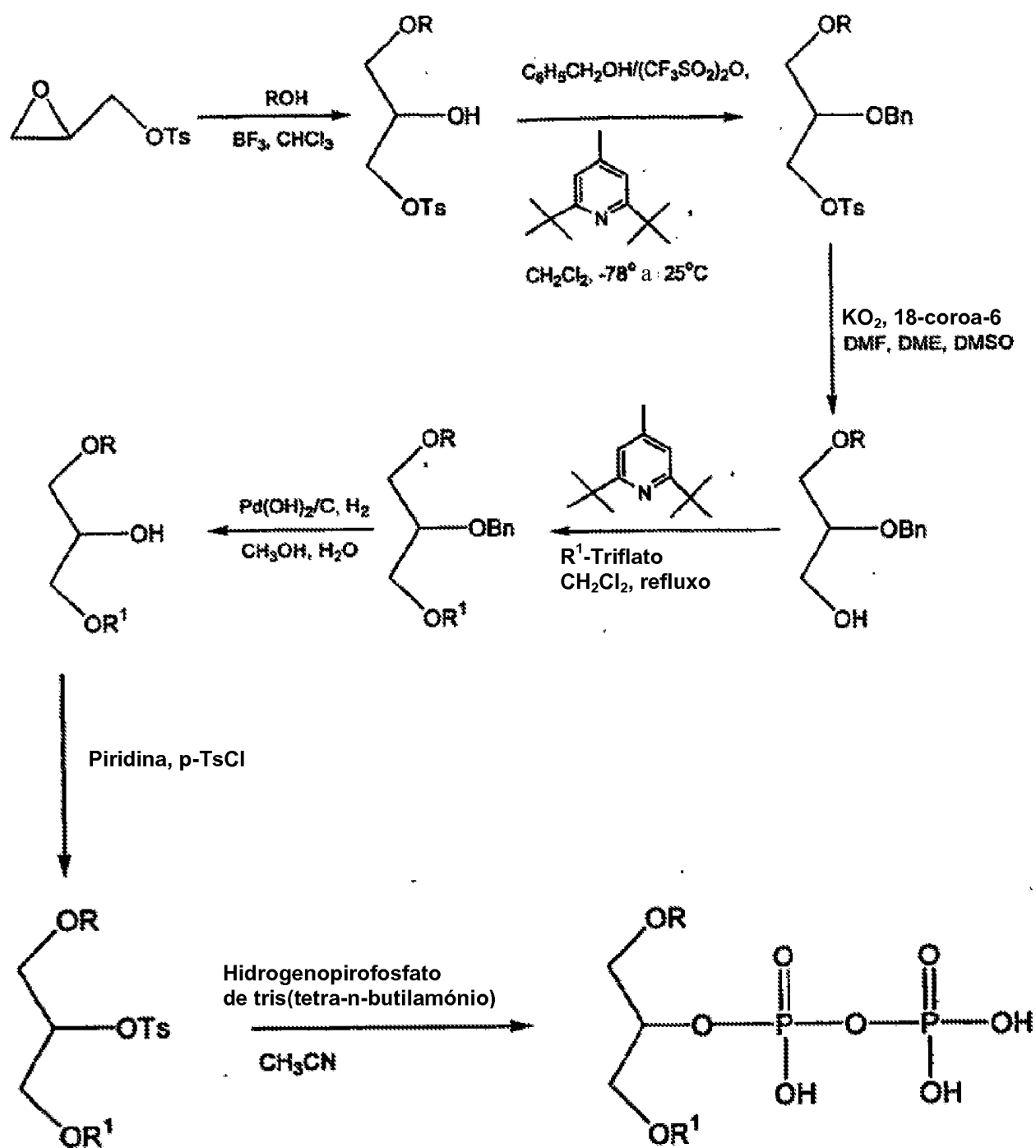


Figura 6B

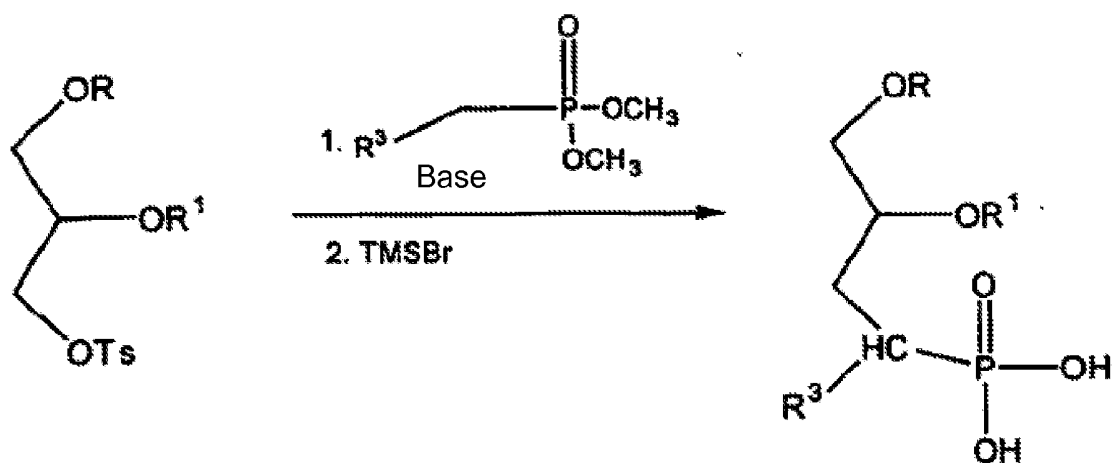


Figura 7A

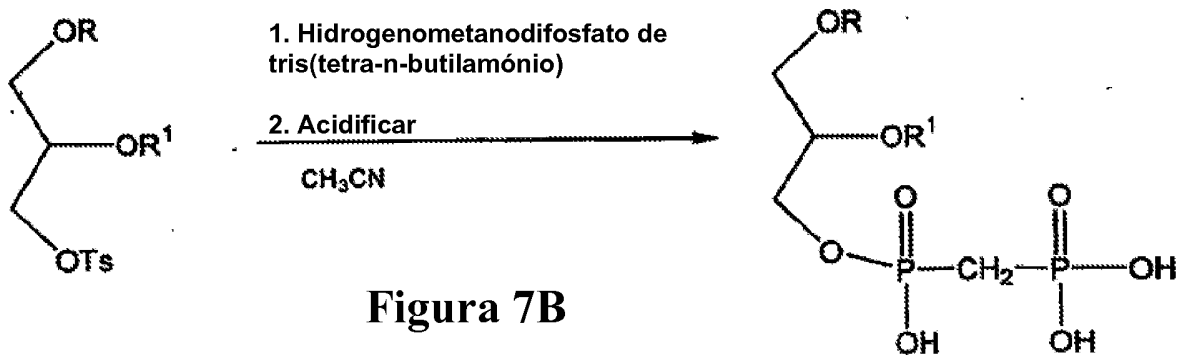


Figura 7B

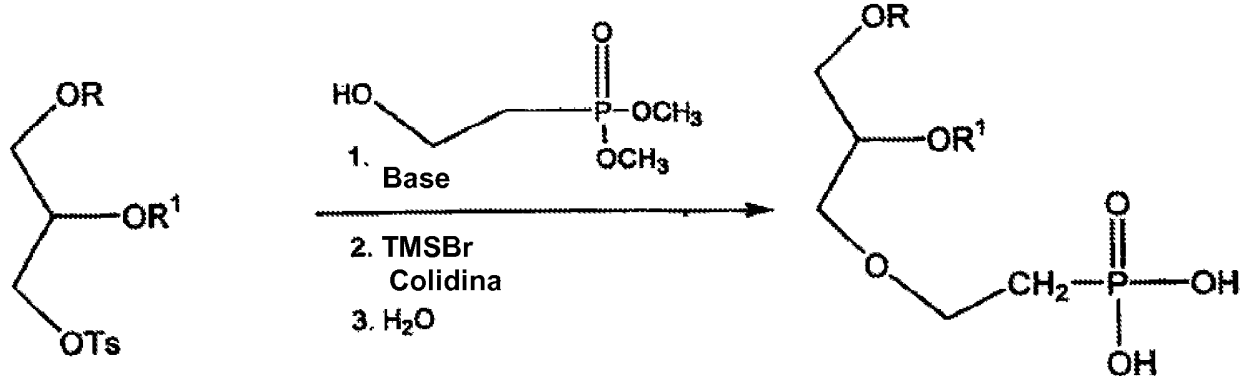


Figura 7C

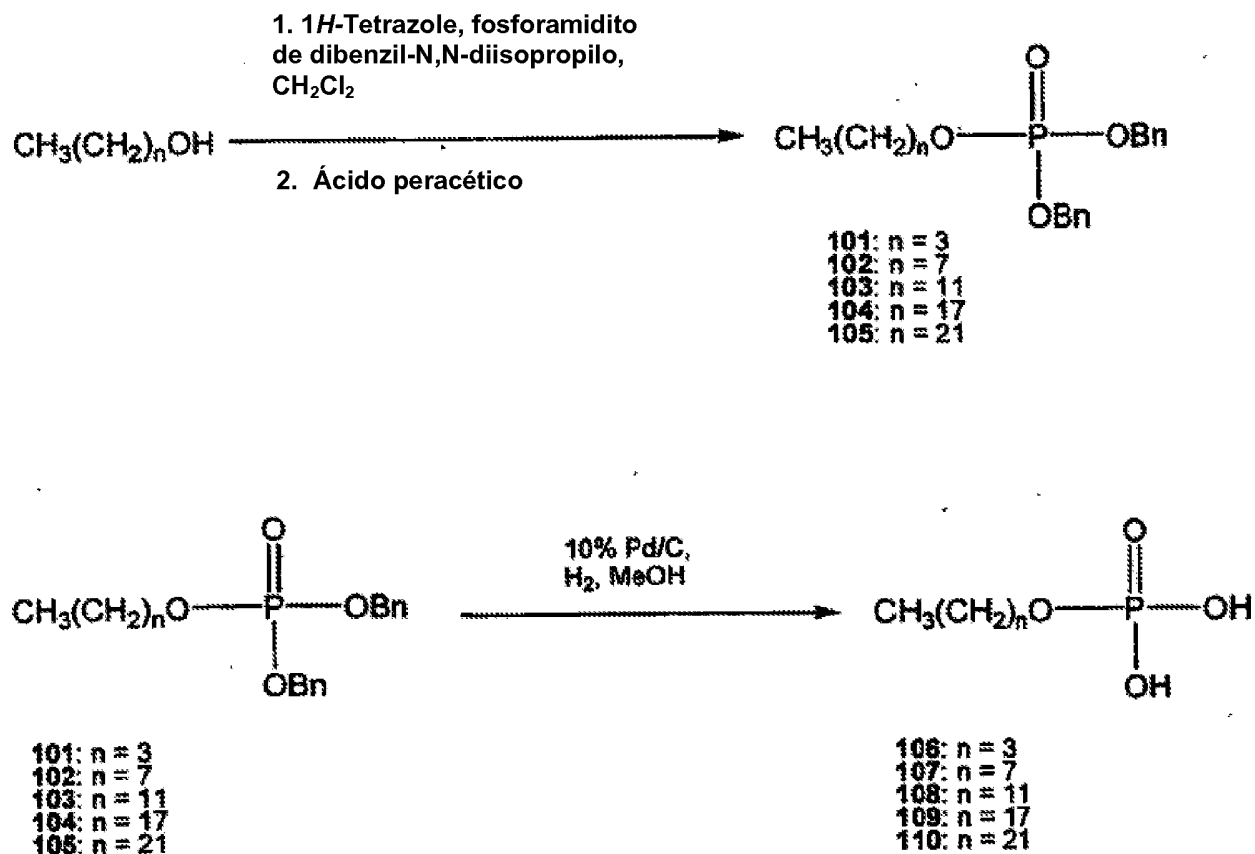


Figura 8

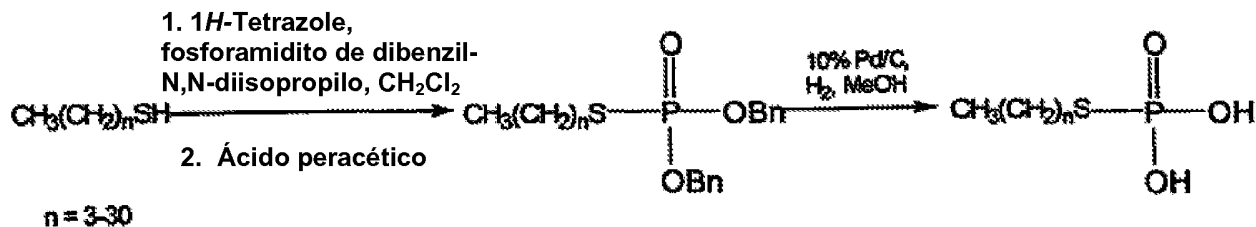


Figura 9

