

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 822**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4245** (2006.01)

**C07D 271/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2004 E 04775787 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 1601354**

54 Título: **Ligandos de oxadiazolina para modular la expresión de genes exógenos a través de un complejo de receptor de ecdisona**

30 Prioridad:

**21.02.2003 US 449467 P**

**19.02.2004 US 783810**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.03.2014**

73 Titular/es:

**INTREXON CORPORATION (100.0%)**

**1750 Kraft Drive, Suite 1400**

**Blacksburg, VA 24060 , US**

72 Inventor/es:

**HORMANN, ROBERT, EUGENE;**

**CHORTYK, ORESTES y**

**LE, DAT, PHAT**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 445 822 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Ligandos de oxadiazolina para modular la expresión de genes exógenos a través de un complejo de receptor de ecdisona

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 60/449.467 presentada el 21 de febrero de 2003.

**Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere al campo de la biotecnología o ingeniería genética. Específicamente, esta invención se refiere al campo de la expresión génica. Más específicamente, esta invención se refiere a ligandos no esteroideos para receptores nucleares naturales y mutados y a su uso en un sistema de expresión génica inducible basado en receptores nucleares y a métodos de modulación de la expresión de un gen dentro de una célula huésped usando estos ligandos y el sistema de expresión génica inducible.

**Antecedentes de la invención**

20 En el presente documento se citan diversas publicaciones, cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad. Sin embargo, la mención de cualquier referencia en el presente documento no debe considerarse un reconocimiento de que tal referencia está disponible como "técnica anterior" a la presente solicitud.

25 En el campo de la ingeniería genética, el control preciso de la expresión génica es una herramienta valiosa para estudiar, manipular y controlar el desarrollo y otros procesos fisiológicos. La expresión génica es un proceso biológico complejo que implica varias interacciones proteína-proteína específicas. Con el fin de desencadenar la expresión génica, de manera que produzca el ARN necesario como primera etapa en la síntesis de proteínas, debe llevarse un activador de la transcripción a las proximidades de un promotor que controla la transcripción génica. Normalmente, el propio activador de la transcripción está asociado con una proteína que tiene al menos un dominio de unión a ADN que se une a sitios de unión del ADN presentes en las regiones promotoras de los genes. Por tanto, para que se produzca la expresión génica, una proteína que comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de transactivación ubicado a una distancia apropiada del dominio de unión a ADN debe llevarse a la posición correcta en la región promotora del gen.

35 El enfoque transgénico tradicional utiliza un promotor específico del tipo celular para dirigir la expresión de un transgén diseñado. En primer lugar, se incorpora un constructo de ADN que contiene el transgén en un genoma huésped. Cuando se desencadena por un activador de la transcripción, se produce la expresión del transgén en un tipo celular dado.

40 Otro medio para regular la expresión de genes foráneos en células es a través de promotores inducibles. Los ejemplos del uso de tales promotores inducibles incluyen el promotor PR1-a, sistemas de represor-operador de procariontes, sistemas de inmunosupresor-inmunofilina y sistemas de activación de la transcripción de eucariotas superiores tales como sistemas de receptores de hormonas esteroideas y se describen a continuación.

45 El promotor PR1-a del tabaco se induce durante la respuesta de resistencia sistémica adquirida tras el ataque de patógenos. El uso de PR1-a puede estar limitado porque a menudo responde a materiales endógenos y factores externos tales como patógenos, radiación UV-B y contaminantes. Se han descrito sistemas de regulación génica basados en promotores inducidos por choque térmico, interferón y metales pesados (Wurn *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5414-5418; Amheiter *et al.*, 1990 Cell 62:51-61; Filmus *et al.*, 1992 Nucleic Acids Research 20:27550-27560). Sin embargo, estos sistemas tienen limitaciones debido a su efecto sobre la expresión de genes no diana. Estos sistemas también son rezumantes.

50 Los sistemas de represor-operador de procariontes utilizan proteínas represoras bacterianas y secuencias de ADN de operador único a las que se unen. Se han usado los sistemas de represor-operador tanto de tetraciclina ("Tet") como de lactosa ("Lac") de la bacteria *Escherichia coli* en plantas y animales para controlar la expresión génica. En el sistema Tet, la tetraciclina se une a la proteína represora TetR, dando como resultado un cambio conformacional que libera la proteína represora del operador que como resultado permite que se produzca la transcripción. En el sistema Lac, se activa un operón lac en respuesta a la presencia de lactosa, o análogos sintéticos tales como isopropil-b-D-tiogalactósido. Desgraciadamente, el uso de tales sistemas está limitado por la química inestable de los ligandos, es decir tetraciclina y lactosa, por su toxicidad, por su presencia natural o por los niveles relativamente altos requeridos para la inducción o represión. Por motivos similares, está limitada la utilidad de tales sistemas en animales.

65 Las moléculas inmunosupresoras tales como FK506, rapamicina y ciclosporina A pueden unirse a inmunofilinas FKBP12, ciclofilina, etc. Usando esta información, se ha ideado una estrategia general para reunir dos proteínas cualesquiera colocando simplemente FK506 en cada una de las dos proteínas o colocando FK506 en una y ciclosporina A en otra. Entonces puede usarse un homodímero sintético de FK506 (FK1012) o un compuesto que

resulta de la fusión de FK506-ciclosporina (FKCsA) para inducir la dimerización de estas moléculas (Spencer *et al.*, 1993, Science 262:1019-24; Belshaw *et al.*, 1996 Proc Natl Acad Sci U S A 93:4604-7). Se usaron el dominio de unión a ADN de Gal4 fusionado a FKBP12 y el dominio activador de VP16 fusionado a ciclofilina y el compuesto FKCsA para mostrar heterodimerización y activación de un gen indicador bajo el control de un promotor que  
 5 contiene sitios de unión a Gal4. Desgraciadamente, este sistema incluye inmunosupresores que pueden tener efectos secundarios no deseados y por tanto, se limita su uso a diversas aplicaciones de cambio génico en mamíferos.

También se han empleado sistemas de activación de la transcripción de eucariotas superiores tales como sistemas  
 10 de receptores de hormonas esteroideas. Los receptores de hormonas esteroideas son miembros de la superfamilia de receptores nucleares y se encuentran en células de vertebrados e invertebrados. Desgraciadamente, el uso de compuestos esteroideos que activan los receptores para la regulación de la expresión génica, particularmente en plantas y mamíferos, está limitado debido a su implicación en muchas otras rutas biológicas naturales en tales organismos. Con el fin de superar tales dificultades, se ha desarrollado un sistema alternativo usando receptores de  
 15 ecdisona (EcR) de insectos

El crecimiento, la muda y el desarrollo en los insectos están regulados por la hormona esteroidea ecdisona (hormona de la muda) y las hormonas juveniles (Dhadialla, *et al.*, 1998, Annu. Rev. Entomol. 43: 545-569). La diana molecular para ecdisona en insectos consiste en al menos el receptor de ecdisona (EcR) y la proteína  
 20 ultraespiráculo (USP). El EcR es un miembro de la superfamilia de receptores de esteroides nucleares que se caracteriza por dominios de unión a ADN y a ligandos distintivos y un dominio de activación (Koelle *et al.* 1991, Cell, 67: 59-77). Los receptores EcR responden a varios compuestos esteroideos tales como ponasterona A y muristerona A. Recientemente, se han descrito compuestos no esteroideos con actividad agonista ecdiesteroides, incluyendo los insecticidas disponibles comercialmente tebufenozida y metoxifenozida que se comercializan en todo  
 25 el mundo por Rohm and Haas Company (véase la solicitud de patente internacional n.º PCT/EP96/00686 y la patente estadounidense 5.530.028). Ambos análogos tienen perfiles de seguridad excepcionales para otros organismos.

El receptor de ecdisona (EcR) de insectos heterodimeriza con ultraespiráculo (USP), el homólogo de insectos de  
 30 RXR de mamíferos, y se une a elementos de respuesta del receptor de ecdisona y ecdiesteroides y activa la transcripción de genes de respuesta a ecdisona. Los complejos EcR/USP/ligando desempeñan importantes papeles durante el desarrollo y la reproducción de insectos. El EcR es un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas y tiene cinco dominios modulares, dominios A/B (transactivación), C (unión a ADN, heterodimerización), D (bisagra, heterodimerización), E (unión a ligando, heterodimerización y transactivación) y F (transactivación). Algunos de estos dominios tales como A/B, C y E conservan su función cuando se fusionan a otras  
 35 proteínas.

Los sistemas de expresión génica inducible regulados estrechamente, o "interruptores génicos", son útiles en  
 40 diversas aplicaciones, tales como terapia génica, producción a gran escala de proteínas en células, ensayos de selección de alto rendimiento basados en células, genómica funcional y regulación de caracteres en plantas y animales transgénicos.

La primera versión de un interruptor génico basado en EcR utilizó el EcR de *Drosophila melanogaster* (DmEcR) y  
 45 RXR de *Mus musculus* (MmRXR) y mostró que estos receptores en presencia del esteroide ponasterona A, transactivan genes indicadores en líneas celulares de mamífero y ratones transgénicos (Christopherson K. S., Mark M.R., Baja J. V., Godowski P. J. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 6314-6318; No D., Yao T.P., Evans R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 3346-3351). Más tarde, Suhr *et al.* 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. 95:7999-8004 mostraron que el agonista no esteroideo de ecdisona, tebufenozida, inducía un alto nivel de transactivación de genes indicadores en células de mamífero a través de EcR de *Bombyx mori* (BmEcR) en ausencia de pareja  
 50 exógena del heterodímero.

Las solicitudes de patente internacional n.ºs PCT/US97/05330 (documento WO 97/38117) y PCT/US99/08381 (documento WO99/58155) dan a conocer métodos para modular la expresión de un gen exógeno en que se activa  
 55 un constructo de ADN que comprende el gen exógeno y un elemento de respuesta a ecdisona por un segundo constructo de ADN que comprende un receptor de ecdisona que, en presencia de un ligando para el mismo, y opcionalmente en presencia de un receptor que puede actuar como pareja silenciosa, se une al elemento de respuesta a ecdisona para inducir la expresión génica. El receptor de ecdisona de elección se aisló de *Drosophila melanogaster*. Normalmente, tales sistemas requieren la presencia de la pareja silenciosa, preferiblemente el receptor X retinoide (RXR), con el fin de proporcionar activación óptima. En células de mamífero, el receptor de ecdisona (EcR) de insectos heterodimeriza con el receptor X retinoide (RXR) y regula la expresión de genes diana  
 60 de manera dependiente de ligando. La solicitud de patente internacional n.º PCT/US98/14215 (documento WO 99/02683) da a conocer que el receptor de ecdisona aislado del gusano de seda *Bombyx mori* es funcional en sistemas de mamíferos sin necesidad de una pareja exógena del dímero.

La patente estadounidense n.º 6.265.173 B1 da a conocer que diversos miembros de la superfamilia de receptores esteroideos/tiroideos pueden combinarse con el receptor de ultraespiráculo (USP) de *Drosophila melanogaster* o

fragmentos del mismo que comprenden al menos el dominio de dimerización de USP para su uso en un sistema de expresión génica. La patente estadounidense n.º 5.880.333 da a conocer un sistema de heterodímero de EcR y ultraespiráculo (USP) de *Drosophila melanogaster* usado en plantas en que el dominio de transactivación y el dominio de unión a ADN están colocados en dos proteínas híbridas diferentes. Desgraciadamente, estos sistemas basados en USP son constitutivos en células de animales y por lo tanto, no son eficaces para regular la expresión de genes indicadores.

En cada uno de estos casos, el dominio de transactivación y el dominio de unión a ADN (o bien como EcR nativo tal como en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US98/14215 o bien como EcR modificado, tal como en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US97/05330) se incorporaron en una única molécula y los otros componentes heterodiméricos, o bien USP o bien RXR, se usaron en su estado nativo.

Los inconvenientes de los sistemas de regulación génica basados en EcR descritos anteriormente incluyen una actividad de fondo considerable en ausencia de ligandos y la no aplicabilidad de estos sistemas para su uso tanto en plantas como en animales (véase la patente estadounidense n.º 5.880.333). Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de sistemas basados en EcR mejorados para modular con precisión la expresión de genes exógenos tanto en plantas como en animales. Tales sistemas mejorados serían útiles para aplicaciones tales como terapia génica, producción a gran escala de proteína y anticuerpos, ensayos de selección de alto rendimiento basados en células, genómica funcional y regulación de caracteres en animales transgénicos. Para determinadas aplicaciones tales como la terapia génica, puede ser deseable tener un sistema de expresión génica inducible que responda bien a ligandos no esteroideos sintéticos y que simultáneamente sea insensible a los esteroides naturales. Por tanto, sistemas mejorados que sean sencillos, compactos y dependientes de ligandos que sean relativamente económicos, fácilmente disponibles y de baja toxicidad para el huésped demostrarían ser útiles para regular sistemas biológicos.

Recientemente, se ha demostrado que un sistema de expresión génica inducible basado en el receptor de ecdisona en que los dominios de transactivación y de unión a ADN se separan uno de otro al colocarlos en dos proteínas diferentes, da como resultado una actividad de fondo muy reducida en ausencia de un ligando y una actividad significativamente aumentada con respecto al fondo en presencia de un ligando (solicitud de patente en trámite PCT/US01/09050, incorporada al presente documento en su totalidad como referencia). Este sistema de dos híbridos es un sistema de modulación de la expresión génica inducible significativamente mejorado en comparación con los dos sistemas dados a conocer en las solicitudes PCT/US97/05330 y PCT/US98/14215. El sistema de dos híbridos se aprovecha de la capacidad de un par de proteínas que interactúan para llevar el dominio de activación de la transcripción a una posición más favorable con respecto al dominio de unión a ADN, de manera que cuando el dominio de unión a ADN se une al sitio de unión del ADN en el gen, el dominio de transactivación activa más eficazmente el promotor (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.283.173). Brevemente, el sistema de expresión génica de dos híbridos comprende dos casetes de expresión génica: codificando el primero para un dominio de unión a ADN fusionado a un polipéptido de receptor nuclear, y codificando el segundo para un dominio de transactivación fusionado a un polipéptido de receptor nuclear diferente. En presencia de ligando, la interacción del primer polipéptido con el segundo polipéptido ancla eficazmente el dominio de unión a ADN al dominio de transactivación. Puesto que los dominios de unión a ADN y de transactivación residen en dos moléculas diferentes, la actividad de fondo en ausencia de ligando está muy reducida.