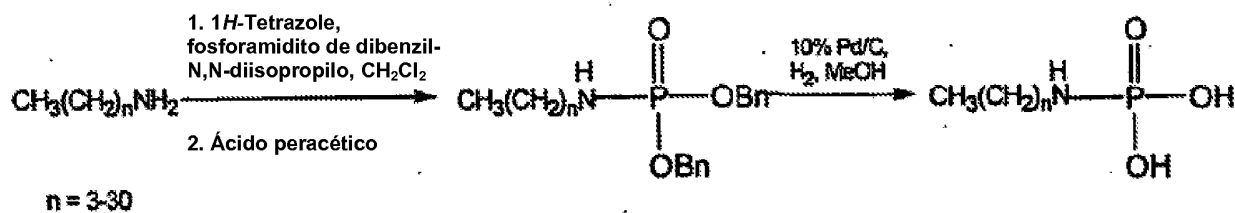


Figura 10

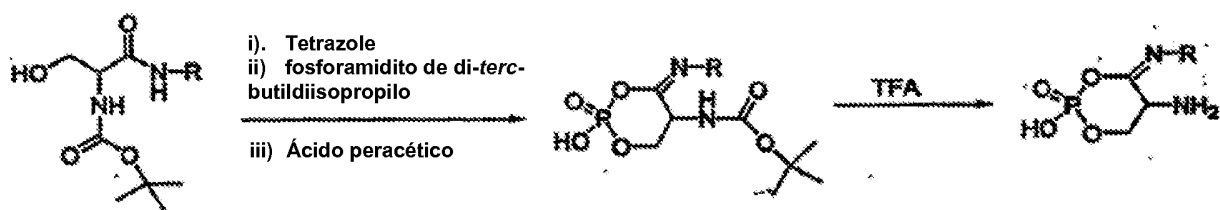


Figura 11

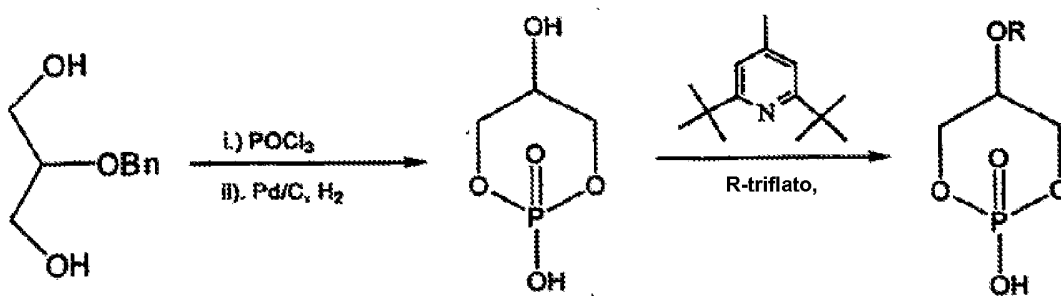


Figura 12

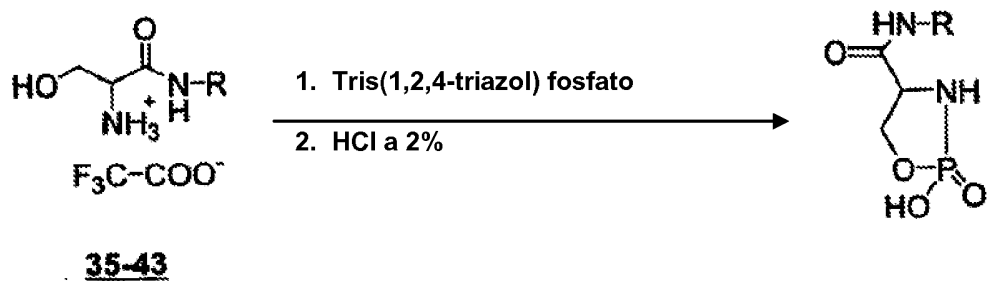


Figura 13

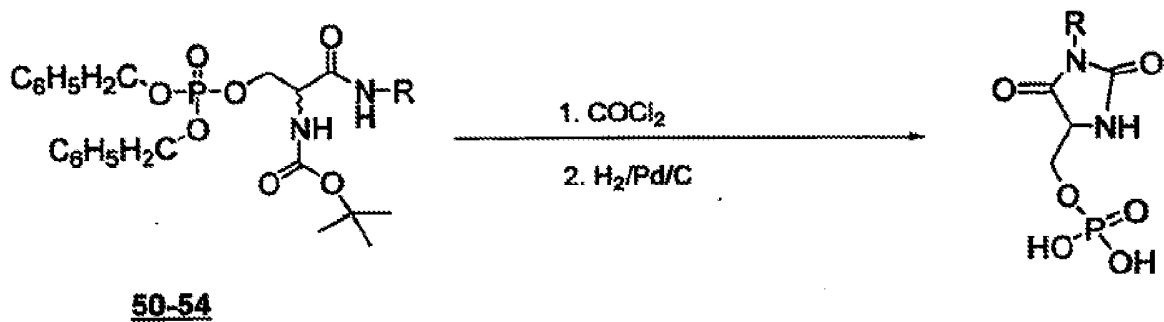


Figura 14

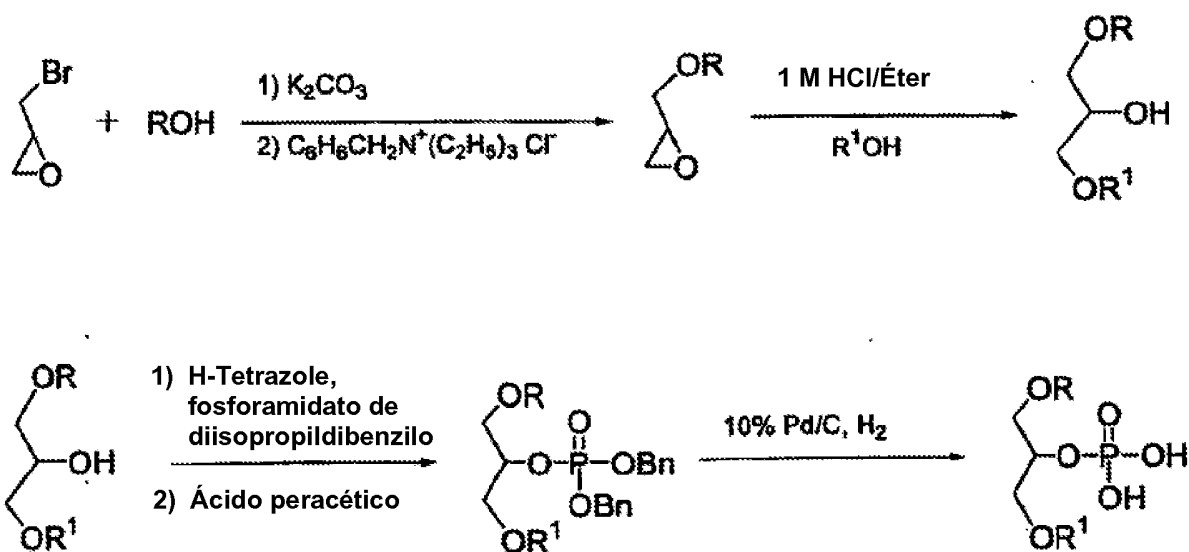


Figura 15

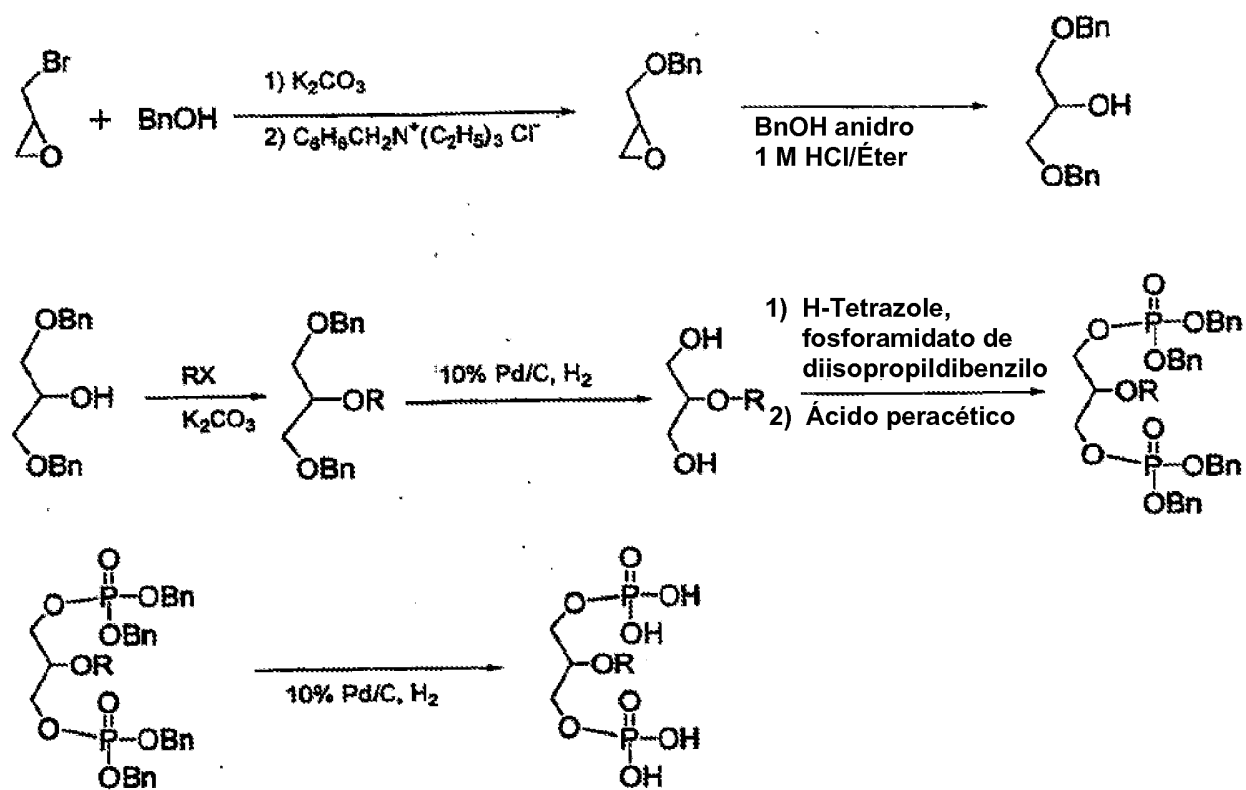


Figura 16

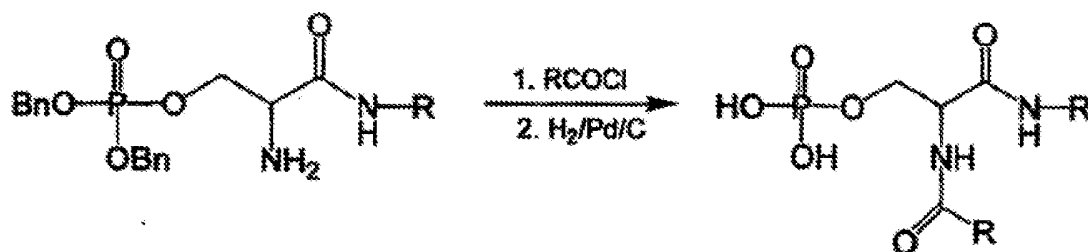


Figura 17

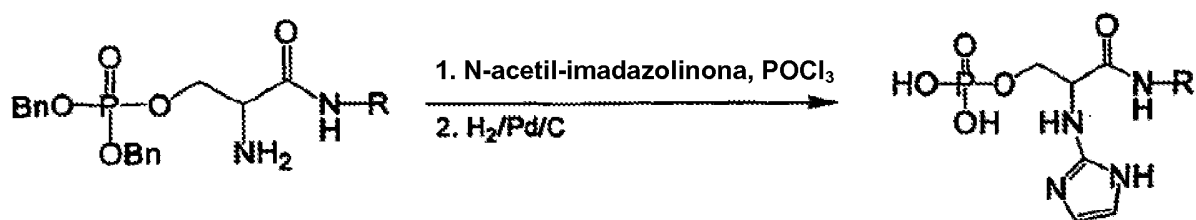


Figura 18

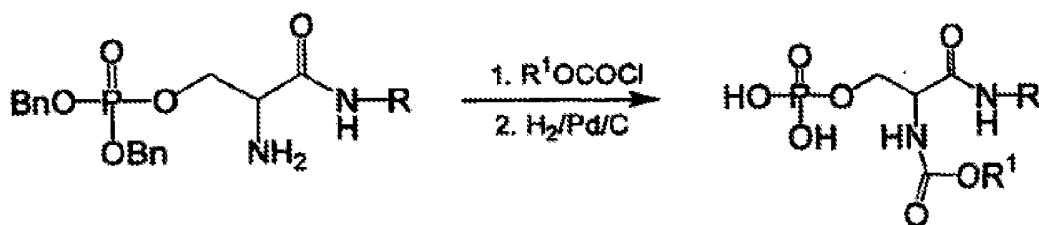


Figura 19

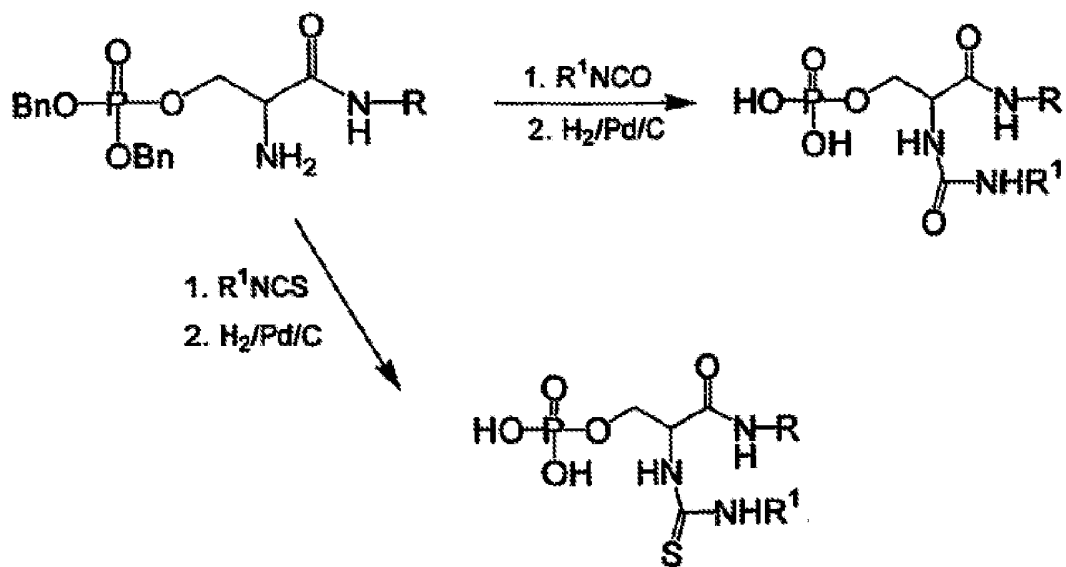


Figura 20

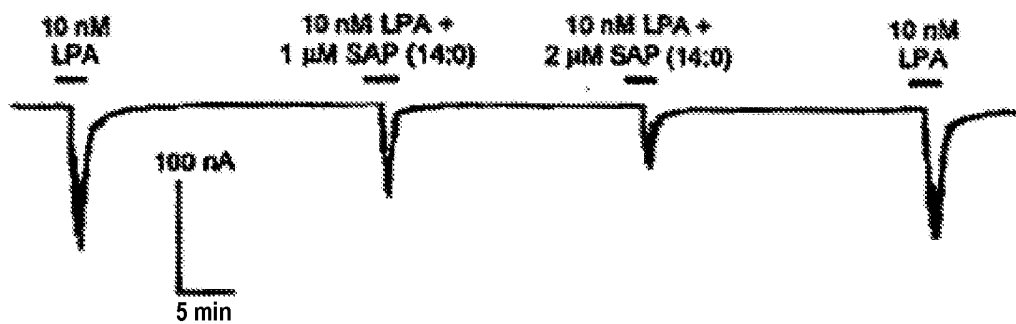


Figura 21

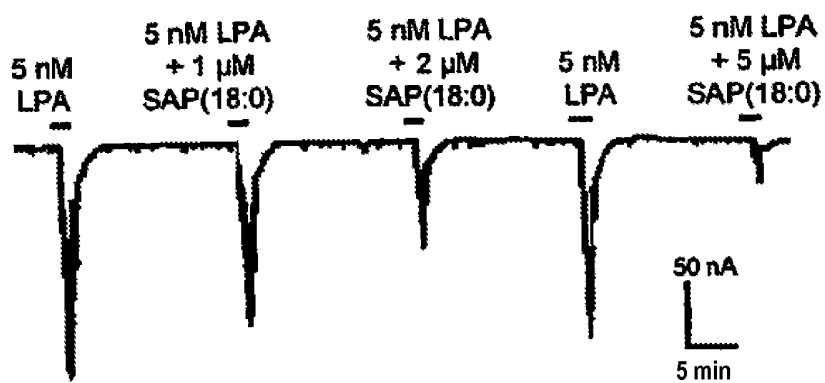


Figura 22