Un sistema de dos híbridos también proporciona sensibilidad mejorada a ligandos no esteroideos, por ejemplo, diacilhidrazinas, cuando se compara con ligandos esteroideos, por ejemplo, ponasterona A ("Pon A") o muristerona A ("MurA"). Es decir, cuando se compara con ligandos esteroideos, los ligandos no esteroideos proporcionan una actividad superior a una concentración inferior. Además, puesto que la transactivación basada en interruptores génicos de EcR con frecuencia es dependiente de la línea celular, es más fácil adaptar los sistemas de interruptor para obtener la máxima capacidad de transactivación para cada aplicación. Además, el sistema de dos híbridos evita algunos efectos secundarios debidos a la sobreexpresión de RXR que se producen a menudo cuando se usa RXR no modificado como pareja de interruptor. En un sistema de dos híbridos preferido, los dominios nativos de unión a ADN y de transactivación de EcR o RXR se eliminan y como resultado, estas moléculas híbridas tienen menos posibilidad de interactuar con otros receptores de hormonas esteroideas presentes en la célula dando como resultado efectos secundarios reducidos.

Con la mejora en los sistemas de regulación génica basados en el receptor de ecdisona hay un aumento en su uso en diversas aplicaciones, dando como resultado una demanda aumentada de ligandos con actividad superior a los que existen actualmente. La patente estadounidense 6.258.603 B1 (y patentes citadas en la misma) dan a conocer ligandos de dibenzoilhidrazina, sin embargo, existe la necesidad de ligandos adicionales con diferentes estructuras y propiedades fisicoquímicas. Se han descubierto ligandos distintos a diacilhidrazina novedosos que no se ha descrito ni mostrado anteriormente que tengan capacidad para modular la expresión de transgenes.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a ligandos no esteroideos para su uso en un sistema de expresión génica inducible basado en receptores nucleares y a métodos de modulación de la expresión de un gen dentro de una célula huésped usando estos ligandos con sistemas de expresión génica inducible basados en receptores nucleares.

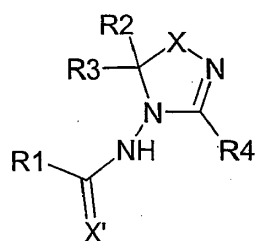
La invención de los solicitantes también se refiere a métodos de modulación de la expresión génica en una célula huésped usando un sistema de modulación de la expresión génica con un ligando de la presente invención. Específicamente, la invención de los solicitantes proporciona un método de modulación de la expresión de un gen en una célula huésped que comprende las etapas de: a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica según la invención; b) introducir en la célula huésped un casete de expresión génica que comprende i) un elemento de respuesta que comprende un dominio al que se une el dominio de unión a ADN del primer polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; y iii) un gen cuya expresión va a modularse; y c) introducir en la célula huésped un ligando; con lo que con la introducción del ligando en la célula huésped, se modula la expresión del gen. La invención de los solicitantes también proporciona un método de modulación de la expresión de un gen en una célula huésped que comprende un casete de expresión génica que comprende un elemento de respuesta que comprende un dominio al que se une el dominio de unión a ADN del primer polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; y un gen cuya expresión va a modularse; en el que el método comprende las etapas de: a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica según la invención; y b) introducir en la célula huésped un ligando; con lo que con la introducción del ligando en el huésped, se modula expresión del gen.

### Descripción detallada de la invención

Los solicitantes han descubierto ligandos novedosos para receptores nucleares naturales y mutados. Por tanto, la invención de los solicitantes proporciona un ligando para su uso con el sistema de expresión génica inducible basado en el receptor de ecdisona útil para modular la expresión de un gen de interés en una célula huésped. En una realización particularmente deseable, la invención de los solicitantes proporciona un sistema de expresión génica inducible que tiene un nivel reducido de expresión génica de fondo y responde a concentraciones submicromolares de ligando no esteroideo. Por tanto, los ligandos novedosos de los solicitantes y el sistema de expresión génica inducible y su uso en métodos de modulación de la expresión génica en una célula huésped superan las limitaciones de los sistemas de expresión inducible disponibles actualmente y proporcionan al experto en la técnica un medio eficaz para controlar la expresión génica.

La presente invención es útil para aplicaciones tales como terapia génica, producción a gran escala de proteínas y anticuerpos, ensayos de selección de alto rendimiento basados en células, genómica, proteómica, metabolómica funcionales y regulación de caracteres en organismos transgénicos, donde son deseables niveles de control de la expresión génica. Una ventaja de la invención de los solicitantes es que proporciona un medio para regular la expresión génica y adaptar los niveles de expresión para ajustarse a las necesidades del usuario.

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general:



en la que:

X y X' son independientemente O o S;

R<sup>1</sup> es

a) H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxicarbonil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o benciloxilo;

b) fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); fenoxilo; haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquenoilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoílo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alcoxicarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>);

- alquilaminocarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>); mercapto; alquiltio (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros;
- 5 c) naftilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino;
- 10 d) benzotiofen-2-ilo, benzotiofen-3-ilo, benzofuran-2-ilo o benzofuran-3-ilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo o alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>);
- 15 e) 2, 3 ó 4-piridilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);
- 20 f) heterociclo de 5 miembros sustituido o no sustituido seleccionado de furilo, tiofenilo, triazolilo, pirrolilo, isopirrolilo, pirazolilo, isoimidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo o isooxazolilo en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o amino (-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>);
- 25 g) fenilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenoxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o
- 30 h) fenilamino, fenilalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-amino o fenilcarbonilamino sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino;
- en los que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;
- R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo, o juntos como una unión de alcano (-CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-, una unión de alquiloxialquilo -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-, una unión de alquilaminoalquilo -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>NR<sup>a</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>- o una unión de alquilbenzoalquilo -(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-benzo-2-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>- forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos,
- 35 en los que x = de 3 a 7, y = de 1 a 3, z = de 1 a 3 y R<sup>a</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo; y
- 40 R<sup>4</sup> es fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); fenoxilo; haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alcoxycarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>); alquilaminocarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>); mercapto; alquiltio (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse para formar un anillo heterocíclico dioxolano (-OCH<sub>2</sub>O-) o dioxano (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) de 5 ó 6 miembros; en los que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;
- 55 siempre que R<sup>4</sup> no sea 3-nitrofenilo o 4-nitrofenilo, y
- cuando R<sup>4</sup> es fenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilo,
- cuando R<sup>4</sup> es 3-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilamino o
- 60 cuando R<sup>4</sup> es 4-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es metilo.
- Se prefieren los compuestos de la fórmula general cuando:
- 65 X y X' son independientemente O o S;

R<sup>1</sup> es

a) H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxicarbonil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o benciloxilo;

5 b) fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros;

c) benzotiofen-2-ilo o benzofuran-2-ilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

d) 2, 3 ó 4-piridilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

e) heterociclo de 5 miembros sustituido o no sustituido seleccionado de furilo, tiofenilo, triazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo o isooxazolilo en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo o alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>);

f) fenilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenoxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); o

g) fenilamino, fenilalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-amino o fenilcarbonilamino sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo, o juntos como una unión de alcano (-CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-, una unión de alquiloxialquilo (-CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-, una unión de alquilaminoalquilo (-CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>NR<sup>a</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>- o una unión de alquilbenzoalquilo (-CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-benzo-2-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>- forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos,

en los que x = de 3 a 7, y = de 1 a 3, z = de 1 a 3 y R<sup>a</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo; y

R<sup>4</sup> es fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquino (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros; en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

siempre que R<sup>4</sup> no sea 3-nitrofenilo o 4-nitrofenilo, y

cuando R<sup>4</sup> es fenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilo,

cuando R<sup>4</sup> es 3-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilamino o

cuando R<sup>4</sup> es 4-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es metilo.

Son más preferidos los compuestos de la fórmula general cuando:

X es O;

5 X' es O o S;

R<sup>1</sup> es

10 a) H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alcocarbonil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

b) fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcóxido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); o fenilo; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcóxido, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros;

20 c) benzotiofen-2-ilo o benzofuran-2-ilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alcóxido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

d) furilo o tiofenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcóxido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o fenilo;

25 e) fenilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenoxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcóxido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); o

30 f) fenilamino, fenilalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-amino o fenilcarbonilamino sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcóxido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

35 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo, o juntos como una unión de alcano  $-(\text{CH}_2)_x-$ , una unión de alquiloxialquilo  $-(\text{CH}_2)_y\text{O}(\text{CH}_2)_z-$ , una unión de alquilaminoalquilo  $-(\text{CH}_2)_y\text{NR}^a(\text{CH}_2)_z-$  o una unión de alquilbenzoalquilo  $-(\text{CH}_2)_y-1\text{-benzo-2-}(\text{CH}_2)_z-$  forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos,

en los que x = de 3 a 7, y = de 1 a 3, z = de 1 a 3 y R<sup>a</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo; y

40 R<sup>4</sup> es fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcóxido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); o fenilo; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcóxido, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros; en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

siempre que R<sup>4</sup> no sea 3-nitrofenilo o 4-nitrofenilo, y

cuando R<sup>4</sup> es fenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilo,

50 cuando R<sup>4</sup> es 3-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilamino o

cuando R<sup>4</sup> es 4-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es metilo.

55 Son incluso más preferidos los compuestos de la fórmula general cuando:

X y X' son O;

60 R<sup>1</sup> es fenilo, 4-clorofenil-, 4-etilfenil-, 2-etil-3,4-etilendioxifenilo, 3-fluorofenil-, 2-fluoro-4-etilfenil-, 2-metil-3-metoxifenil-, 2-etil-3-metoxifenilo, 3-metilfenil-, 2-metoxifenil-, 2-nitrofenil-, 3-nitrofenil-, 2-furanil-, bencil-, benzotiofen-2-il-, fenilamino-, benciloximetil-, fenoximetil-, 3-toluilamino-, bencilamino-, benzoilamino-, etoxicarboniletíl- o 3-cloro-2,2,3,3-tetrafluoroetil;

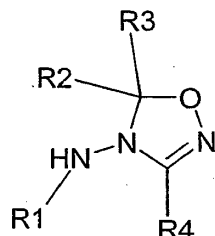
65 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente metilo, etilo, o juntos como una unión de tetrametileno  $-(\text{CH}_2)_4-$ , 4-pirano  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2)-$  o metilbenzoetileno  $-(\text{CH}_2-1\text{-benzo-2-CH}_2\text{CH}_2)-$  forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos; y



R<sup>4</sup> es fenilo, 4-bifenilo, 4-clorofenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetilfenilo, 2-metoxifenilo, 3,4-metilendioxifenilo, 3-trifluorometilfenilo o 4-trifluorometoxifenilo;

5 siempre que cuando R<sup>4</sup> es fenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilo.

Los compuestos de la presente invención más preferidos son los siguientes:



10

Compuesto	R1	R2	R3	R4
RG-120001	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120002	3-F-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120003	2-furanoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120004	CClF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120005	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120006	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120008	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120009	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120011	Benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120012	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120013	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120014	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120015	Benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120016	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120017	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120018	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120019	Benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120020	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Ph-Ph-
RG-120021	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120022	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120023	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120024	4-Cl-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120025	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120026	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120027	PhNHC(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120029	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120030	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120031	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120033	Benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-

ES 2 445 822 T3

RG-120034	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120035	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120037	2-CH <sub>3</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	-CH <sub>2</sub> -1-benzo-2-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120038	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120039	Benzoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120040	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120041	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120042	2-CH <sub>3</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120044	Benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120045	2-CH <sub>3</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120046	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120047	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120048	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120049	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120050	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120051	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120052	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120054	PhNHC(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120055	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -		4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120056	3-CH <sub>3</sub> PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120057	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -		2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120058	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -		2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120059	CCIF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -		3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120060	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120061	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -		3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120062	CCIF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -		2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120063	CCIF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120066	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120067	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120069	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120070	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120071	2-furanoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120072	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120073	CCIF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120075	2-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120076	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120077	3-CH <sub>3</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120078	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120079	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120080	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120081	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-

ES 2 445 822 T3

RG-120082	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120083	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120084	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120086	2-CH <sub>3</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120087	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120088	PhCH <sub>2</sub> NHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120089	Benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120090	CClF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120091	3-NO <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120092	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120093	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120094	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120095	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120096	Benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120098	2-NO <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120099	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120100	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120102	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120103	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120106	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120108	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120109	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120110	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120111	PhC(O)NHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120112	PhNHC(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120114	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120115	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120117	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120118	Benzoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120120	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120121	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120122	PhNHC(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120124	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120125	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120126	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120127	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120128	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	H <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120129	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120130	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120132	PhNHC(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120133	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-

RG-120135	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2,4-di-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120137	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120138	2-furanoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120140	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120141	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120142	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Ph-Ph-
RG-120144	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120145	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120146	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120147	Benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120148	4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120149	2-furanoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120150	benzotiofen-2-C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120151	Benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120152	benzotiofen-2-C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120153	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120154	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-120155	PhCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120156	Benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-
RG-120157	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	2-CH <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120158	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-120159	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3-CH <sub>3</sub> O-benzoil-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -		Ph-
RG-120160	PhCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-CF <sub>3</sub> O-Ph-
RG-120161	benzotiofen-2-C(O)-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-120162	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-120163	PhOCH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	3-CF <sub>3</sub> -Ph-
RG-120164	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	4-Cl-Ph-
RG-121513	2-F-4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-121514	2-F-4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		Ph-
RG-121515	2-F-4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -		3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-
RG-121516	2-F-4-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-121517	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3,4-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	Ph-
RG-121518	2-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -3,4-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-benzoil-	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	3,5-di-CH <sub>3</sub> -Ph-

Puesto que los compuestos de la fórmula general de la presente invención pueden contener varios átomos de carbono estereogénicos, los compuestos pueden existir como enantiómeros, diastereómeros, estereoisómeros o sus mezclas, aunque un centro estereogénico esté explícitamente especificado.

5

#### DEFINICIONES

El término "alquilo" incluye grupos alquilo tanto de cadena lineal como ramificada. Los grupos alquilo típicos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, n-heptilo, isoctilo, nonilo y decilo.

10

El término "halo" se refiere a fluoro, cloro, bromo o yodo.

- El término “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno o más grupos halo tales como, por ejemplo, clorometilo, 2-bromoetilo, 3-yodopropilo, trifluorometilo y perfluoropropilo.
- 5 El término “cicloalquilo” se refiere a una estructura de anillo alifático cíclico, opcionalmente sustituido con alquilo, hidroxilo o halo, tal como ciclopropilo, metilciclopropilo, ciclobutilo, 2-hidroxiciclopropilo, ciclohexilo y 4-clorociclohexilo.
- 10 El término “hidroxialquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno o más grupos hidroxilo tales como, por ejemplo, hidroximetilo y 2,3-dihidroxibutilo.
- 15 El término “alquilsulfonilo” se refiere a un resto sulfonilo sustituido con un grupo alquilo tal como, por ejemplo, mesilo y *n*-propilsulfonilo.
- El término “alqueno” se refiere a un grupo hidrocarbonado etilénicamente insaturado, de cadena lineal o ramificada, que tiene 1 ó 2 uniones etilénicas tales como, por ejemplo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isopropenilo y 2-pentenilo.
- 20 El término “haloalqueno” se refiere a un grupo alqueno sustituido con uno o más grupos halo.
- El término “alquino” se refiere a un grupo hidrocarbonado insaturado, lineal o ramificado, que tiene 1 ó 2 uniones acetilénicas tales como, por ejemplo, etinilo y propargilo.
- 25 El término “alquilcarbonilo” se refiere a una funcionalidad alquilceto, por ejemplo acetilo, *n*-butirilo y similares.
- 30 El término “heterociclilo” o “heterociclo” se refiere a un anillo sustituido o no sustituido; saturado, parcialmente insaturado o insaturado, de 5 ó 6 miembros, que contiene uno, dos o tres heteroátomos, preferiblemente uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos de heterociclos incluyen, por ejemplo, piridilo, tienilo, furilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, indolilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, tetrahidropirranilo, morfolinilo, piperazinilo, dioxolanilo y dioxanilo.
- 35 El término “alcoxilo” incluye grupos alquilo tanto de cadena lineal como ramificada unidos a un átomo de oxígeno terminal. Los grupos alcoxilo típicos incluyen, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, *n*-propoxilo, isopropoxilo y *tert*-butoxilo.
- 40 El término “haloalcoxilo” se refiere a un grupo alcoxilo sustituido con uno o más grupos halo tales como, por ejemplo clorometoxilo, trifluorometoxilo, difluorometoxilo y perfluoroisobutoxilo.
- El término “alquiltio” incluye grupos alquilo tanto de cadena lineal como ramificada, unidos a un átomo de azufre terminal tal como, por ejemplo metiltio.
- 45 El término “haloalquiltio” se refiere a un grupo alquiltio sustituido con uno o más grupos halo tales como, por ejemplo trifluorometiltio.
- El término “alcoxialquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxilo tal como, por ejemplo, isopropoximetilo.
- 50 “Cromatografía en gel de sílice” se refiere a un método de purificación en el que se aplica una sustancia química de interés como una muestra concentrada a la parte superior de una columna vertical de gel de sílice o gel de sílice químicamente modificado contenido en un cilindro de vidrio, plástico o metal, y la elución de tal columna con un disolvente o mezcla de disolventes.
- 55 “Cromatografía ultrarrápida” se refiere a cromatografía en gel de sílice realizada bajo presión de aire, argón o nitrógeno normalmente en el intervalo de 10 a 50 psi.
- 60 “Cromatografía en gradiente” se refiere a cromatografía en gel de sílice en la que la sustancia química se eluye de una columna con una composición que cambia progresivamente de una mezcla de disolventes.
- “R<sub>f</sub>” es un término de cromatografía en capa fina que se refiere a la distancia fraccional de movimiento de una sustancia química de interés sobre una placa de cromatografía en capa fina, con respecto a la distancia de movimiento del sistema de disolventes en elución.
- 65 El término “aislado” para los fines de la presente invención designa un material biológico (ácido nucleico o proteína) que se ha retirado de su entorno original (el entorno en que está presente de manera natural). Por ejemplo, un polinucleótido presente en estado natural en una planta o un animal no está aislado, sin embargo el mismo polinucleótido separado de los ácidos nucleicos adyacentes en que está presente de manera natural, se considera “aislado”. El término “purificado” no requiere que el material esté presente en una forma que muestre pureza

absoluta, excluyendo la presencia de otros compuestos. Es más bien una definición relativa.

Un polinucleótido está en el estado "purificado" tras la purificación del material de partida o del material natural en al menos un orden de magnitud, preferiblemente 2 ó 3 y preferiblemente 4 ó 5 órdenes de magnitud.

Un "ácido nucleico" es un compuesto polimérico compuesto por subunidades unidas covalentemente denominadas nucleótidos. Ácido nucleico incluye poli(ácido ribonucleico) (ARN) y poli(ácido desoxirribonucleico) (ADN), pudiendo ser ambos monocatenarios o bicatenarios. El ADN incluye, pero no se limita a, ADNc, ADN genómico, ADN de plásmidos, ADN sintético y ADN semi-sintético. El ADN puede ser lineal, circular o superenrollado.

Una "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica de éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquier análogo de fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, o bien en forma monocatenaria o bien como una hélice bicatenaria. Son posibles hélices de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN bicatenarias. El término molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, se refiere sólo a la estructura primaria o secundaria de la molécula y no la limita a ninguna forma terciaria particular. Por tanto, este término incluye ADN bicatenario encontrado, entre otros en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. Al comentar la estructura de moléculas de ADN bicatenarias particulares, las secuencias pueden describirse en el presente documento según el convenio normal de facilitar sólo la secuencia en el sentido de 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula que se ha sometido a manipulación de biología molecular.

El término "fragmento" se entenderá que significa una secuencia de nucleótido de longitud reducida con respecto al ácido nucleico de referencia y que comprende, en la parte común, una secuencia de nucleótido idéntica al ácido nucleico de referencia. Un fragmento de ácido nucleico de este tipo según la invención puede estar incluido, cuando sea apropiado, en un polinucleótido más largo del que es un constituyente. Tales fragmentos comprenden, o alternativamente consisten en, oligonucleótidos que oscilan en longitud entre al menos 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000 o 1500 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico según la invención.

Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un polímero de ARN o ADN que es mono o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Un "gen" se refiere a un conjunto de nucleótidos que codifican para un polipéptido, e incluye ácidos nucleicos de ADNc y ADN genómico. "Gen" también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína o polipéptido específico, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes en 5') y que siguen (secuencias no codificantes en 3') a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y/o codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de manera diferente a la encontrada en la naturaleza. Un gen quimérico puede comprender secuencias codificantes derivadas de diferentes fuentes y/o secuencias reguladoras derivadas de diferentes fuentes. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. Un gen "foráneo" o gen "heterólogo" se refiere a un gen normalmente no encontrado en el organismo huésped, sino que se introduce en el organismo huésped mediante transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

ADN "heterólogo" se refiere a ADN no ubicado de manera natural en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Preferiblemente, el ADN heterólogo incluye un gen foráneo a la célula.

El término "genoma" incluye ADN o ARN cromosómico, así como mitocondrial, de cloroplasto y viral.

Una molécula de ácido nucleico "puede hibridarse" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede aparearse con otra molécula de ácido nucleico en condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la disolución (véase Sambrook *et al.*, 1989 citado posteriormente). Se conocen bien las condiciones de hibridación y lavado y se facilitan a modo de ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), particularmente capítulo 11 y tabla 11.1 en ese documento (incorporado en el presente documento en su totalidad como referencia). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determina la "rigurosidad" de la hibridación. Las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para seleccionar fragmentos moderadamente similares, tales como secuencias homólogas de organismos

relacionados de manera distante, hasta fragmentos altamente similares, tales como genes que duplican las enzimas funcionales de organismos estrechamente relacionados. Para la selección preliminar de ácidos nucleicos homólogos, pueden usarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad, que se corresponden con una  $T_m$  de 55°, por ejemplo, 5x SSC, SDS al 0,1%, leche al 0,25% y sin formamida; o formamida al 30%, 5x SSC, SDS al 0,5%).

5 Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada se corresponden con una  $T_m$  superior, por ejemplo, formamida al 40%, con 5x o 6x SCC. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad se corresponden con la  $T_m$  más alta, por ejemplo, formamida al 50%, 5x o 6x SCC.

10 La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles apareamientos erróneos entre bases. El término "complementario" se usa para describir la relación entre bases de nucleótido que pueden hibridarse entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, adenosina es complementaria a timina y citosina es complementaria a guanina. Por consiguiente, la presente invención también incluye fragmentos de ácido nucleico aislados que son complementarios a las secuencias completas tal como se da a conocer o se usa en el presente documento, así como aquellas secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares.

15 En una realización específica de la invención, los polinucleótidos se detectan empleando condiciones de hibridación que comprenden una etapa de hibridación a  $T_m$  de 55°C, y utilizando condiciones tal como se expusieron anteriormente. En una realización preferida, la  $T_m$  es de 60°C; en una realización más preferida, la  $T_m$  es de 63°C; en una realización incluso más preferida, la  $T_m$  es de 65°C.

20 Los lavados posteriores a la hibridación también determinan las condiciones de rigurosidad. Un conjunto de condiciones preferidas usa una serie de lavados partiendo de 6X SSC, SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 15 minutos (min.), repetidos después con 2X SSC, SDS al 0,5% a 45°C durante 30 minutos, y repetidos después dos veces con 0,2X SSC, SDS al 0,5% a 50°C durante 30 minutos. Un conjunto más preferido de condiciones rigurosas usa temperaturas superiores en las que los lavados son idénticos a los indicados anteriormente excepto por la temperatura de los dos lavados finales de 30 min. en 0,2 X SSC, SDS al 0,5%, que se aumentó hasta 60°C. Otro conjunto preferido de condiciones altamente rigurosas usa dos lavados finales en 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 65°C. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos comprendan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles apareamientos erróneos entre bases.

30 La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor es el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótido, mayor es el valor de  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (que se corresponde con una  $T_m$  superior) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el orden siguiente: ARN:ARN, ADN:ARN y ADN:ADN. Para híbridos de longitud mayor de 100 nucleótidos, se han obtenido ecuaciones para calcular la  $T_m$  (véase Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 9.50-0.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir oligonucleótidos, la posición de los apareamientos erróneos se vuelve más importante y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 11.7-11.8).

35 En una realización específica de la invención, los polinucleótidos se detectan empleando condiciones de hibridación que comprenden una etapa de hibridación en sal a menos de 500 mM y a al menos 37 grados centígrados, y una etapa de lavado en 2X SSPE a al menos 63 grados centígrados. En una realización preferida, las condiciones de hibridación comprenden sal a menos de 200 mM y al menos 37 grados centígrados para la etapa de hibridación. En una realización más preferida, las condiciones de hibridación comprenden 2X SSPE y 63 grados centígrados para las etapas tanto de hibridación como de lavado.

40 En una realización, la longitud para un ácido nucleico que puede hibridarse es de al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Preferiblemente, una longitud mínima para un ácido nucleico que puede hibridarse es de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 nucleótidos y lo más preferiblemente la longitud es de al menos 30 nucleótidos. Además, el experto en la técnica reconocerá que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado pueden ajustarse según sea necesario según factores tales como la longitud de la sonda

45 El término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenario que puede formar pares de bases con un ácido nucleico diana monocatenario complementario para formar una molécula bicatenaria.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico, en general de al menos 18 nucleótidos, que puede hibridarse con una molécula de ADN genómico, una molécula de ADNc, un ADN de plásmido o una molécula de ARNm. Los oligonucleótidos pueden marcarse, por ejemplo, con <sup>32</sup>P-nucleótidos o nucleótidos con los que se ha conjugado covalentemente un marcador, tal como biotina. Un oligonucleótido marcado puede usarse como sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos (pudiendo estar uno o ambos marcados) pueden usarse como cebadores de PCR, para clonar o bien la longitud completa o bien un fragmento de un ácido nucleico, o para detectar la presencia de un ácido nucleico. Un oligonucleótido también puede usarse para formar una triple hélice con una molécula de ADN. En

general, los oligonucleótidos se preparan de manera sintética, preferiblemente en un sintetizador de ácidos nucleicos. Por consiguiente, los oligonucleótidos pueden prepararse con uniones análogas a fosfoéster que no se producen de manera natural, tales como uniones de tioéster, etc.

5 Un “cebador” es un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana para crear una región de ácido nucleico bicatenario que puede servir como punto de inicio para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. Tales cebadores pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa.

10 “Reacción en cadena de la polimerasa” se abrevia como PCR y significa un método *in vitro* para amplificar enzimáticamente secuencias específicas de ácido nucleico. La PCR implica una serie repetitiva de ciclos de temperatura comprendiendo cada ciclo tres fases: desnaturalización del ácido nucleico de molde para separar las cadenas de la molécula diana, apareamiento de un cebador oligonucleotídico de PCR monocatenario con el ácido nucleico de molde y extensión del(de los) cebador(es) apareado(s) mediante ADN polimerasa. La PCR proporciona un medio para detectar la presencia de la molécula diana y, en condiciones cuantitativas o semicuantitativas, determinar la cantidad relativa de esa molécula diana dentro del grupo de partida de ácidos nucleicos.

15 “Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa” se abrevia como RT-PCR y significa un método *in vitro* para producir enzimáticamente una molécula o moléculas de ADNc diana a partir de una molécula o moléculas de ARN, seguido por la amplificación enzimática de una secuencia o secuencias específicas de ácido nucleico dentro de la molécula o moléculas de ADNc diana tal como se describió anteriormente. La RT-PCR también proporciona un medio para detectar la presencia de la molécula diana y, en condiciones cuantitativas o semicuantitativas, determinar la cantidad relativa de esa molécula diana dentro del grupo de partida de ácidos nucleicos.