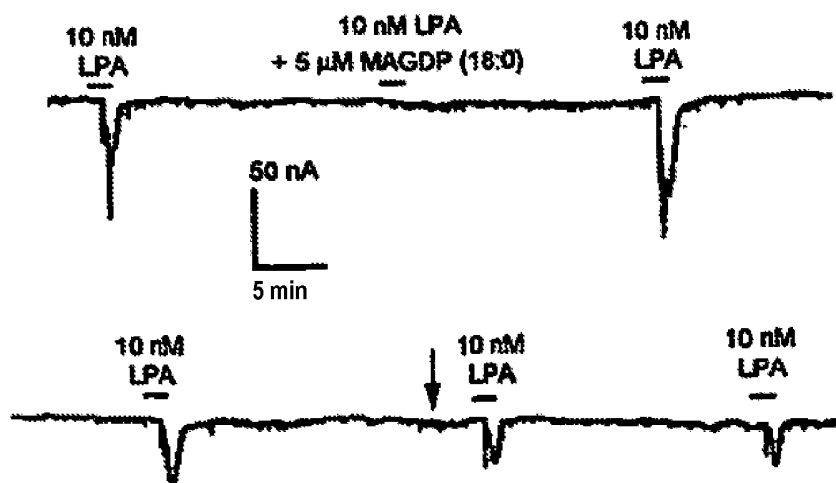


Figura 23A-B

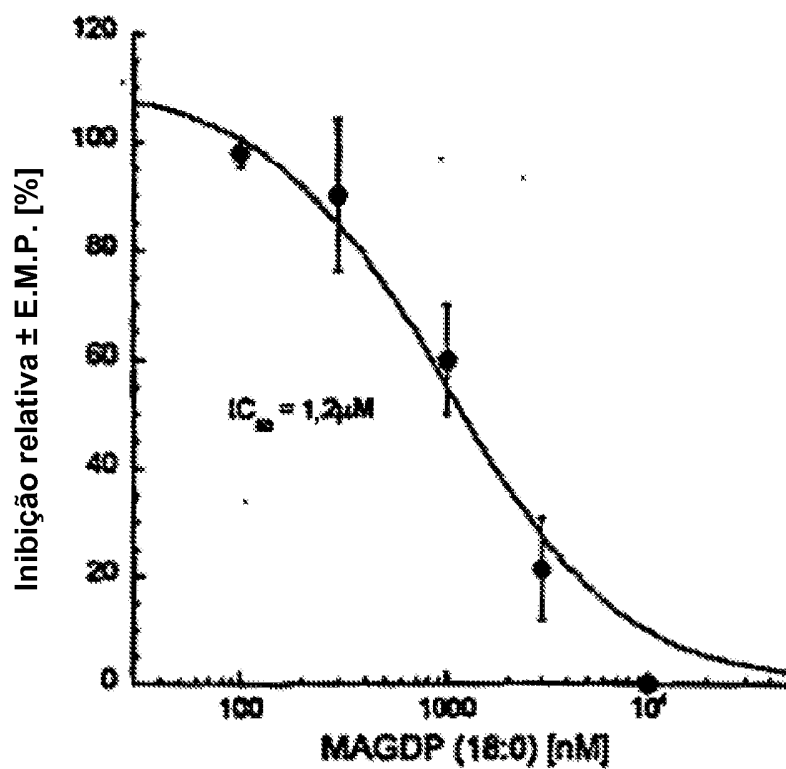


Figura 24

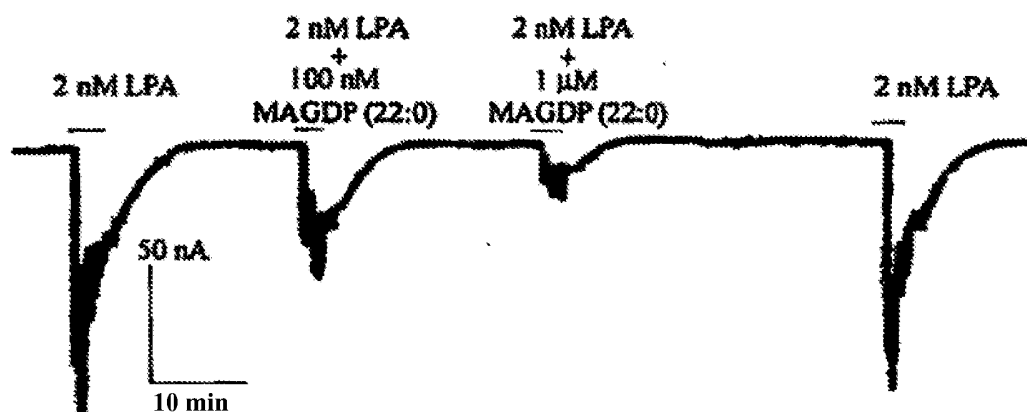


Figura 25

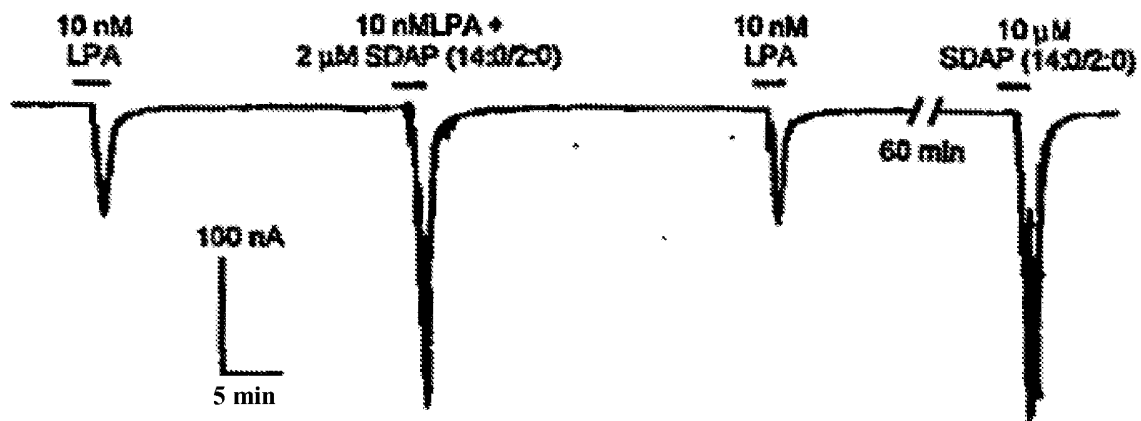


Figura 26

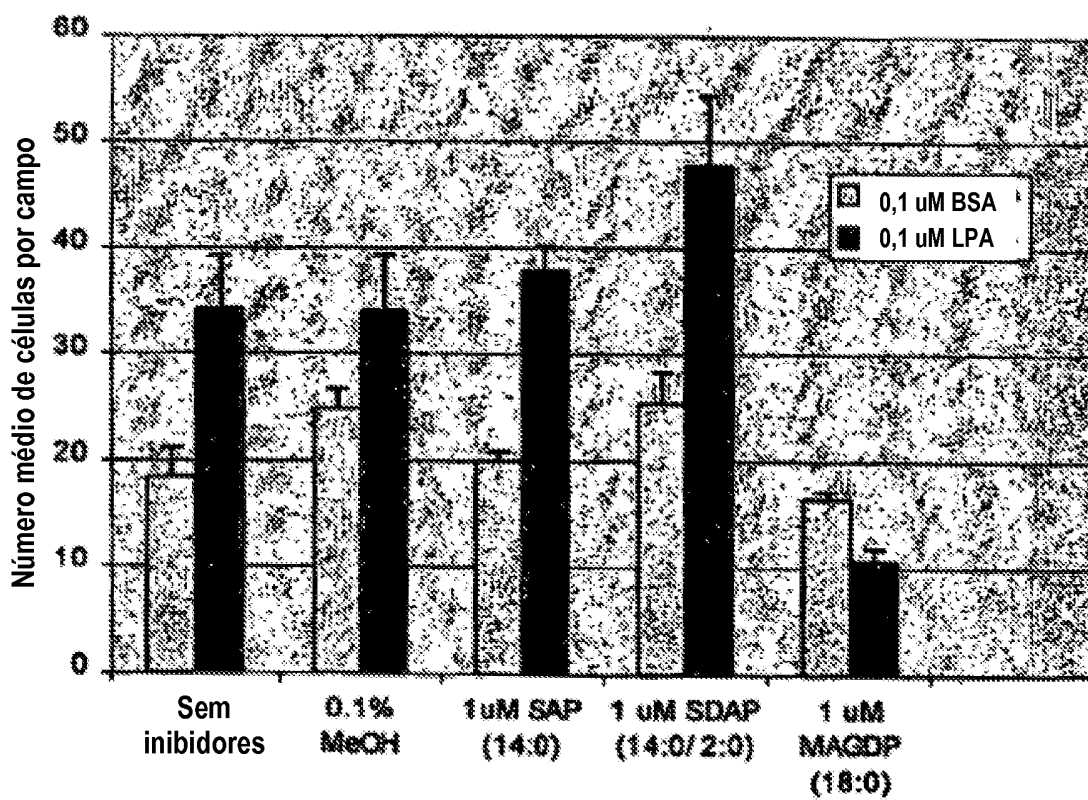
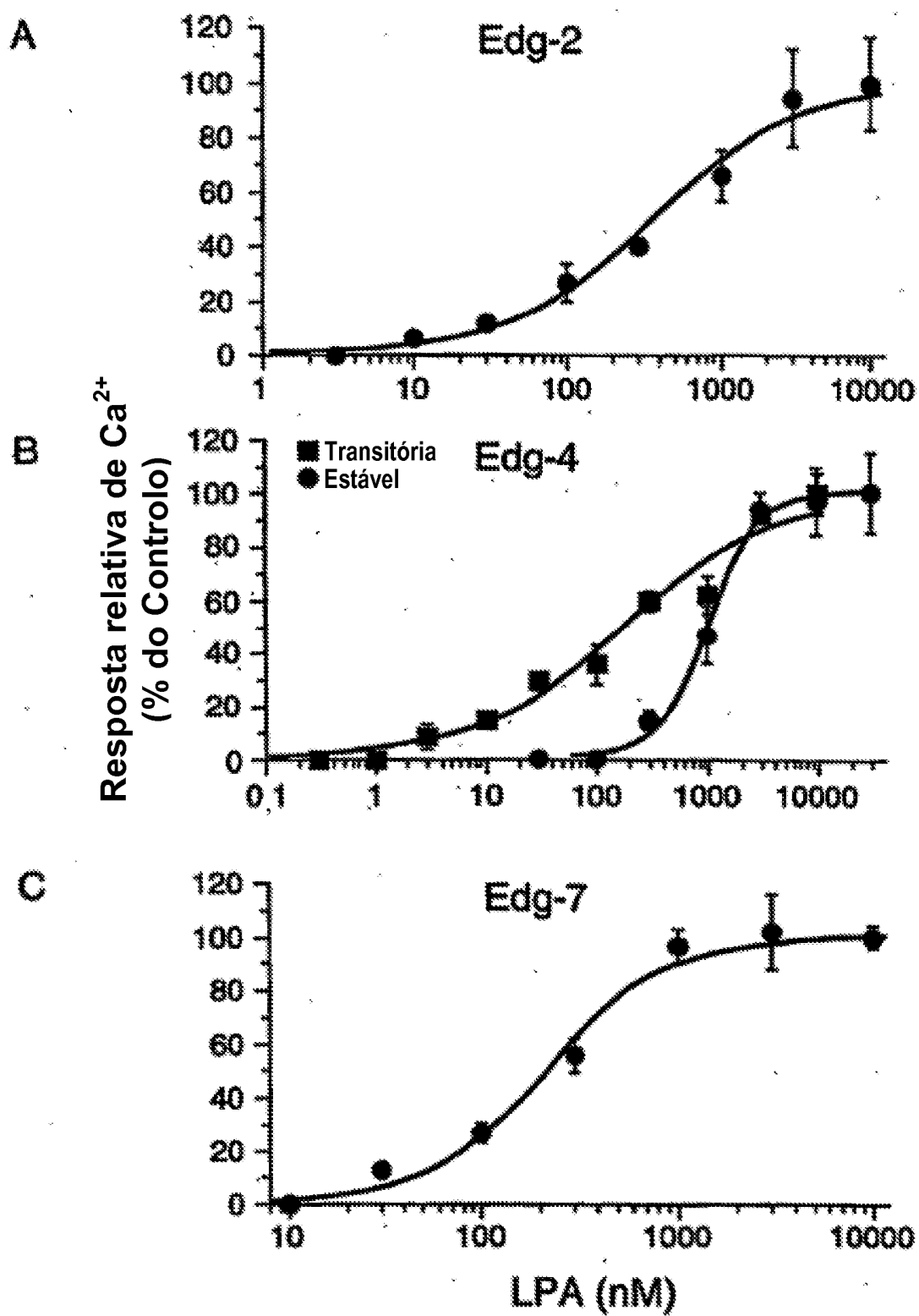
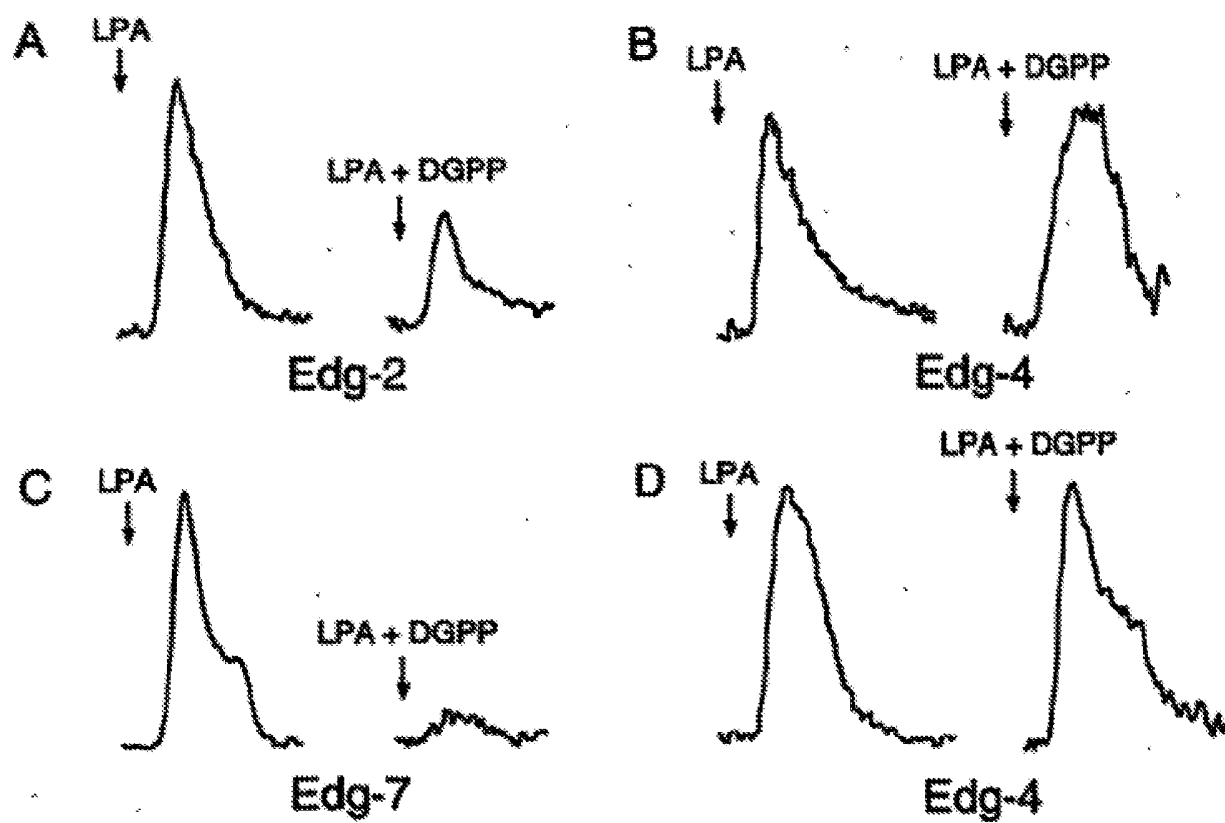


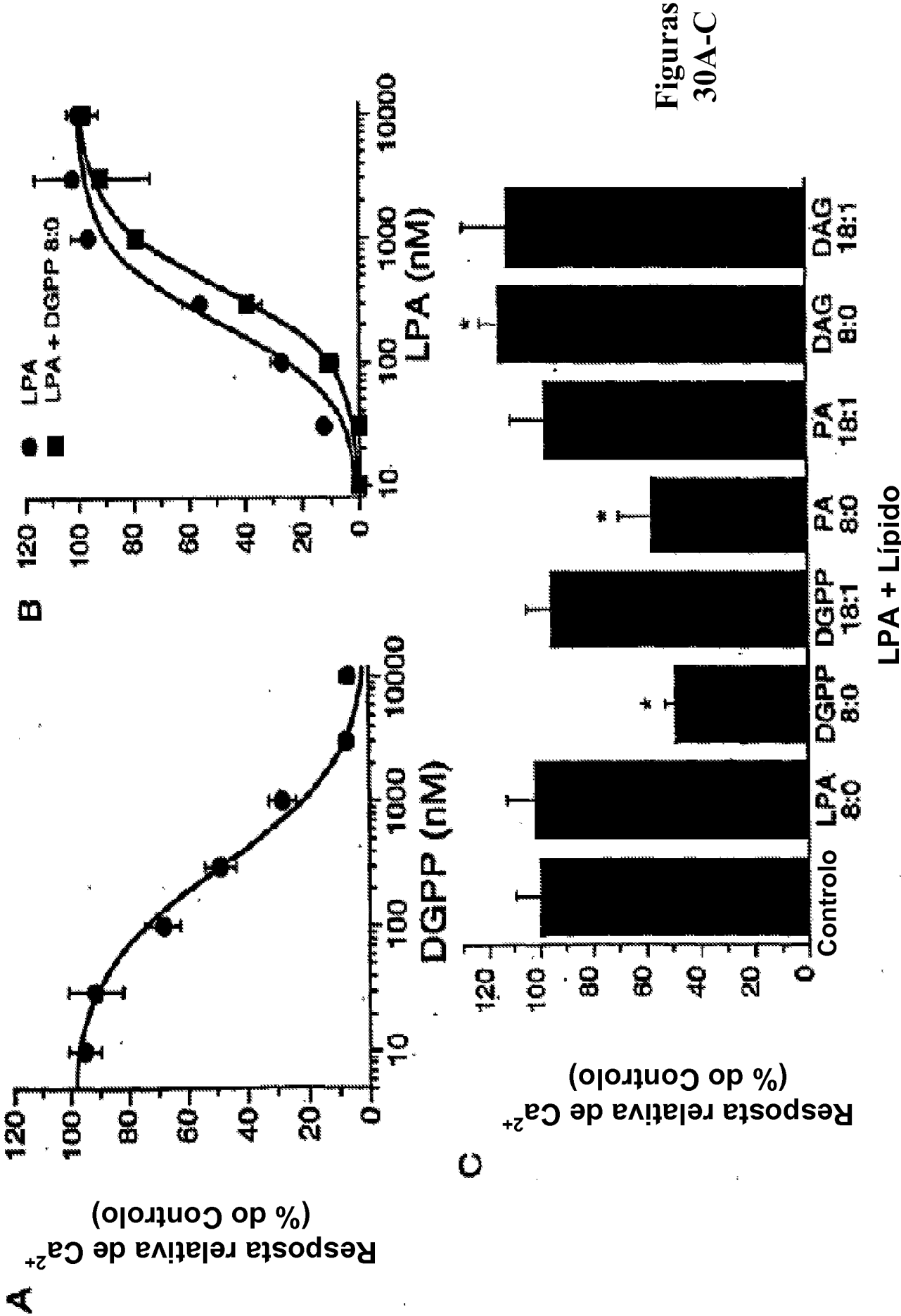
Figura 27

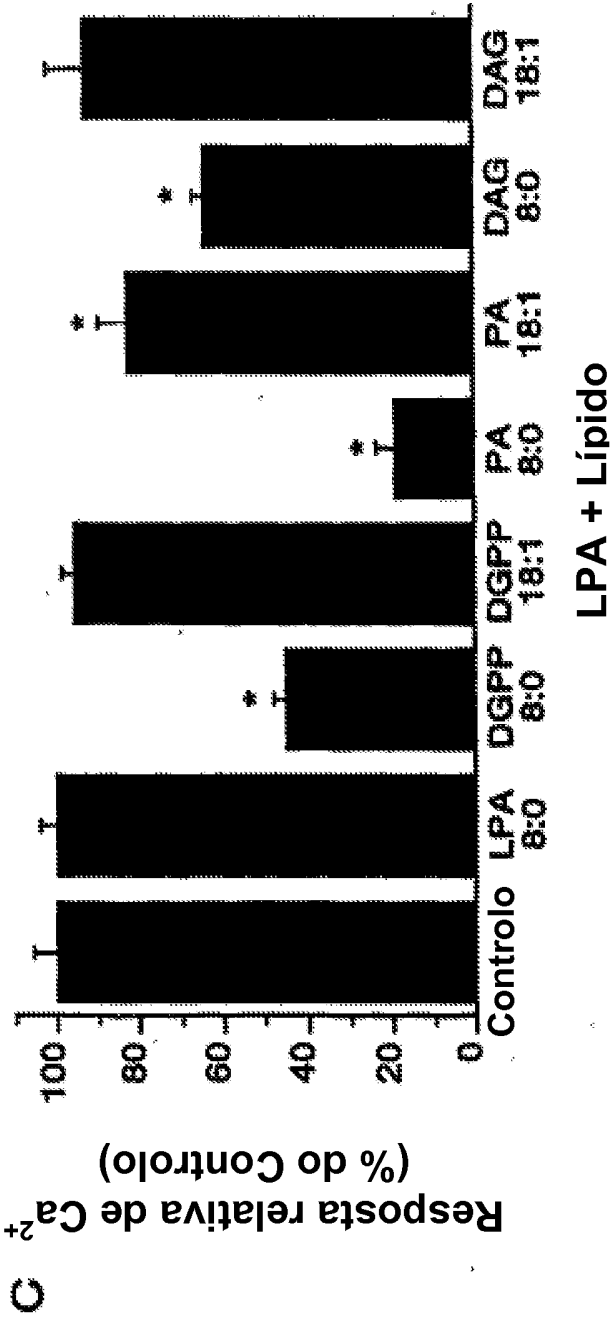
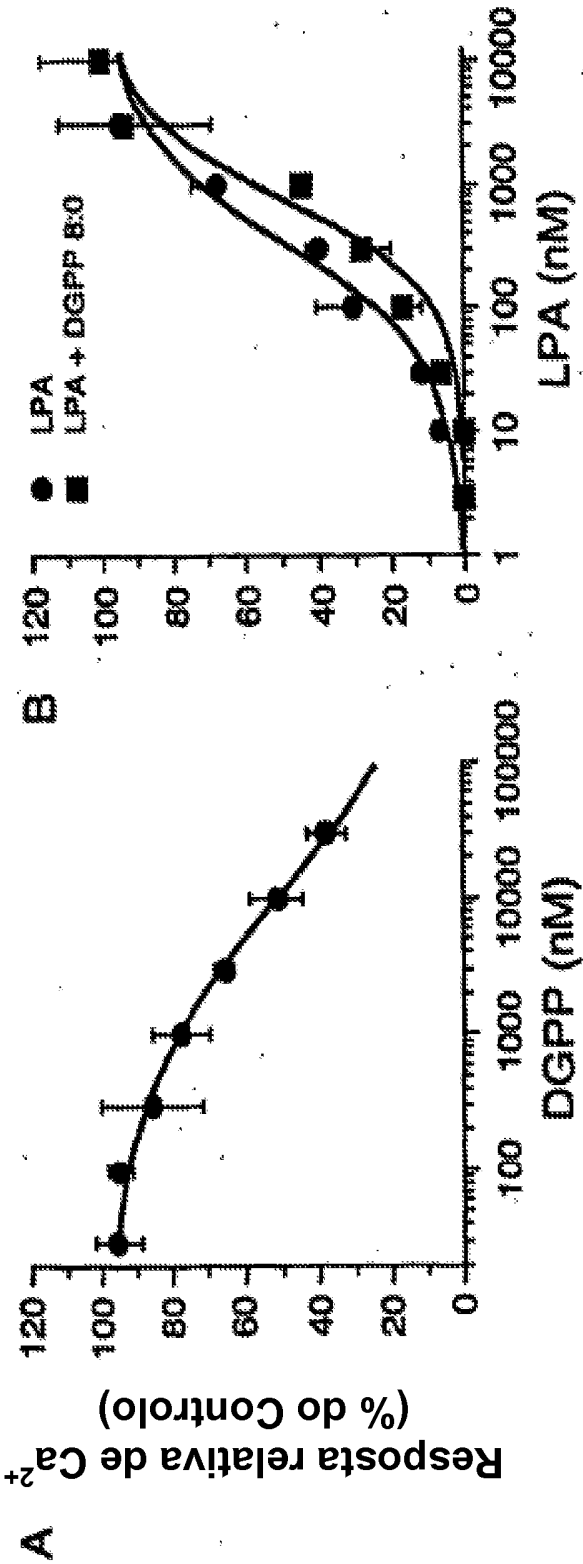