20 Una “secuencia codificante” de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y traduce para dar un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. “Secuencias reguladoras adecuadas” se refiere a secuencias de nucleótido ubicadas aguas arriba (secuencias no codificantes en 5’), dentro de o aguas abajo (secuencias no codificantes en 3’) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitio de procesamiento de ARN, sitio de unión de efectores y estructura de tallo-bucle. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5’ terminal (amino) y por un codón de terminación de la traducción en el extremo 3’ terminal (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias de procariotas, ADNc a partir del ARNm, secuencias de ADN genómico e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia codificante está destinada a la expresión en una célula eucariota, habitualmente se ubicará una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción en 3’ con respecto a la secuencia codificante

25 “Marco de lectura abierto” se abrevia ORF y significa una longitud de secuencia de ácido nucleico, o bien de ADN, ADNc o bien de ARN, que comprende una señal de inicio o un codón de inicio de la traducción, tal como ATG o AUG, y un codón de terminación y que puede traducirse potencialmente en una secuencia de polipéptido

30 El término “cabeza con cabeza” se usa en el presente documento para describir la orientación de dos secuencias de polinucleótido una en relación con la otra. Dos polinucleótidos están colocados en una orientación cabeza con cabeza cuando el extremo 5’ de la cadena codificante en un polinucleótido es adyacente al extremo 5’ de la cadena codificante en el otro polinucleótido, por lo que el sentido de transcripción de cada polinucleótido avanza alejándose del extremo 5’ del otro polinucleótido. El término “cabeza con cabeza” puede abreviarse (5’) con (5’) y también puede indicarse mediante los símbolos ( $\leftarrow \rightarrow$ ) o ( $3' \leftarrow 5' 5' \rightarrow 3'$ ).

35 El término “cola con cola” se usa en el presente documento para describir la orientación de dos secuencias de polinucleótido una en relación con la otra. Dos polinucleótidos están colocados en una orientación cola con cola cuando el extremo 3’ de la cadena codificante de un polinucleótido es adyacente al extremo 3’ de la cadena codificante del otro polinucleótido, por lo que el sentido de transcripción de cada polinucleótido avanza hacia el otro polinucleótido. El término “cola con cola” puede abreviarse (3’) con (3’) y también puede indicarse mediante los símbolos ( $\rightarrow \leftarrow$ ) o ( $5' \rightarrow 3' 3' \leftarrow 5'$ ).

40 El término “cabeza con cola” se usa en el presente documento para describir la orientación de dos secuencias de polinucleótido una en relación con la otra. Dos polinucleótidos están colocados en una orientación cabeza con cola cuando el extremo 5’ de la cadena codificante de un polinucleótido es adyacente al extremo 3’ de la cadena codificante del otro polinucleótido, por lo que el sentido de transcripción de cada polinucleótido avanza en el mismo sentido que el del otro polinucleótido. El término “cabeza con cola” puede abreviarse (5’) con (3’) y también puede indicarse mediante los símbolos ( $\rightarrow \rightarrow$ ) o ( $5' \rightarrow 3' 5' \rightarrow 3'$ ).

45 El término “aguas abajo” se refiere a una secuencia de nucleótido que está ubicada hacia 3’ con respecto a la secuencia de nucleótido de referencia. En particular, secuencias de nucleótido aguas abajo se refiere en general a secuencias que siguen al punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, el codón de inicio de la transcripción de un gen está ubicado aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.



El término “aguas arriba” se refiere a una secuencia de nucleótido que está ubicada hacia 5’ con respecto a la secuencia de nucleótido de referencia. En particular, secuencias de nucleótido aguas arriba se refiere en general a secuencias que están ubicadas en el lado de 5’ de una secuencia codificante o punto de inicio de la transcripción.  
 5 Por ejemplo, la mayoría de los promotores están ubicados aguas arriba del sitio de inicio de transcripción.

Los términos “endonucleasa de restricción” y “enzima de restricción” se refieren a una enzima que se une y corta dentro de una secuencia de nucleótido específica dentro del ADN bicatenario.

10 “Recombinación homóloga” se refiere a la inserción de una secuencia de ADN foránea en otra molécula de ADN, por ejemplo, la inserción de un vector en un cromosoma. Preferiblemente, el vector selecciona como diana un sitio cromosómico específico para recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá regiones de homología suficientemente largas con secuencias del cromosoma para permitir la unión complementaria y la incorporación del vector en el cromosoma. Regiones de homología más largas y mayores  
 15 grados de similitud de secuencia, pueden aumentar la eficacia de la recombinación homóloga.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para propagar un polinucleótido según la invención. Una vez que se ha establecido un sistema huésped y condiciones de crecimiento adecuados, pueden propagarse vectores de expresión recombinantes y prepararse en cantidad. Tal como se describe en el presente documento, los vectores de  
 20 expresión que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, los siguientes vectores o sus derivados: virus de seres humanos o animales tales como el virus vaccinia o adenovirus; virus de insectos tales como baculovirus; vectores de levaduras; vectores de bacteriófagos (por ejemplo, lambda) y vectores de ADN de plásmido y cósmido, por nombrar sólo algunos.

25 Un “vector” es cualquier medio para la clonación de y/o la transferencia de un ácido nucleico en una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que puede unirse otro segmento de ADN para provocar la replicación del segmento unido. Un “replicón” es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, que puede replicarse bajo su propio control. El término “vector” incluye tanto medios virales como no virales para introducir el ácido nucleico en  
 30 una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Puede usarse un gran número de vectores conocidos en la técnica para manipular ácidos nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores en genes, etc. Los vectores posibles incluyen, por ejemplo, plásmidos o virus modificados incluyendo, por ejemplo bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como los derivados de plásmido pBR322 o pUC, o el vector Bluescript. Por ejemplo, la inserción de los fragmentos de ADN que se corresponden con elementos de respuesta y promotores en un vector  
 35 adecuado puede llevarse a cabo mediante el ligamiento de fragmentos de ADN apropiados en un vector escogido que tiene extremos terminales cohesivos complementarios. Alternativamente, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente o puede producirse cualquier sitio mediante el ligamiento de secuencias de nucleótido (ligadores) en los extremos terminales del ADN. Tales vectores pueden modificarse por ingeniería genética para contener genes marcadores seleccionables que proporcionan la selección de células que han  
 40 incorporado el marcador en el genoma celular. Tales marcadores permiten la identificación y/o selección de células huésped que incorporan y expresan las proteínas codificadas por el marcador.

Se han usado vectores virales, y particularmente vectores retrovirales, en una amplia variedad de aplicaciones de suministro génico en células, así como en sujetos animales vivos. Los vectores virales que pueden usarse incluyen,  
 45 pero no se limitan a, vectores de retrovirus, virus adenoasociados, poxvirus, baculovirus, virus vaccinia, virus del herpes simple, virus de Epstein-Barr, adenovirus, geminivirus y caulimovirus. Los vectores no virales incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos de ADN-proteínas y biopolímeros. Además de un ácido nucleico, un vector puede comprender también una o más regiones reguladoras y/o marcadores seleccionables útiles en la selección, medición y monitorización de resultados de transferencia de ácido  
 50 nucleico (transferencia a tejidos, duración de expresión, etc.).

El término “plásmido” se refiere a un elemento extracromosómico que porta a menudo un gen que no forma parte del metabolismo central de la célula y habitualmente en forma de moléculas de ADN bicatenario circular. Tales  
 55 elementos pueden ser secuencias que se replican de manera autónoma, secuencias de integración de genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales, circulares o superenrolladas, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en que varias secuencias de nucleótido se han unido o recombinado en una única construcción que puede introducir en una célula un fragmento de promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida en 3’ apropiada.

60 Un “vector de clonación” es un “replicón”, que es una longitud de unidad de un ácido nucleico, preferiblemente ADN, que se replica secuencialmente y que comprende un origen de replicación, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación del segmento unido. Los vectores de clonación pueden replicarse en un tipo celular y expresarse en otro (“vector lanzadera”)

65 Los vectores pueden introducirse en las células huésped deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación de

fosfato cálcico, lipofección (fusión de lisosomas), uso de una pistola génica o de un transportador de vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1992, J. Biol. Chem. 267: 963-967; Wu y Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624; y Hartmut *et al.*, solicitud de patente canadiense n.º 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990).

5 Un polinucleótido según la invención también puede introducirse *in vivo* mediante lipofección. Durante la última década, ha habido un uso creciente de liposomas para encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Pueden usarse lípidos catiónicos diseñados para limitar las dificultades y peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas para preparar liposomas para transfección *in vivo* de un gen que codifica para un marcador (Felgner *et al.*, 1987, PNAS 84:7413; Mackey, *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8027-8031; y Ulmer *et al.*, 1993, Science 259:1745-1748). El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente y también promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner y Ringold, 1989, Science 337: 387-388). Compuestos y composiciones particularmente útiles para transferir ácidos nucleicos se describen en las publicaciones de patente internacional WO95/18863 y WO96/17823, y en la patente estadounidense n.º 5.459.127. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene determinadas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que dirigir la transfección a tipos celulares particulares sería particularmente preferido en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para el fin del direccionamiento (Mackey, *et al.*, 1988, citado anteriormente). Péptidos dirigidos, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, podrían acoplarse químicamente a liposomas.

También son útiles otras moléculas para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, documento WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (por ejemplo, documento WO96/25508) o un polímero catiónico (por ejemplo, documento WO95/21931).

25 También es posible introducir un vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo (véanse las patentes estadounidenses 5.693.622, 5.589.466 y 5.580.859). También pueden usarse enfoques de suministro de ADN mediado por receptor (Curiel *et al.*, 1992, Hum. Gene Ther. 3: 147-154; y Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432).

30 El término "transfección" significa la captación de ARN o ADN exógeno o heterólogo por una célula. Una célula se ha "transfectado" por ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando tal ARN o ADN se ha introducido dentro de la célula. Una célula se ha "transformado" mediante ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando el ARN o ADN transfectado realiza un cambio fenotípico. El ARN o ADN transformante puede integrarse (unirse covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula.

35 "Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de un organismo huésped, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

El término "región genética" se referirá a una región de una molécula de ácido nucleico o una secuencia de nucleótido que comprende un gen que codifica para un polipéptido.

45 Además, el vector recombinante que comprende un polinucleótido según la invención puede incluir uno o más orígenes para la replicación en huéspedes celulares en que se busca su amplificación o su expresión, marcadores o marcadores seleccionables.

50 El término "marcador seleccionable" significa un factor de identificación, habitualmente un gen de resistencia a antibiótico o producto químico, que puede seleccionarse basándose en el efecto del gen marcador, es decir, la resistencia a un antibiótico, resistencia a un herbicida, marcadores colorimétricos, enzimas, marcadores fluorescentes y similares, en el que el efecto se usa para rastrear la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables conocidos y usados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a ampicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida, y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen de isopentanol transferasa, y similares.

60 El término "gen indicador" significa un ácido nucleico que codifica para un factor de identificación que puede identificarse basándose en el efecto del gen indicador, en el que el efecto se usa para rastrear la herencia de un ácido nucleico de interés, para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés y/o para medir la inducción o transcripción de expresión génica. Ejemplos de genes indicadores conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT),  $\beta$ -galactosidasa (LacZ),  $\beta$ -glucuronidasa (Gus) y similares. Los genes marcadores seleccionables también pueden considerarse genes indicadores.

65

“Promotor” se refiere a una secuencia de ADN que puede controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante está ubicada en 3' con respecto a una secuencia de promotor. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos por elementos diferentes derivados de promotores diferentes encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos sintéticos de ADN. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes fases de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos celulares en la mayoría de los casos, se denominan comúnmente “promotores constitutivos”. Los promotores que hacen que un gen se exprese en un tipo celular específico se denominan comúnmente “promotores específicos de célula” o “promotores específicos de tejido”. Los promotores que hacen que un gen se exprese en una fase específica de desarrollo o diferenciación celular se denominan comúnmente “promotores específicos de desarrollo” o “promotores específicos de diferenciación celular”. Los promotores que se inducen y hacen que un gen se exprese tras la exposición o el tratamiento de la célula con un agente, molécula biológica, producto químico, ligando, luz, o similar que induce el promotor se denominan comúnmente “promotores inducibles” o “promotores regulables”. Se reconoce además que puesto que en la mayoría de los casos no se han definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras, fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener actividad promotora idéntica.

Una “secuencia de promotor” es una región reguladora de ADN que puede unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (en el sentido de 3'). Para los fines de definir la presente invención, la secuencia de promotor se une en su extremo terminal 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (en el sentido de 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia de promotor se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente por ejemplo, mapeando con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa.

Una secuencia codificante está “bajo el control” de secuencias control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante para dar ARNm, que entonces se somete a corte y empalme trans de ARN (si la secuencia codificante contiene intrones) y se traduce para dar la proteína codificada por la secuencia codificante.

“Secuencias control de la transcripción y la traducción” son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped. En células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias control.

El término “elemento de respuesta” significa uno o más elementos de ADN que actúan en cis que confieren capacidad de respuesta en un promotor mediada a través de la interacción con los dominios de unión a ADN del primer gen quimérico. Este elemento de ADN puede ser o bien palindrómico (perfecto o imperfecto) en su secuencia o bien puede estar compuesto de por motivos de secuencia o semisitios separados por un número variable de nucleótidos. Los semisitios pueden ser similares o idénticos y estar dispuestos como repeticiones o bien directas o bien invertidas o como un único semisitio o múltiplos de semisitios adyacentes en tándem. El elemento de respuesta puede comprender un promotor mínimo aislado de diferentes organismos dependiendo de la naturaleza de la célula u organismo en que se incorporará el elemento de respuesta. El dominio de unión a ADN de la primera proteína híbrida se une, en presencia o ausencia de un ligando, a la secuencia de ADN de un elemento de respuesta para iniciar o suprimir la transcripción del gen o genes aguas abajo bajo la regulación de este elemento de respuesta. Los ejemplos de secuencias de ADN para elementos de respuesta del receptor de ecdisona natural incluyen: RRGG/TTCANTGAC/ACYY (véase Cherbas L., *et. al.*, (1991), *Genes Dev.* 5, 120-131); AGGTCAN<sub>(n)</sub>AGGTCA, donde N<sub>(n)</sub> puede ser uno o más nucleótidos espaciadores (véase D'Avino PP., *et. al.*, (1995), *Mol. Cell. Endocrinol.* 113, 1-9); y GGGTTGAATGAATTT (véase Antoniewski C., *et. al.*, (1994). *Mol. Cell Biol.* 14,4465-4474).

El término “unido operativamente” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una resulta afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando puede afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control de transcripción del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

El término “expresión”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado de un ácido nucleico o polinucleótido. Expresión también puede referirse a la traducción del ARNm para dar una proteína o polipéptido.

Los términos “casete”, “casete de expresión” y “casete de expresión génica” se refieren a un segmento de ADN que puede insertarse en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios de restricción específicos o mediante recombinación homóloga. El segmento de ADN comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido de interés, y el casete y los sitios de restricción se diseñan para garantizar la inserción del casete en el marco de lectura apropiado para la transcripción y la traducción. “Casete de transformación” se refiere a un vector específico que comprende un

polinucleótido que codifica para un polipéptido de interés y que tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula huésped particular. Los casetes, casetes de expresión, casetes de expresión génica y casetes de transformación de la invención también pueden comprender elementos que permiten la expresión potenciada de un polinucleótido que codifica para un polipéptido de interés en una célula huésped.

5 Estos elementos pueden incluir, pero no se limitan a: un promotor, a promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, una secuencia terminadora, una secuencia de poliadenilación, y similares.

Para los fines de esta invención, el término "interruptor génico" se refiere a la combinación de un elemento de respuesta asociado con un promotor, y un sistema basado en EcR que en presencia de uno o más ligandos, modula la expresión de un gen en el que se incorporan el elemento de respuesta y el promotor.

10

Los términos "modulan" y "modula" significan inducir, reducir o inhibir la expresión génica o de ácido nucleico; dando como resultado la inducción, reducción o inhibición respectivas de la producción de proteínas o polipéptidos.

15 Los plásmidos o vectores según la invención pueden comprender además al menos un promotor adecuado para dirigir la expresión de un gen en una célula huésped. El término "vector de expresión" significa un vector, plásmido o vehículo diseñado para permitir la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada tras la transformación en el huésped. El gen clonado, es decir, la secuencia de ácido nucleico insertada, se coloca habitualmente bajo el control de elementos de control tales como un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, o similares. Los

20 promotores o regiones de control del inicio, que son útiles para dirigir la expresión de un ácido nucleico en la célula huésped deseada son numerosos y resultan familiares para los expertos en la técnica. Prácticamente cualquier promotor que puede dirigir estos genes es adecuado para la presente invención incluyendo, pero sin limitarse a: promotores virales, promotores bacterianos, promotores de animales, promotores de mamíferos, promotores sintéticos, promotores constitutivos, promotor específico de tejido, promotores específicos de desarrollo, promotores

25 inducibles, promotores regulados por luz; *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL4*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI*, promotores de fosfatasa alcalina (útiles para la expresión en *Saccharomyces*); promotor *AOX1* (útil para la expresión en *Pichia*); promotores de  $\beta$ -lactamasa, *lac*, *ara*, *tet*, *trp*, *IP<sub>L</sub>*, *IP<sub>R</sub>*, *T7*, *tac* y *trc* (útiles para la expresión en *Escherichia coli*); promotores regulados por luz, específicos de semillas, específicos de polen, específicos de ovario, relacionados con patogenia o enfermedad, 35S del virus del mosaico de la coliflor, mínimo 35S de CMV, del virus del mosaico de las nervaduras de mandioca (CsVMV), de la proteína de unión a

30 clorofila a/b, de ribulosa 1, 5-bisfosfato carboxilasa, específicos de brote, específicos de raíz, de quitinasa, inducibles por estrés, del virus baciliforme del tungro del arroz, super-promotor de plantas, de leucina aminopeptidasa de patata, de nitrato reductasa, de manopina sintasa, de nopalina sintasa, de ubiquitina, de proteína zeína y de antocianina (útiles para la expresión en células vegetales); los promotores de animales y mamíferos conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, la región promotora temprana del SV40 (SV40e), el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR) en 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV), de los genes E1A del promotor tardío mayor (MLP) de adenovirus (Ad), el promotor temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), un promotor IE1 de baculovirus, un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1), un promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK), un promotor de ubiquitina (Ubc), un promotor de albúmina, las

40 secuencias reguladoras del promotor de L-metalotioneína de ratón y regiones de control de la transcripción, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina,  $\alpha$ -actina, tubulina y similares), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP, y similares), los promotores de genes terapéuticos (del tipo de MDR, CFTR o factor VIII y similares), promotores relacionados con patogenia o enfermedad y promotores que muestran especificidad de tejido y que se han usando en animales transgénicos, tales como la región de control del gen de la elastasa I que es activo en células acinares pancreáticas; la región de control del gen de insulina activa en células beta pancreáticas, la región de control del gen de inmunoglobulina activa en células linfoides, la región de control del virus del cáncer de mama de ratón activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; regiones de control del gen de albúmina, Apo AI y Apo AII activas en hígado, región de control del gen de alfa-fetoproteína activa en hígado, región de control del gen de alfa-1-antitripsina activa en hígado, región de control del gen de beta-globina activa en células mieloides, región de control del gen de la proteína básica de mielina activa en oligodendrocitos en el cerebro, región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina activa en músculo esquelético y región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina activa en hipotálamo, promotor de piruvato cinasa, promotor de vilina, promotor de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos, promotor de  $\alpha$ -actina de células de

50 músculo liso y similares. Además, estas secuencias de expresión pueden modificarse mediante la adición de secuencias potenciadoras o reguladoras y similares.

55

Los potenciadores que pueden usarse en las realizaciones de la invención incluyen pero no se limitan a: un potenciador de SV40, un potenciador de citomegalovirus (CMV), un factor de elongación 1 (EF1), potenciadores de levaduras, potenciadores de genes virales, y similares.

60

Las regiones de control de la terminación, es decir, secuencias terminadoras o de poliadenilación, también pueden derivarse de diversos genes nativos para los huéspedes preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario, sin embargo, es más preferido si está incluido. En una realización preferida de la invención, la región de control de la terminación puede comprenderse o derivarse de una secuencia sintética, señal de poliadenilación sintética, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de horma de crecimiento bovino (BGH), secuencias terminadoras virales, o similares.

65

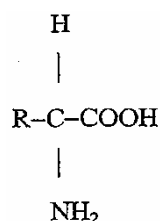
Los términos “secuencias no codificantes en 3'” o “región no traducida en 3' (UTR)” se refieren a secuencias de ADN ubicadas aguas abajo (3') de una secuencia codificante y pueden comprender secuencias de reconocimiento de poliadenilación [poli(A)] y otras secuencias que codifican para señales reguladoras que pueden afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente por afectar a la adición de trectos de poli(ácido adenílico) al extremo 3' del precursor de ARNm.

“Región reguladora” significa una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una segunda secuencia de ácido nucleico. Una región reguladora puede incluir secuencias que son responsables de manera natural de la expresión de un ácido nucleico particular (una región homóloga) o pueden incluir secuencias de un origen diferente que son responsables de la expresión de diferentes proteínas o incluso proteínas sintéticas (una región heteróloga). En particular, las secuencias pueden ser secuencias de genes de procariota, eucariota o virales o secuencias derivadas que estimulan o reprimen la transcripción de un gen de una manera específica o no específica y de una manera inducible o no inducible. Las regiones reguladoras incluyen orígenes de replicación, sitios de corte y empalme de ARN, promotores, potenciadores, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias señal que dirigen el polipéptido a las rutas secretoras de la célula diana.

Una región reguladora de una “fuente heteróloga” es una región reguladora que no está asociada de manera natural con el ácido nucleico expresado. Incluidas entre las regiones reguladoras heterólogas están regiones reguladoras de una especie diferente, regiones reguladoras de un gen diferente, secuencias reguladoras híbridas y secuencias reguladoras que no se producen en la naturaleza, pero que están diseñadas por un experto en la técnica.

“Transcrito de ARN” se refiere al producto que resulta de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina el transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada de procesamiento post-transcripcional del transcrito primario y se denomina el ARN maduro. “ARN mensajero (ARNm)” se refiere al ARN que está sin intrones y que puede traducirse en una proteína por la célula. “ADNc” se refiere a un ADN bicatenario que es complementario a y se deriva de ARNm. ARN “sentido” se refiere un transcrito de ARN que incluye el ARNm y de este modo puede traducirse en una proteína por la célula. “ARN antisentido” se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un transcrito primario o ARNm diana y que bloquea la expresión de un gen diana. La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia no codificante en 5', secuencia no codificante en 3' o la secuencia codificante. “ARN funcional” se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozimas u otro ARN que no se traduce y aún tiene un efecto en procesos celulares.

Un “polipéptido” es un compuesto polimérico compuesto de residuos de aminoácidos unidos covalentemente. Los aminoácidos tienen la siguiente estructura general:



Los aminoácidos se clasifican en siete grupos basándose en la cadena lateral R: (1) cadenas laterales alifáticas, (2) cadenas laterales que contienen un grupo hidroxílico (OH), (3) cadenas laterales que contienen átomos de azufre, (4) cadenas laterales que contienen un grupo ácido o amida, (5) cadenas laterales que contienen un grupo básico, (6) cadenas laterales que contienen un anillo aromático y (7) prolina, un iminoácido en el que la cadena lateral está fusionada al grupo amino. Un polipéptido de la invención comprende preferiblemente al menos aproximadamente 14 aminoácidos.

Una “proteína” es un polipéptido que realiza un papel estructural o funcional en una célula viva.

Un “polipéptido aislado” o “proteína aislada” es un polipéptido o proteína que está sustancialmente libre de los compuestos que están asociados normalmente con ellos en su estado natural (por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos). “Aislado” no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos, ni la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad biológica, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a purificación incompleta, adición de estabilizadores o composición dando lugar a una preparación farmacéuticamente aceptable.

Un “polipéptido mutante de sustitución” o un “mutante de sustitución” se entenderá que significa un polipéptido mutante que comprende una sustitución de al menos un (1) aminoácido de tipo natural o que se produce de manera natural con un aminoácido diferente con respecto al polipéptido de tipo natural o que se produce de manera natural.

Un polipéptido mutante de sustitución puede comprender sólo una (1) sustitución de aminoácido de tipo natural o que se produce de manera natural y puede denominarse un polipéptido “mutante puntual” o “mutante puntual individual”. Alternativamente, un polipéptido mutante de sustitución puede comprender una sustitución de dos (2) o más aminoácidos de tipo natural o que se producen de manera natural con 2 o más aminoácidos con respecto al polipéptido de tipo natural o que se produce de manera natural. Según la invención, un polipéptido del dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H que comprende una mutación de sustitución comprende una sustitución de al menos un (1) aminoácido de tipo natural o que se produce de manera natural con un aminoácido diferente con respecto al polipéptido del dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H de tipo natural o que se produce de manera natural.

En el caso en el que el polipéptido mutante de sustitución comprenda una sustitución de dos (2) o más aminoácidos de tipo natural o que se producen de manera natural, esta sustitución puede comprender o bien un número equivalente de aminoácidos de tipo natural o que se producen de manera natural deletados para la sustitución, es decir, 2 aminoácidos de tipo natural o que se producen de manera natural sustituidos por 2 aminoácidos de tipo no natural o que se no producen de manera natural, o un número no equivalente de aminoácidos de tipo natural deletados para la sustitución, es decir, 2 aminoácidos de tipo natural sustituidos por 1 aminoácido de tipo no natural (una mutación de sustitución + delección), o 2 aminoácidos de tipo natural sustituidos por 3 aminoácidos de tipo no natural (una mutación de sustitución + inserción).

Los mutantes de sustitución pueden describirse usando un sistema de nomenclatura abreviada para indicar el número y residuo de aminoácido sustituido dentro de la secuencia de polipéptido de referencia y el nuevo residuo de aminoácido sustituido. Por ejemplo, un mutante de sustitución en el que el vigésimo (20<sup>o</sup>) residuo de aminoácido de un polipéptido está sustituido puede abreviarse como “x20z”, en el que “x” es el aminoácido que está sustituido, “20” es la posición o el número de residuo de aminoácido dentro del polipéptido y “z” es el nuevo aminoácido sustituido. Por tanto, un mutante de sustitución abreviado de manera intercambiable como “E20A” o “Glu20Ala” indica que el mutante comprende un residuo alanina (abreviado comúnmente en la técnica como “A” o “Ala”) en lugar del ácido glutámico (abreviado comúnmente en la técnica como “E” o “Glu”) en la posición 20 del polipéptido.

Una mutación de sustitución puede realizarse mediante cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson, C., *et al.*, 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551; Zoller y Smith, 1984, DNA 3: 479-488; Oliphant *et al.*, 1986, Gene 44: 177; Hutchinson *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 710), uso de ligadores TAB<sup>®</sup> (Pharmacia), delección y sustitución de fragmento/digestión con endonucleasa de restricción, mutagénesis mediada por PCR/dirigida por oligonucleótido, y similares. Se prefieren las técnicas basadas en PCR para la mutagénesis dirigida al sitio (véase Higuchi, 1989, “Using PCR to Engineer DNA”, en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, capítulo 6, pág. 61-70).

“Fragmento” de un polipéptido según la invención se entenderá que significa un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es más corta que la del polipéptido de referencia y que comprende, con respecto a la parte completa con estos polipéptidos de referencia, una secuencia de aminoácidos idéntica. Tales fragmentos pueden incluirse, cuando sea apropiado, en un polipéptido más grande del que forman parte. Tales fragmentos de un polipéptido según la invención pueden tener una longitud de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 240 ó 300 aminoácidos.

Una “variante” de un polipéptido o proteína es cualquier análogo, fragmento, derivado o mutante que se deriva de un polipéptido o proteína y que conserva al menos una propiedad biológica del polipéptido o proteína. En la naturaleza pueden existir diferentes variantes del polipéptido o proteína. Estas variantes pueden ser variaciones alélicas caracterizadas por diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen estructural que codifica para la proteína, o puede implicar una modificación postraduccional o de corte y empalme diferencial. El experto en la técnica puede producir variantes que tienen sustituciones, delecciones, adiciones o remplazos de aminoácido individuales o múltiples. Estas variantes pueden incluir, entre otras: (a) variantes en que uno o más residuos de aminoácido están sustituidos con aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en que se añaden uno o más aminoácidos al polipéptido o proteína, (c) variantes en que uno o más de los aminoácidos incluyen un grupo sustituyente y (d) variantes en que el polipéptido o proteína está fusionado con otro polipéptido tal como albúmina sérica. El experto habitual en la técnica conoce las técnicas para obtener estas variantes, incluyendo técnicas genéticas (supresiones, delecciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas. Un polipéptido variante comprende preferiblemente al menos aproximadamente 14 aminoácidos.