Figuras 28A-C

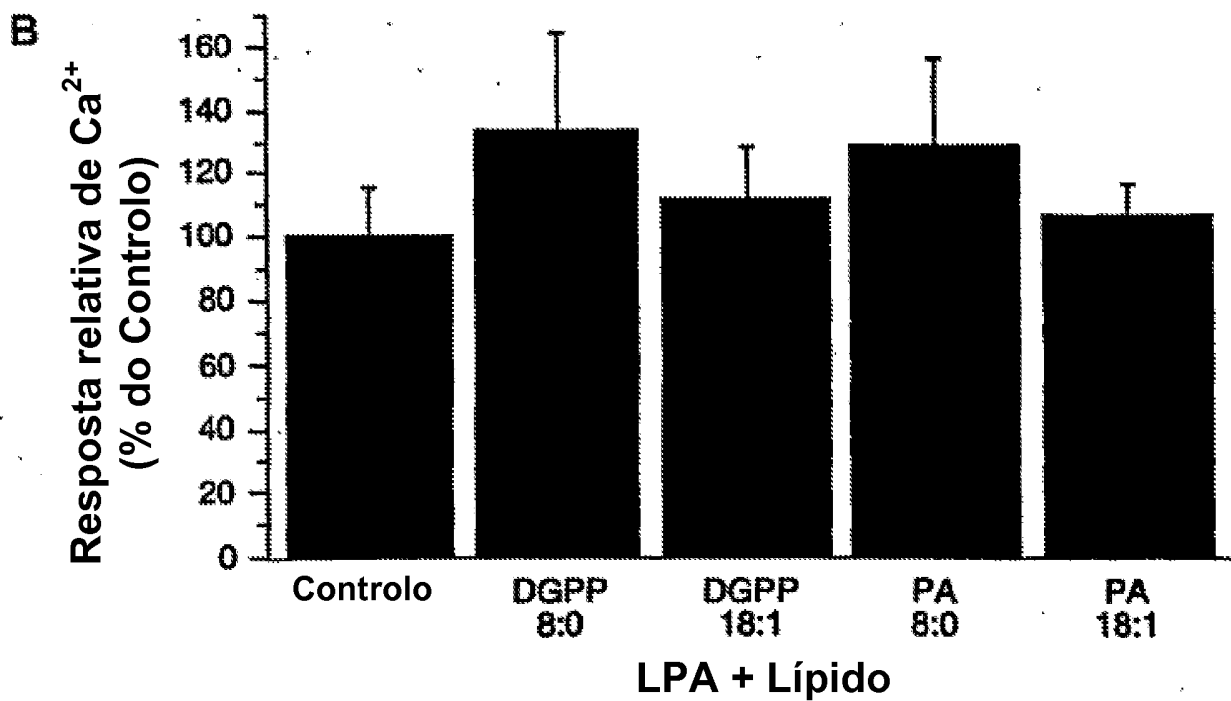
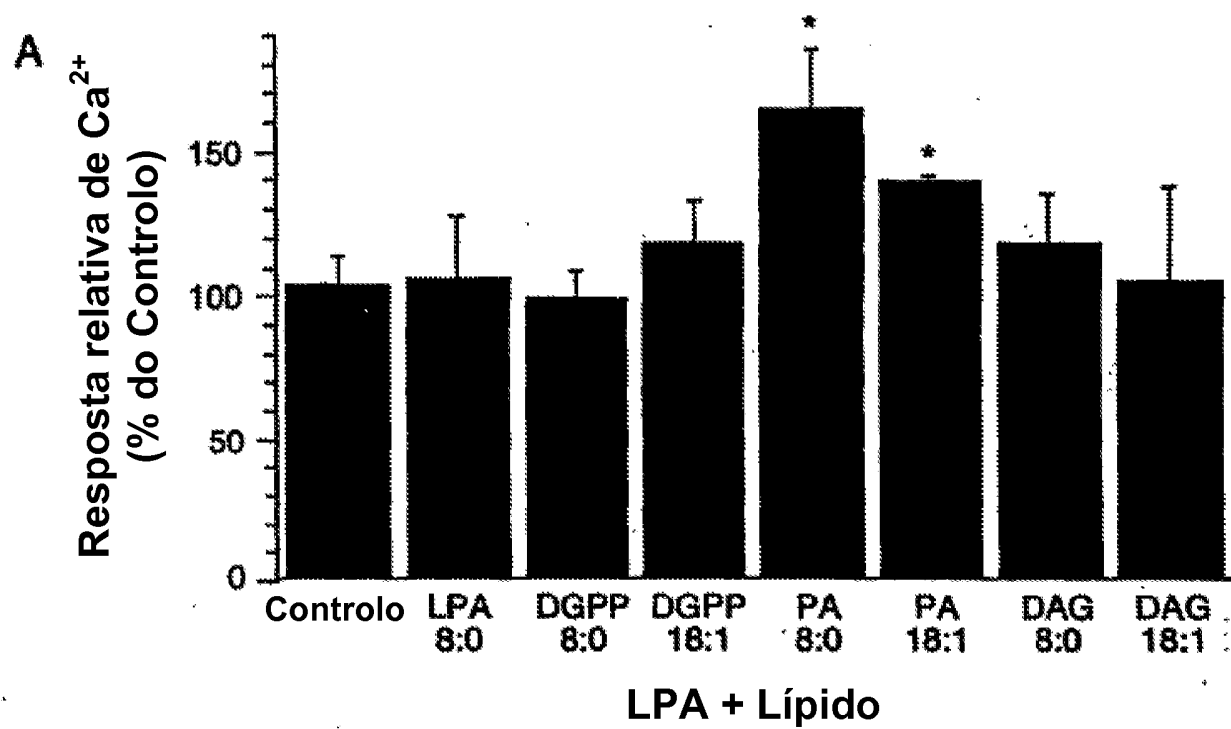