Una “proteína heteróloga” se refiere a una proteína que no se produce de manera natural en la célula.

Una “proteína madura” se refiere a un polipéptido que se procesa postraduccionalmente; es decir, uno del que se ha eliminado cualquier pre o propéptido presente en el producto de traducción primario. Proteína “precursora” se refiere al producto primario de traducción del ARNm; es decir, con pre y propéptidos todavía presentes. Los pre y propéptidos pueden ser, pero no se limitan a señales de localización intracelulares.

El término “péptido señal” se refiere a un polipéptido amino terminal que precede a la proteína madura secretada. El

péptido señal se escinde de y por tanto no está presente en la proteína madura. Los péptidos señal tiene la función de dirigir y traslocar proteínas secretadas a través de las membranas celulares. El péptido señal también se denomina proteína señal.

5 Una "secuencia señal" está incluida al comienzo de la secuencia codificante de una proteína que va a expresarse en la superficie de una célula. Esta secuencia codifica para un péptido señal, en el extremo N-terminal con respecto al polipéptido maduro, que dirige la célula huésped para traslocar el polipéptido. El término "secuencia señal de traslocación" se usa en el presente documento para referirse a este tipo de secuencia señal. Las secuencias señal de traslocación pueden encontrarse asociadas con una variedad de proteínas nativas a eucariotas y procariotas, y a menudo son funcionales en ambos tipos de organismos.

15 El término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre restos de dos polinucleótidos o dos polipéptidos. La correspondencia entre la secuencia de un resto a otro puede determinarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse la homología mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas de polipéptido alineando la información de secuencia y usando programas informáticos fácilmente disponibles. Alternativamente, puede determinarse la homología mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forma dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s) y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "homólogo" en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la relación entre proteínas que presentan un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de inmunoglobulinas) y proteínas homólogas de diferentes especies (por ejemplo, cadena ligera de miosina, etc.) (Reeck *et al.*, 1987, Cell 50:667.). Tales proteínas (y sus genes codificantes) tienen homología de secuencia, tal como se refleja por su alto grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo," cuando está modificado con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a similitud de secuencia y no a un origen evolutivo común.

30 Por consiguiente, el término "similitud de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de proteínas que pueden compartir o no un origen evolutivo común (véase Reeck *et al.*, 1987, Cell 50: 667).

35 En una realización específica, dos secuencia de ADN son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente el 50% (preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o el 95%) de los nucleótidos coincide a lo largo de la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando software convencional disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de tipo Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas definidas para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, citado anteriormente.

40 Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente similar" se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que cambios en una o más bases nucleotídicas dan como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afecta a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. "Sustancialmente similar" también se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la alteración de la expresión génica mediante tecnología antisentido o cosupresión. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención tal como delección o inserción de una o más bases nucleotídicas que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito resultante. Por tanto, se entiende que la invención abarca más que las secuencias a modo de ejemplo específicas. Cada una de las modificaciones propuestas está completamente dentro del conocimiento de rutina en la técnica, como es la determinación de la retención de la actividad biológica de los productos codificados.

50 Además, el experto en la técnica reconoce que las secuencias sustancialmente similares abarcadas por esta invención también se definen por su capacidad para hibridarse, en condiciones rigurosas (0,1X SSC, SDS al 0,1%, 65°C y lavado con 2X SSC, SDS al 0,1% seguido por 0,1X SSC, SDS al 0,1%), con las secuencias a modo de ejemplo en el presente documento. Los fragmentos de ácido nucleico sustancialmente similares de la presente invención son los fragmentos de ácido nucleico cuyas secuencias de ADN son idénticas al menos en el 70% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico notificados en el presente documento. Los fragmentos de ácido nucleico sustancialmente preferidos de la presente invención son los fragmentos de ácido nucleico cuyas secuencias de ADN son idénticas al menos en el 80% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico notificados en el presente documento. Fragmentos de ácido nucleico más preferidos son idénticos al menos en el 90% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico notificados en el presente documento. Incluso más preferidos son fragmentos de ácido nucleico que son idénticos al menos en el 95% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico notificados en el presente documento.

65 Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de

aproximadamente el 40% de los aminoácidos son idénticos, o más del 60% son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineación usando, por ejemplo, el programa Pileup de GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, versión 7, Madison, Wisconsin).

5 El término “se corresponde con” se usa en el presente documento para referirse a secuencias similares u homólogas, ya sea la posición exacta idéntica o diferente de la molécula de la que se mide la similitud u homología. Una alineación de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico puede incluir espacios. Por tanto, el término “se  
10 corresponde con” se refiere a la similitud de secuencia y no a la numeración de los residuos de aminoácido o bases nucleotídicas.

Una “parte sustancial” de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos comprende suficiente cantidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o la secuencia de nucleótidos de un gen para identificar supuestamente ese polipéptido o gen, o bien mediante evaluación manual de la secuencia por un experto en la técnica, o bien  
15 mediante comparación e identificación de secuencia automatizadas por ordenador usando algoritmos tales como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., *et al.*, (1993) J. Mol. Biol. 215: 403-410; véase también [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). En general, se necesita una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos con el fin de identificar supuestamente una secuencia de polipéptido o ácido nucleico como  
20 homóloga a una proteína o gen conocidos. Además, con respecto a las secuencias de nucleótidos, pueden usarse sondas de oligonucleótido específicas de genes que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos en métodos de identificación de genes dependientes de secuencia (por ejemplo, hibridación de tipo Southern) y aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófago). Además, pueden usarse oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en PCR con el fin de obtener un fragmento de ácido nucleico particular que comprende los cebadores. Por consiguiente, una “parte sustancial” de una  
25 secuencia de nucleótido comprende suficiente cantidad de la secuencia para identificar específicamente y/o aislar un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia.

El término “porcentaje de identidad”, tal como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, tal como se determina comparando las secuencias. En la  
30 técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según el caso, tal como se determina mediante la coincidencia entre sucesiones de tales secuencias. “Identidad” y “similitud” pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a los descritos en: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, Nueva York (1993);  
35 Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.) Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.) Stockton Press, Nueva York (1991). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mejor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles  
40 públicamente. Las alineaciones de secuencia y cálculos del porcentaje de identidad pueden realizarse usando el programa Megalign del conjunto de computación bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Puede realizarse la alineación múltiple de las secuencias usando el método Clustal de alineación (Higgins y Sharp (1989) CABIOS. 5:151-153) con los parámetros por defecto (PENALIZACIÓN POR HUECO=10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECO=10). Pueden seleccionarse los parámetros por defecto para alineaciones en parejas usando el método Clustal: KTUPLE 1, PENALIZACIÓN POR HUECO=3, VENTANA=5 y DIAGONALES GUARDADAS=5.  
45

El término “software de análisis de secuencia” se refiere a cualquier programa de software o algoritmo informático que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El “software de análisis de secuencia” puede estar disponible comercialmente o puede desarrollarse independientemente. El software de análisis de  
50 secuencia típico incluirá pero no se limitará al conjunto de programas de GCG (Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) y DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 EE.UU). Dentro del contexto de esta solicitud se entenderá que cuando se usa software de análisis de secuencia para el análisis, los resultados del análisis se basarán en los “valores por defecto” del programa de referencia, a menos que se especifique lo contrario.  
55 Tal como se usa en el presente documento “valores por defecto” significará cualquier conjunto de valores o parámetros que originalmente se cargan con el software cuando se inicia por primera vez.

Los “genes sintéticos” pueden ensamblarse a partir de elementos estructurales de oligonucleótidos que se sintetizan químicamente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos elementos estructurales se  
60 ligan y se aparean para formar segmentos de genes que entonces se ensamblan enzimáticamente para construir el gen completo. “Sintetizado químicamente”, en lo que se refiere a una secuencia de ADN, significa que los nucleótidos componentes se ensamblaron *in vitro*. La síntesis química manual de ADN puede llevarse a cabo usando procedimientos bien establecidos, o puede realizarse la síntesis química automatizada usando una de varias de máquinas disponibles comercialmente. Por consiguiente, los genes pueden adaptarse para la expresión génica  
65 óptima basándose en la optimización de la secuencia de nucleótidos para reflejar el desplazamiento del codón de la célula huésped. El experto en la técnica aprecia la posibilidad de expresión génica satisfactoria si el uso del codón



se desplaza hacia los codones favorecidos por el huésped. La determinación de codones preferidos puede basarse en una supervivencia de genes derivados de la célula huésped en la que está disponible la información de secuencia.

5 Tal como se usa en el presente documento, se dice que dos o más sistemas de regulación génica operables individualmente son "ortogonales" cuando; a) la modulación de cada uno de los sistemas dados por su ligando respectivo, a una concentración elegida, da como resultado un cambio medible en la magnitud de expresión del gen de ese sistema, y b) el cambio es diferente de manera estadísticamente significativa del cambio en la expresión del resto de los sistemas operables simultáneamente en la célula, tejido u organismo, independientemente de la  
10 simultaneidad o secuencialidad de la modulación real. Preferiblemente, la modulación de cada sistema de regulación génica operable individualmente efectúa un cambio en la expresión génica al menos 2 veces mayor que el resto de los sistemas operables en la célula, tejido u organismo. Más preferiblemente, el cambio es al menos 5 veces mayor. Incluso más preferiblemente, el cambio es al menos 10 veces mayor. Todavía más preferiblemente, el cambio es al menos 100 veces mayor. Incluso todavía más preferiblemente, el cambio es al menos 500 veces mayor. Idealmente,  
15 la modulación de cada uno de los sistemas dados por su ligando respectivo a una concentración elegida da como resultado un cambio medible en la magnitud de expresión del gen de ese sistema y ningún cambio medible en la expresión del resto de los sistemas operables en la célula, tejido u organismo. En tales casos se dice que los múltiples sistemas de regulación génica inducibles son "completamente ortogonales". La presente invención es útil para buscar ligandos ortogonales y sistemas de expresión génica basados en receptores ortogonales tales como los descritos en la solicitud estadounidense de patente en tramitación junto con la presente 09/965.697, que se  
20 incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

El término "modular" significa la capacidad de un complejo ligando/receptor dado para inducir o suprimir la transactivación de un gen exógeno.

25 El término "gen exógeno" significa un gen foráneo para el sujeto, es decir, un gen que se introduce en el sujeto a través de un procedimiento de transformación, una versión no mutada de un gen mutado endógeno o una versión mutada de un gen no mutado endógeno. El método de transformación no es crítico para esta invención y puede ser cualquier método adecuado para el objeto conocido en la técnica. Por ejemplo, se obtienen plantas transgénicas mediante regeneración de las células transformadas. A partir de la bibliografía se conocen numerosos procedimientos de transformación tales como agroinfección usando *Agrobacterium tumefaciens* o su plásmido T<sub>1</sub>,  
30 electroporación, microinyección de protoplastos y células vegetales, y transformación mediante microproyectiles. Se conocen técnicas complementarias para la transformación de células animales y la regeneración de tales células transformadas en animales transgénicos. Los genes exógenos pueden ser genes o bien naturales o bien sintéticos y genes terapéuticos que se introducen en el sujeto en forma de ADN o ARN que pueden funcionar a través de un producto intermedio de ADN tal como mediante transcriptasa inversa. Tales genes pueden introducirse en células diana, introducirse directamente en el sujeto o introducirse indirectamente mediante la transferencia de células transformadas en el sujeto. El término "gen terapéutico" significa un gen que confiere una función beneficiosa a la célula huésped en la que se expresa tal gen. Los genes terapéuticos no se encuentran de manera natural en células  
40 huésped.

El término "complejo de receptor de ecdisona" se refiere en general a un complejo de proteína heterodimérico que consiste en dos miembros de la familia de receptores de esteroides, receptor de ecdisona ("EcR") y proteínas ultraespiráculo ("USP") (véase Yao, T.P., *et. al.* (1993) *Nature* 366, 476-479; Yao, T.-P., *et. al.*, (1992) *Cell* 71, 63-  
45 72). El complejo de receptor ecdiesteroide funcional también puede incluir proteína(s) adicional(es) tal(es) como inmunofilinas. Los miembros adicionales de la familia de receptores de esteroides de proteínas, conocidos como factores de transcripción (tal como DHR38, *betaFTZ-1* u otros homólogos de insecto), también pueden ser parejas dependientes o independientes de ligando para EcR y/o USP. El complejo de receptor de ecdisona también puede ser un heterodímero de la proteína de receptor de ecdisona y el homólogo de vertebrados de proteína ultraespiráculo, proteína de receptor X de ácido retinoico ("RXR"). Los complejos homodiméricos de la proteína de receptor de ecdisona o USP también pueden ser funcionales en algunas circunstancias.

Un complejo de receptor ecdiesteroide puede activarse mediante un ecdiesteroide o ligando no esteroideo activo unido a una de las proteínas del complejo, incluso de EcR, pero sin excluir otras proteínas del complejo.

55 El complejo de receptor de ecdisona incluye proteínas que son miembros de la superfamilia de receptores esteroides en el que todos los miembros se caracterizan por la presencia de un dominio de transactivación amino-terminal, un dominio de unión a ADN ("DBD") y un dominio de unión a ligando ("LBD") separados por una región bisagra. Algunos miembros de la familia también pueden tener otro dominio de transactivación en el lado carboxilo-terminal del LBD. El DBD se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc-cisteína entre los que hay dos motivos de aminoácido, la caja P y la caja D, que confieren especificidad para elementos de respuesta a ecdisona. Estos dominios pueden ser o bien nativos o bien modificados o bien quimeras de diferentes dominios de proteínas de receptor heterólogos.

65 Las secuencias de ADN que componen el gen exógeno, el elemento de respuesta y el complejo de receptor de ecdisona pueden incorporarse en archaeobacterias, células procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* u

5 otras enterobacterias, o células eucariotas tales como células vegetales o animales. Sin embargo, debido a que muchas de las proteínas expresadas por el gen se procesan incorrectamente en bacterias, se prefieren las células eucariotas. Las células pueden estar en forma de células individuales u organismos multicelulares. Las secuencias de nucleótidos para el gen exógeno, el elemento de respuesta y el complejo de receptor también pueden  
 10 incorporarse como moléculas de ARN, preferiblemente en forma de ARN virales funcionales tales como el virus del mosaico de tabaco. De la células eucariotas, se prefieren las células de vertebrados debido a que carecen de manera natural de las moléculas que confieren respuestas a los ligandos de esta invención para el receptor de ecdisona. Como resultado, son insensibles a los ligandos de esta invención. Por tanto, los ligandos de esta invención tendrán efectos fisiológicos u otros efectos desdeñables sobre las células transformadas o el organismo  
 15 completo. Por tanto, las células pueden crecer y expresar el producto deseado, sustancialmente sin verse afectadas por la presencia del propio ligando.

El término "sujeto" significa una planta o un animal intactos o una célula de una planta o un animal. También se prevé que los ligandos funcionarán igualmente bien cuando el sujeto es un hongo o una levadura. Cuando el sujeto  
 20 es un animal intacto, preferiblemente el animal es un vertebrado, lo más preferiblemente un mamífero.

Los ligandos de la presente invención, cuando se usan con el complejo de receptor de ecdisona que a su vez está unido al elemento de respuesta unido a un gen exógeno, proporcionan los medios para la regulación temporal externa de la expresión del gen exógeno. El orden en el que los diversos componentes se unen entre sí, es decir,  
 25 ligando a complejo de receptor y complejo de receptor a elemento de respuesta, no es crítico. Normalmente, la modulación de la expresión del gen exógeno es en respuesta a la unión del complejo de receptor de ecdisona a un elemento de ADN de control o regulador específico. La proteína de receptor de ecdisona, al igual que otros miembros de la familia de receptores de esteroides, presenta al menos tres dominios, un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN y un dominio de unión a ligando. Este receptor, al igual que un subconjunto de la familia  
 30 de receptores de esteroides, también presenta menos regiones bien definidas responsables de las propiedades de heterodimerización. La unión del ligando al dominio de unión a ligando de la proteína de receptor de ecdisona, tras la heterodimerización con la proteína USP o RXR, permite que los dominios de unión a ADN de las proteínas heterodiméricas se unan al elemento de respuesta en forma activada, dando como resultado por tanto la expresión o supresión del gen exógeno. Este mecanismo no excluye la posibilidad de unión del ligando a o bien EcR o bien USP,  
 35 y la formación resultante de complejos homodiméricos activos (por ejemplo EcR+EcR o USP+USP). Preferiblemente, uno o más de los dominios de receptor pueden variarse produciendo un cambio de gen quimérico. Normalmente, pueden elegirse uno o más de los tres dominios de una fuente diferente de la fuente de los otros dominios, de modo que el receptor quimérico se optimiza en la célula u organismo huésped elegido para la actividad de transactivación, unión complementaria del ligando y reconocimiento de un elemento de respuesta específico.  
 40 Además, el propio elemento de respuesta puede estar modificado o sustituido con elementos de respuesta para otros dominios de proteína de unión a ADN tales como la proteína GAL-4 de levadura (véase Sadowski, *et. al.* (1988) *Nature*, 335, 563-564) o la proteína LexA de *E. coli* (véase Brent y Ptashne (1985), *Cell*, 43, 729-736) para acomodar complejos de receptor de ecdisona quiméricos. Otra ventaja de los sistemas quiméricos es que permiten la elección de un promotor usado para dirigir el gen exógeno según un resultado final deseado. Un doble control de este tipo puede ser particularmente importante en áreas de terapia génica, especialmente cuando se producen  
 45 proteínas citotóxicas, debido a que puede controlarse tanto el tiempo de expresión así como las células en las que se produce la expresión. El término "promotor" significa una secuencia de nucleótidos específica reconocida por ARN polimerasa. La secuencia es el sitio en el que puede iniciarse específicamente la transcripción en condiciones apropiadas. Cuando genes exógenos, unidos operativamente a un promotor adecuado, se introducen en las células del sujeto, la expresión de los genes exógenos está controlada por la presencia del ligando de esta invención. Los promotores pueden regularse de manera constitutiva o inducible o pueden ser específicos de tejido (es decir, expresados sólo en un tipo particular de célula) o específicos de determinadas etapas de desarrollo del organismo.

Otro aspecto de esta invención es un método para modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto,  
 50 que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz, es decir, la cantidad requerida para provocar la expresión o supresión génica deseada, de un ligando que comprende un compuesto de la presente invención y en el que las células del sujeto contienen:

a) un complejo de receptor de ecdisona que comprende:

- 55 1) un dominio de unión a ADN,  
 2) un dominio de unión para el ligando, y  
 60 3) un dominio de transactivación; y

b) un constructo de ADN que comprende:

- 65 1) el gen exógeno, y  
 2) un elemento de respuesta;

en el que el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta en presencia del ligando da como resultado la activación o supresión del gen.

5 Un aspecto relacionado de esta invención es un método para regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico que comprende poner en contacto un ligando que comprende un compuesto de la presente invención con un receptor de ecdisona dentro de las células del sujeto en el que las células contienen una secuencia de unión a ADN para el receptor de ecdisona y en el que la formación de un complejo de receptor de ecdisona-ligando-secuencia de unión a ADN induce la expresión del gen.

10 Un cuarto aspecto de la presente invención es un método para producir un polipéptido que comprende las etapas de:

15 a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a un ligando que comprende un compuesto de la presente invención;

b) introducir en la célula:

20 1) un constructo de ADN que comprende:

i) un gen exógeno que codifica para el polipéptido; y

ii) un elemento de respuesta;

25 en el que el gen está bajo el control del elemento de respuesta; y

2) un complejo de receptor de ecdisona que comprende:

30 i) un dominio de unión a ADN;

ii) un dominio de unión para el ligando; y

iii) un dominio de transactivación; y

35 c) exponer la célula al ligando.

Además de la ventaja de controlar temporalmente la producción de polipéptidos por la célula, este aspecto de la invención proporciona una ventaja adicional, en los casos en que la acumulación de un polipéptido de este tipo puede dañar la célula, porque la expresión del polipéptido puede limitarse a periodos cortos. Tal control es particularmente importante cuando el gen exógeno es un gen terapéutico. Puede recurrirse a genes terapéuticos para producir polipéptidos que controlan funciones necesarias, tales como la producción de insulina en pacientes diabéticos. También pueden usarse para producir proteínas dañinas o incluso letales, tales como las letales para células cancerosas. Tal control también puede ser importante cuando los niveles de proteínas producidos pueden constituir un desgaste metabólico sobre el crecimiento o la reproducción, tal como en plantas transgénicas.

45 En la técnica se conocen bien numerosas secuencias de ácidos nucleicos de ADNc y genómicas que codifican para una variedad de polipéptidos. El material genético exógeno útil con los ligandos de esta invención incluye genes que codifican para proteínas de interés biológicamente activas, tales como, por ejemplo, proteínas secretoras que pueden liberarse de una célula; enzimas que pueden metabolizar un sustrato de una sustancia tóxica a una sustancia no tóxica, o de una sustancia inactiva a una sustancia activa; proteínas reguladoras; receptores de superficie celular; y similares. Los genes útiles también incluyen genes que codifican factores de coagulación sanguíneos, hormonas tales como insulina, hormona paratiroidea, factor liberador de hormona luteinizante, inhibinas seminales alfa y beta y hormona de crecimiento humana; genes que codifican para proteínas tales como enzimas, cuya ausencia conduce a la aparición de un estado anómalo; genes que codifican citocinas o linfocinas tales como interferones, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos, factor estimulante de colonias 1, factor de necrosis tumoral y eritropoyetina; genes que codifican para sustancias inhibitorias tales como alfa<sub>1</sub>-antitripsina, genes que codifican para sustancias que funcionan como fármacos tales como toxinas diftérica y colérica; y similares. Los genes útiles también incluyen los útiles para terapias contra el cáncer y para tratar trastornos genéticos. Los expertos en la técnica tienen acceso a información de secuencias de ácidos nucleicos para prácticamente todos los genes conocidos y o bien pueden obtener la molécula de ácido nucleico directamente de un depósito público, la institución que publicó la secuencia, o bien pueden emplear métodos de rutina para preparar la molécula.

65 Para su uso en terapia génica, los ligandos descritos en el presente documento pueden llevarse en portadores farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, pomadas, elixires y composiciones inyectables. Las preparaciones farmacéuticas pueden contener desde el 0,01%

hasta el 99% en peso del ligando. Las preparaciones pueden estar en forma de dosis o bien individual o bien múltiple. La cantidad de ligando en cualquier preparación farmacéutica particular dependerá de la dosis eficaz, es decir, la dosis requerida para provocar la expresión o supresión génica deseada.

5 Las vías de administración adecuadas de las preparaciones farmacéuticas incluyen oral, rectal, tópica (incluyendo dérmica, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) y mediante sonda nasogástrica. Los expertos en la técnica entenderán que la vía de administración preferida dependerá del estado que va a tratarse y puede variar con factores tales como el estado del receptor.

10 Los ligandos descritos en el presente documento también pueden administrarse conjuntamente con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los expertos en la técnica entenderán que los compuestos farmacéuticamente activos que van a usarse en combinación con los ligandos descritos en el presente documento se seleccionarán con el fin de evitar efectos adversos en el receptor o interacciones indeseables entre los compuestos. Los ejemplos de otros compuestos farmacéuticamente activos que pueden usarse en combinación con los ligandos incluyen, por ejemplo, agentes quimioterápicos contra el SIDA, derivados de aminoácidos, analgésicos, anestésicos, productos anorrectales, antiácidos y antiflatulentos, antibióticos, anticoagulantes, antidotos, agentes antifibrinolíticos, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, antineoplásicos, antiparasitarios, antiprotozoarios, antipiréticos, antisépticos, antiespasmódicos y anticolinérgicos, antivirales, supresores del apetito, medicamentos para la artritis, modificadores de la respuesta biológica, reguladores del metabolismo óseo, purgantes del intestino, agentes cardiovasculares, estimulantes del sistema nervioso central, potenciadores metabólicos cerebrales, cerumenolíticos, inhibidores de la colinesterasa, preparaciones para los resfriados y la tos, factores estimulantes de colonias, anticonceptivos, agentes citoprotectores, preparaciones dentales, desodorantes, productos dermatológicos, agentes detoxificantes, agentes para la diabetes, agentes de diagnóstico, medicamentos contra la diarrea, agonistas del receptor de dopamina, electrolitos, enzimas y productos digestivos, preparaciones ergóticas, agentes para la fertilidad, complementos de fibra, agentes antifúngicos, inhibidores de la galactorrea, inhibidores de la secreción de ácido gástrico, agentes procinéticos gastrointestinales; inhibidores de gonadotropina, estimulantes del crecimiento del pelo, hematínicos, agentes hemorreológicos, hemostáticos, antagonistas del receptor de histamina H<sub>2</sub>, hormonas, agentes hiperglucémicos, hipolipemiantes, inmunosupresores, laxantes, leprostáticos, adyuvantes de leucaféresis, tensioactivos pulmonares, preparaciones contra la migraña, mucolíticos, antagonistas de relajantes musculares, relajantes musculares, antagonistas de narcóticos, pulverizaciones nasales, análogos de nucleósidos para medicamentos contra las náuseas, complementos nutricionales, preparaciones contra la osteoporosis, oxióticos, parasimpaticolíticos, parasimpaticomiméticos, fármacos para el parkinsonismo, adyuvantes de penicilina, fosfolípidos, inhibidores de plaquetas, agentes contra la porfiria, análogos de prostaglandinas, prostaglandinas, inhibidores de la bomba de protones, medicamentos para el prurito, psicofármacos, quinolonas, estimulantes respiratorios, estimulantes de la saliva, sustitutos de sal, agentes esclerosantes, preparaciones para heridas cutáneas, ayudas para dejar de fumar, sulfonamidas, simpaticolíticos, trombolíticos, agentes contra el síndrome de Tourett, preparaciones contra temblores, preparaciones contra la tuberculosis, agentes uricosúricos, agentes de las vías urinarias, contractores del útero, relajantes del útero, preparaciones vaginales, agentes antivertiginosos, análogos de vitamina D, vitaminas y medios de contraste para la obtención de imágenes médicas. En algunos casos los ligandos pueden ser útiles como adyuvantes para la terapia farmacológica, por ejemplo, para "apagar" un gen que produce una enzima que metaboliza un fármaco particular.

45 Para las aplicaciones de agricultura, además de las aplicaciones descritas anteriormente, los ligandos de esta invención también pueden usarse para controlar la expresión de proteínas pesticidas tales como la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tal expresión puede ser específica de tejido o de planta. Además, particularmente cuando también se necesite el control de plagas en plantas, pueden combinarse uno o más pesticidas con los ligandos descritos en el presente documento, proporcionando así ventajas y eficacia adicionales, incluyendo menos aplicaciones totales, que si se aplicaran los pesticidas por separado. Cuando se emplean mezclas con pesticidas, las proporciones relativas de cada componente en la composición dependerán de la eficacia relativa y de la tasa de aplicación deseada de cada pesticida con respecto a las cosechas, plagas y/o malas hierbas que van a tratarse. Los expertos en la técnica reconocerán que las mezclas de pesticidas pueden proporcionar ventajas tales como un espectro de actividad más amplio que un pesticida usado sólo. Los ejemplos de pesticidas que pueden combinarse en composiciones con los ligandos descritos en el presente documento incluyen fungicidas, herbicidas, insecticidas, miticidas y microbicidas.

60 Los ligandos descritos en el presente documento pueden aplicarse al follaje de una planta como pulverizaciones acuosas mediante métodos empleados comúnmente, tales como pulverizaciones hidráulicas convencionales de gran volumen, pulverizaciones de bajo volumen, pulverizaciones de choro de aire y aéreas. La dilución y la tasa de aplicación dependerán del tipo de equipo empleado, del método y de la frecuencia de aplicación deseados, y de la tasa de aplicación del ligando. Puede ser deseable incluir adyuvantes adicionales en el tanque de pulverización. Tales adyuvantes incluyen tensioactivos, dispersantes, propagantes, adhesivos, agentes antiespumantes, emulsionantes y otros materiales similares descritos en *McCutcheon's Emulsifiers and Detergents*, *McCutcheon's Emulsifiers and Detergents/Functional Materials*, y *McCutcheon's Functional Materials*, todos publicados anualmente por McCutcheon Division de MC Publishing Company (Nueva Jersey). Los ligandos también pueden mezclarse con fertilizantes o materiales fertilizantes antes de su aplicación. Los ligandos y el material fertilizante sólido también

puede mezclarse en un equipo de mezclado o combinado, o pueden incorporarse con fertilizantes en formulaciones granulares. Puede usarse cualquier proporción relativa de fertilizante que sea adecuada para las cosechas y malas hierbas que van a tratarse. Los ligandos descritos en el presente documento comprenderán comúnmente desde el 5% hasta el 50% de la composición fertilizante. Estas composiciones proporcionan materiales fertilizantes que promueven el crecimiento rápido de las plantas deseadas, y al mismo tiempo controlan la expresión génica.