Figuras 29A-D

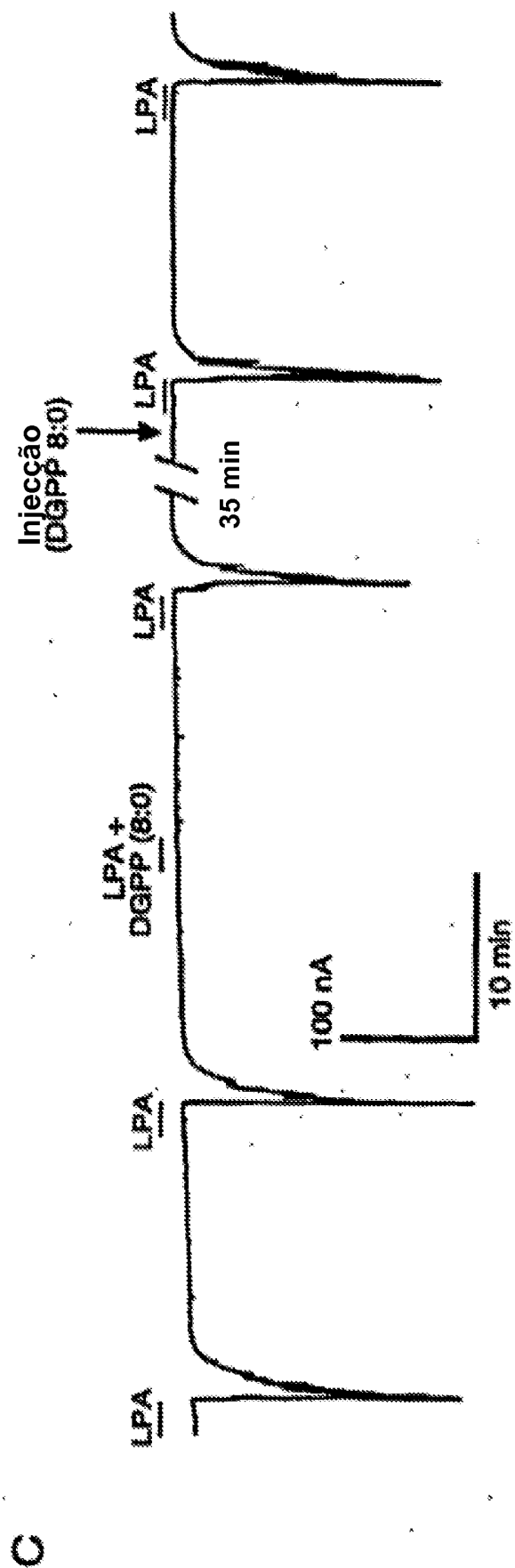
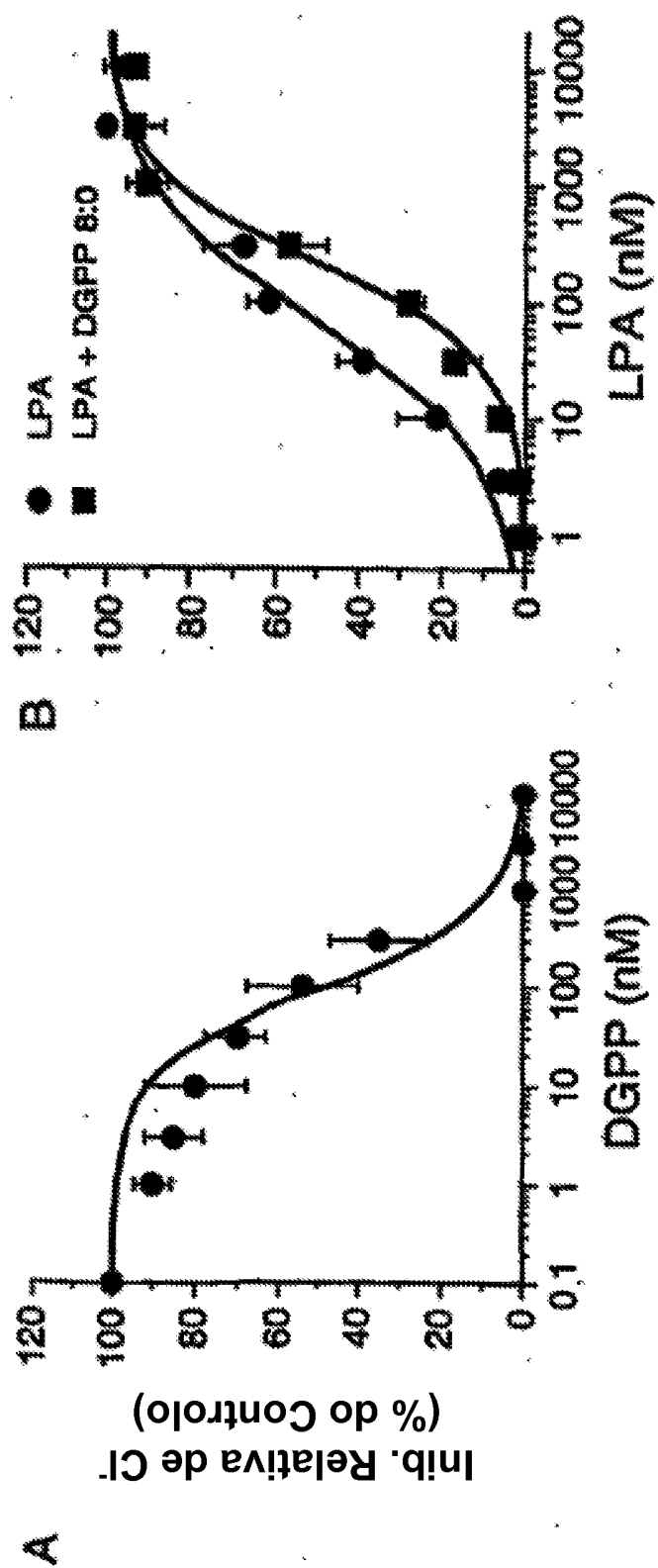


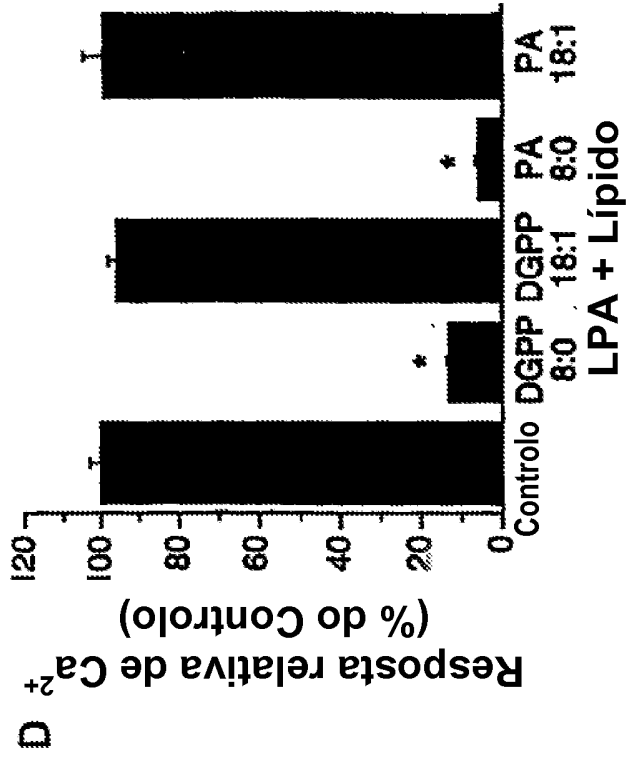
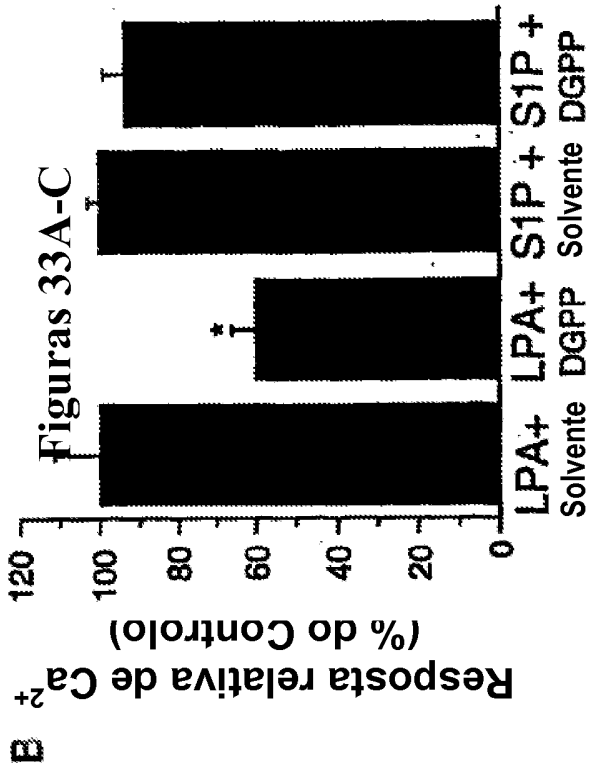


Figuras
31A-C

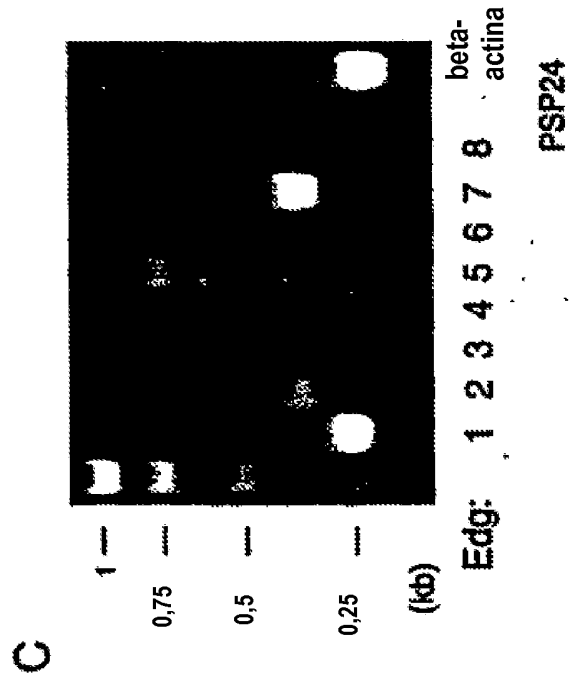
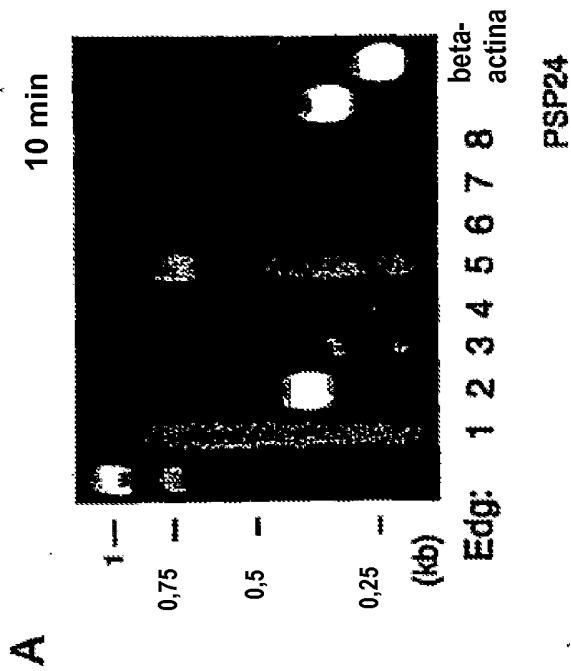


Figuras 32A-B





Figuras 34A-D



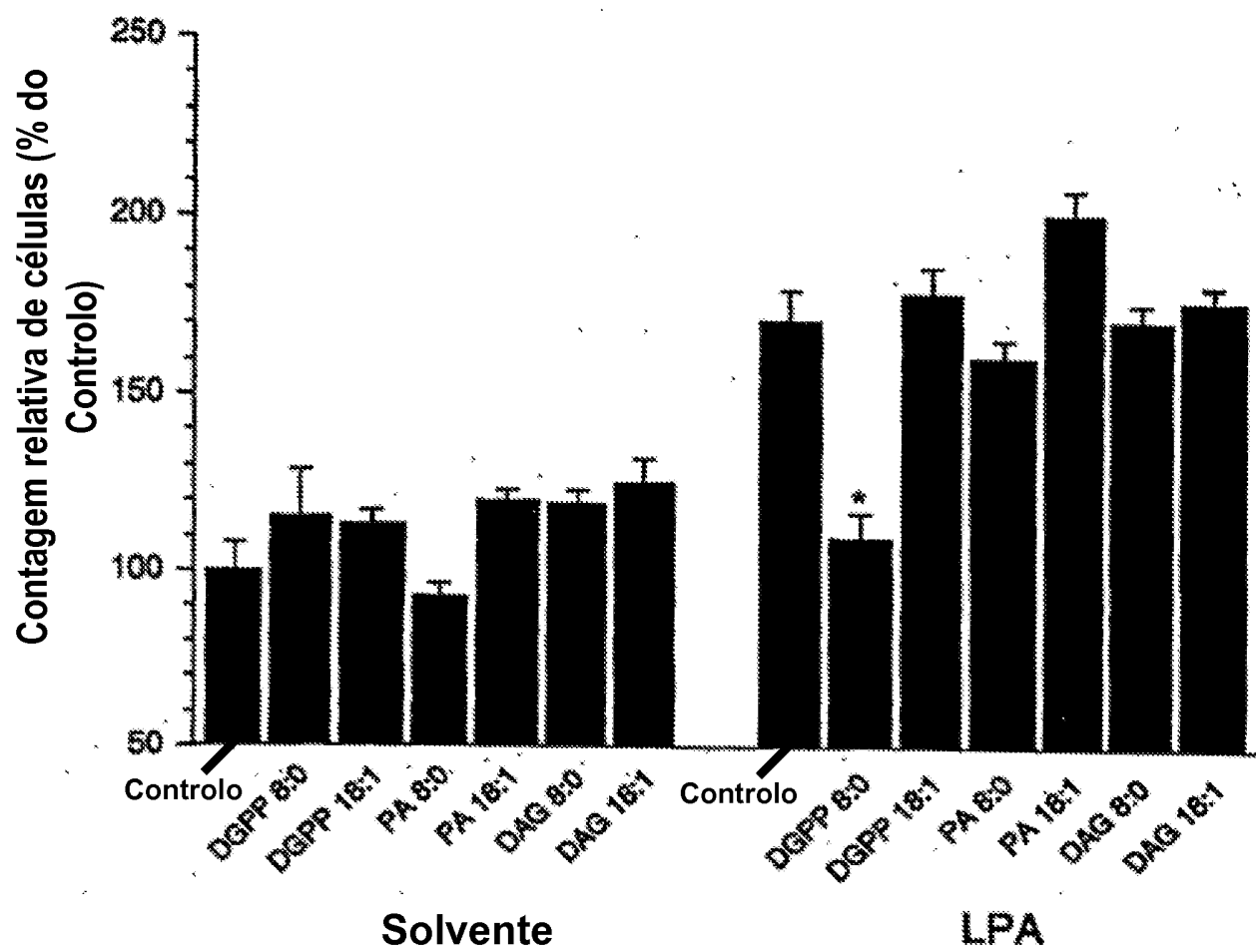


Figura 35

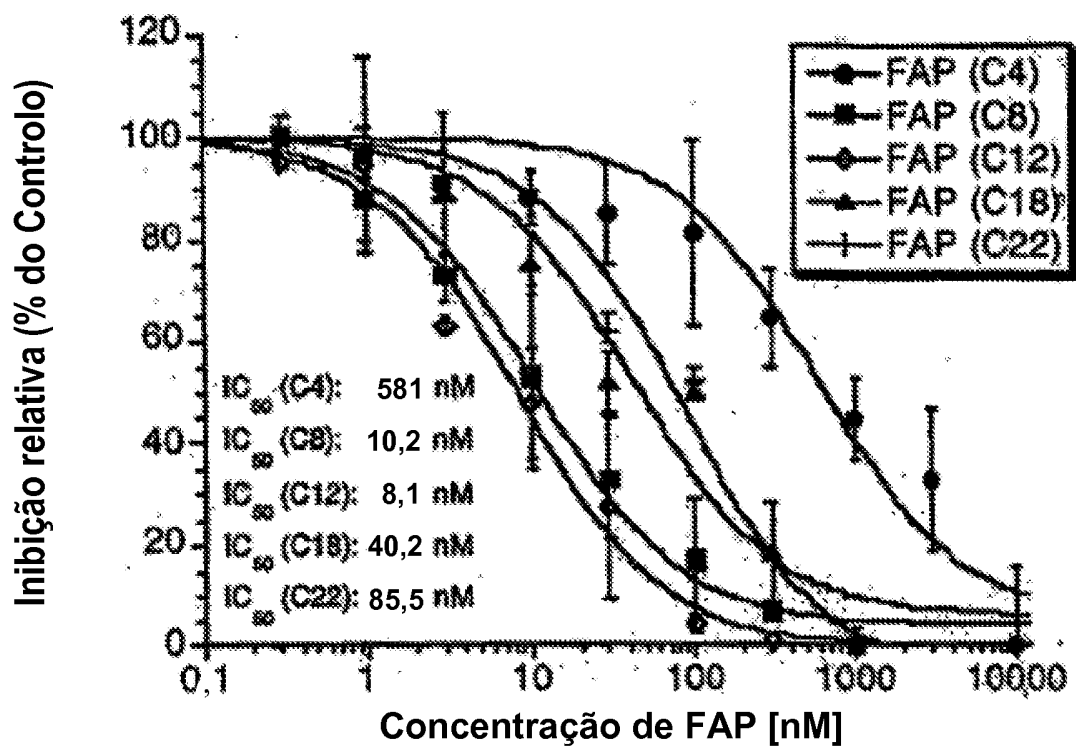


Figura 36

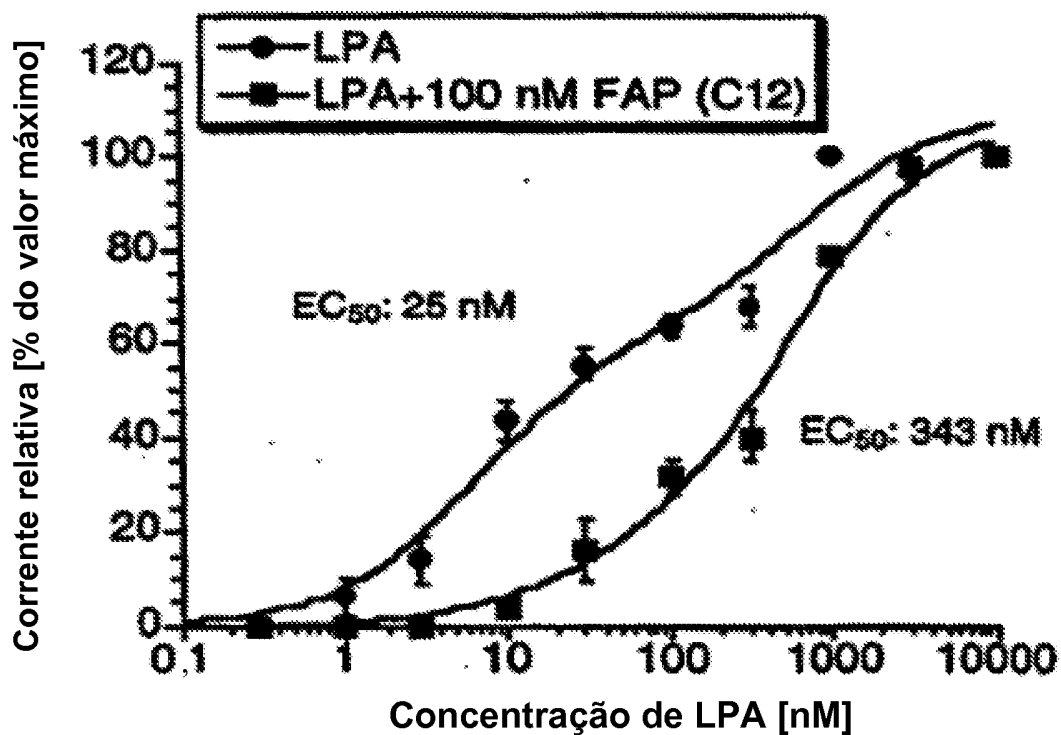


Figura 37

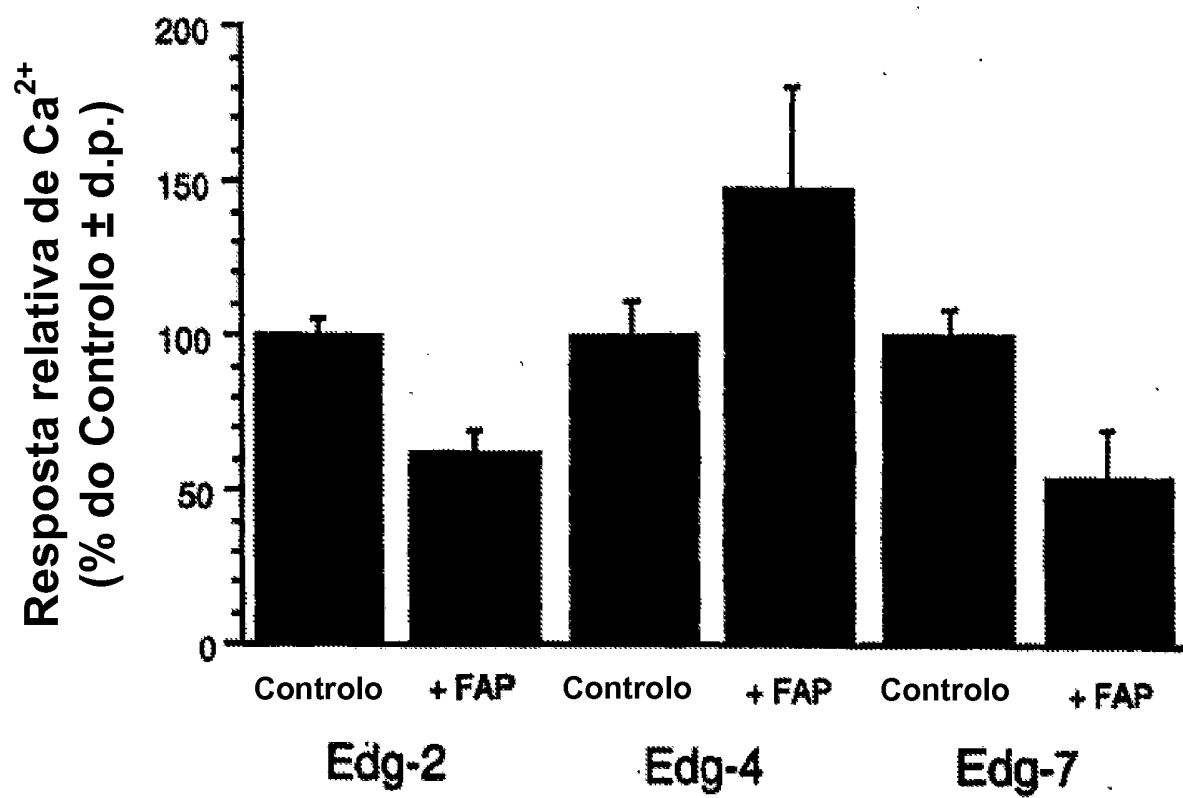


Figura 38