#### CÉLULAS HUÉSPED Y ORGANISMOS NO HUMANOS DE LA INVENCION

Tal como se describió anteriormente, los ligandos para modular el sistema de expresión génica de la presente invención pueden usarse para modular la expresión génica en una célula huésped. La expresión en células huésped transgénicas puede ser útil para la expresión de diversos genes de interés. La presente invención proporciona ligandos para la modulación de la expresión génica en células huésped procariontas y eucariotas. La expresión en células huésped transgénicas es útil para la expresión de diversos polipéptidos de interés incluyendo pero sin limitarse a antígenos producidos en plantas como vacunas, enzimas como alfa-amilasa, fitasa, glucanos y xilanas, genes para la resistencia frente a insectos, nematodos, hongos, bacterias, virus y estrés abiótico, antígenos, productos nutracéuticos, productos farmacéuticos, vitaminas, genes para modificar el contenido en aminoácidos, resistencia a herbicidas, tolerancia al frío, las sequías y el calor, productos industriales, aceites, proteínas, hidratos de carbono, antioxidantes, plantas macho estériles, flores, combustibles, otras características de producción, polipéptidos terapéuticos, productos intermedios de rutas; para la modulación de rutas ya existentes en el huésped para la síntesis de nuevos productos hasta ahora imposibles usando el huésped; ensayos basados en células; ensayos genómicos funcionales, producción de proteínas bioterapéuticas, ensayos proteómicos, y similares. Adicionalmente, los productos génicos pueden ser útiles para conferir rendimientos de crecimiento superiores del huésped o para permitir que se utilice un modo de crecimiento alternativo.

Por tanto, la presente invención proporciona ligandos para modular la expresión génica en una célula huésped aislada según la invención. La célula huésped puede ser una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de nematodo, una célula de insecto, una célula de pez, una célula vegetal, una célula de ave, una célula animal o una célula de mamífero. Todavía en otra realización, la invención se refiere a ligandos para modular la expresión génica en una célula huésped, en los que el método comprende cultivar la célula huésped tal como se describió anteriormente en medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión de un polinucleótido que codifica para el dominio de unión a ligando de receptores nucleares que comprende una mutación de sustitución, y aislar el dominio de unión a ligando de receptores nucleares que comprende una mutación de sustitución del cultivo.

En una realización específica, la célula huésped aislada es una célula huésped procarionta o una célula huésped eucariota. En otra realización específica, la célula huésped aislada es una célula huésped de invertebrados o un célula huésped de vertebrados. Preferiblemente, la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de nematodo, una célula de insecto, una célula de pez, una célula vegetal, una célula de ave, una célula animal y una célula de mamífero. Más preferiblemente, la célula huésped es una célula de levadura, una célula de nematodo, una célula de insecto, una célula vegetal, una célula de pez cebra, una célula de pollo, una célula de hámster, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de conejo, una célula de gato, una célula de perro, una célula de animal bovino, una célula de cabra, una célula de vaca, una célula de cerdo, una célula de caballo, una célula de oveja, una célula de simio, una célula de mono, una célula de chimpancé o una célula de ser humano. Los ejemplos de células huésped preferidas incluyen, pero no se limitan a, células huésped de especies de hongos o levadura tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, o especies bacterianas tales como las de los géneros *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Metilomonas*, *Metilobacter*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Tiobacillus*, *Metanobacterium* y *Klebsiella*; de especies vegetales seleccionadas del grupo que consiste en manzana, *Arabidopsis*, mijo perla, plátano, cebada, alubias, remolacha, lenteja negra, garbanzo, chile, pepino, berenjena, habas, maíz, melón, mijo, soja verde, avena, oca, *Panicum*, papaya, cacahuete, guisante, pimiento, guandul, piña, *Phaseolus*, patata, calabaza, arroz, sorgo, soja, calabacín, caña de azúcar, remolacha azucarera, girasol, boniato, té, tomate, tabaco, sandía y trigo; de animales; y de mamífero.

En una realización específica, la célula huésped es una célula de levadura seleccionada del grupo que consiste en una célula huésped de *Saccharomyces*, *Pichia* y *Candida*.

En otra realización específica, la célula huésped es una célula de nematodo *Caenorhabdus elegans*.

En otra realización específica, la célula huésped es una célula de insecto.

En otra realización específica, la célula huésped es una célula vegetal seleccionada del grupo que consiste en una célula de manzana, *Arabidopsis*, mijo perla, plátano, cebada, alubias, remolacha, lenteja negra, garbanzo, chile, pepino, berenjena, habas, maíz, melón, mijo, soja verde, avena, oca, *Panicum*, papaya, cacahuete, guisante, pimiento, guandul, piña, *Phaseolus*, patata, calabaza, arroz, sorgo, soja, calabacín, caña de azúcar, remolacha azucarera, girasol, boniato, té, tomate, tabaco, sandía y trigo.

En otra realización específica, la célula huésped es una célula de pez cebra.

En otra realización específica, la célula huésped es una célula de pollo.

5 En otra realización específica, la célula huésped es una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste en una célula de hámster, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de conejo, una célula de gato, una célula de perro, una célula de animal bovino, una célula de cabra, una célula de vaca, una célula de cerdo, una célula de caballo, una célula de oveja, una célula de mono, una célula de chimpancé y una célula de ser humano.

10 En la técnica se conoce bien la transformación de células huésped y puede lograrse mediante una variedad de métodos incluyendo pero sin limitarse a electroporación, infección viral, transfección mediante plásmido/vector, transfección mediada por vector no viral, transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo de partículas, y similares. La expresión de productos génicos deseados implica cultivar las células huésped transformadas en condiciones adecuadas e inducir la expresión del gen transformado. En la técnica se conocen bien las condiciones de cultivo y los protocolos de expresión génica en células procariontas y eucariotas (véase la sección de métodos generales de los ejemplos). Las células pueden recogerse y los productos génicos aislarse según protocolos específicos para el producto génico.

20 Además, puede elegirse una célula huésped que modula la expresión del polinucleótido insertado, o modifica y procesa el producto de polipéptido del modo específico deseado. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para la modificación y el procesamiento traduccional y postraduccional [por ejemplo, glicosilación, escisión (por ejemplo, de secuencia señal)] de proteínas. Las líneas celulares o sistemas huésped apropiados pueden elegirse para garantizar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína foránea expresada. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano puede usarse para producir un producto proteico de núcleo no glicosilado. Sin embargo, un polipéptido expresado en bacterias puede no estar plegado apropiadamente. La expresión en levaduras puede producir un producto glicosilado. La expresión en células eucariotas puede aumentar la posibilidad de plegamiento y glicosilación "nativos" de una proteína heteróloga. Además, la expresión en células de mamífero puede proporcionar una herramienta para reconstituir, o constituir, la actividad del polipéptido. Además, diferentes sistemas de expresión de vector/huésped pueden afectar a reacciones de procesamiento, tales como escisiones proteolíticas, en un grado diferente. La presente invención también se refiere a un organismo no humano que comprende una célula huésped aislada según la invención. En una realización específica, el organismo no humano es un organismo procarionta o un organismo eucariota. En otra realización específica, el organismo no humano es un organismo invertebrado o un organismo vertebrado.

35 Preferiblemente, el organismo no humano se selecciona del grupo que consiste en una bacteria, un hongo, una levadura, un nematodo, un insecto, un pez, una planta, un ave, un animal y un mamífero. Más preferiblemente, el organismo no humano es una levadura, un nematodo, un insecto, una planta, un pez cebra, un pollo, un hámster, un ratón, una rata, un conejo, un gato, un perro, un animal bovino, una cabra, una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja, un simio, un mono o un chimpancé.

40 En una realización específica, el organismo no humano es una levadura seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Pichia* y *Candida*.

En otra realización específica, el organismo no humano es un nematodo *Caenorhabdus elegans*.

45 En otra realización específica, el organismo no humano es una planta seleccionada del grupo que consiste en manzana, *Arabidopsis*, mijo perla, plátano, cebada, alubias, remolacha, lenteja negra, garbanzo, chile, pepino, berenjena, habas, maíz, melón, mijo, soja verde, avena, oca, *Panicum*, papaya, cacahuete, guisante, pimiento, guandul, piña, *Phaseolus*, patata, calabaza, arroz, sorgo, soja, calabacín, caña de azúcar, remolacha azucarera, girasol, boniato, té, tomate, tabaco, sandía y trigo.

En otra realización específica, el organismo no humano es un ratón *Mus musculus*.

#### SISTEMA DE MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA INVENCION

55 La presente invención se refiere a un grupo de ligandos que son útiles en un sistema de expresión génica inducible basado en el receptor de ecdisona. Tal como se presenta en el presente documento, un grupo novedoso de ligandos proporciona un sistema de expresión génica inducible mejorado en células huésped tanto procariontas como eucariotas. Por tanto, la presente invención se refiere a ligandos que son útiles para modular la expresión de genes.

60 En particular, la presente invención se refiere a ligandos que tienen la capacidad de transactivar un sistema de modulación de la expresión génica que comprende al menos un casete de expresión génica que puede expresarse en la célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H. Preferiblemente, la unión a ligando de receptores nucleares de grupo H es de un receptor de ecdisona, un receptor ubicuo, un receptor huérfano 1, un receptor nuclear de hormonas esteroideas 1, un receptor X retinoide que interacciona con la proteína-15, un receptor X hepático  $\beta$ , una proteína similar al receptor de hormonas esteroideas, un receptor X hepático, un receptor X hepático

$\alpha$ , un receptor X farnesoide, un receptor que interacciona con la proteína 14 y un receptor de farnesol. Más preferiblemente, el dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H es de un receptor de ecdisona.

5 En una realización específica, el sistema de modulación de la expresión génica comprende un casete de expresión génica que comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado con un gen cuya expresión va a modularse; y un dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H que comprende una mutación de sustitución. El sistema de modulación de la expresión génica puede comprender además un segundo casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión a ADN del polipéptido codificado del primer casete de expresión génica; ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del polipéptido codificado del primer casete de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión va a modularse.

15 En otra realización específica, el sistema de modulación de la expresión génica comprende un casete de expresión génica que comprende a) un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado con un gen cuya expresión va a modularse; y un dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H que comprende una mutación de sustitución, y b) un segundo dominio de unión a ligando de receptores nucleares seleccionado del grupo que consiste en un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide de vertebrados, un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide de invertebrados, un dominio de unión a ligando de proteína ultraespiráculo y un dominio de unión a ligando quimérico que comprende dos fragmentos de polipéptido, en el que el primer fragmento de polipéptido es de un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide de vertebrados, un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide de invertebrados o un dominio de unión a ligando de proteína ultraespiráculo, y el segundo fragmento de polipéptido es de un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide de vertebrados, dominio de unión a ligando del receptor X retinoide de invertebrados o dominio de unión a ligando de proteína ultraespiráculo diferente. El sistema de modulación de la expresión génica puede comprender además un segundo casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión a ADN del polipéptido codificado del primer casete de expresión génica; ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del polipéptido codificado del primer casete de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión va a modularse.

30 En otra realización específica, el sistema de modulación de la expresión génica comprende un primer casete de expresión génica que comprende un polinucleótido que codifica para un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado con un gen cuya expresión va a modularse y un dominio de unión a ligando de receptores nucleares, y un segundo casete de expresión génica que comprende un polinucleótido que codifica para un segundo polipéptido que comprende un dominio de transactivación y un dominio de unión a ligando de receptores nucleares, en el que uno de los dominios de unión a ligando de receptores nucleares es un dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H que comprende una mutación de sustitución. En una realización preferida, el primer polipéptido está sustancialmente libre de un dominio de transactivación y el segundo polipéptido está sustancialmente libre de un dominio de unión a ADN. Para los fines de la invención, "sustancialmente libre" significa que la proteína en cuestión no contiene suficiente secuencia del dominio en cuestión para proporcionar actividad de activación o unión. El sistema de modulación de la expresión génica puede comprender además un tercer casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión a ADN del primer polipéptido del primer casete de expresión génica; ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del segundo polipéptido del segundo casete de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión va a modularse.

45 El que caso en el que sólo un dominio de unión a ligando de receptores nucleares sea un dominio de unión a ligando de grupo H que comprende una mutación de sustitución, el otro dominio de unión a ligando de receptores nucleares puede ser de cualquier otro receptor nuclear que forme un dímero con el dominio de unión a ligando de grupo H que comprende la mutación de sustitución. Por ejemplo, cuando el dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H que comprende una mutación de sustitución es un dominio de unión a ligando del receptor de ecdisona que comprende una mutación de sustitución, el otro dominio de unión a ligando de receptores nucleares ("pareja") puede ser de un receptor de ecdisona, un receptor X retinoide (RXR) de vertebrados, un RXR de invertebrados, una proteína ultraespiráculo (USP) o un receptor nuclear quimérico que comprende al menos dos fragmentos de polipéptido de dominio de unión a ligando de receptores nucleares diferentes seleccionados del grupo que consiste en un RXR de vertebrados, un RXR de invertebrados y una USP (véanse las solicitudes de patente en tramitación junto con la presente PCT/US01/09050, PCT/US02/05235 y PCT/US02/05706, incorporadas en el presente documento como referencia en su totalidad). El dominio de unión a ligando de receptores nucleares "pareja" puede comprender además una mutación de truncamiento, una mutación de delección, una mutación de sustitución u otra modificación.

65 Preferiblemente, el dominio de unión a ligando de RXR de vertebrados es de un RXR de ser humano *Homo sapiens*, ratón *Mus musculus*, rata *Rattus norvegicus*, pollo *Gallus gallus*, cerdo *Sus scrofa domestica*, rana *Xenopus laevis*, pez cebra *Danio rerio*, tunicado *Polyandrocara misakiensis* o medusa *Tripedalia cysophora*.

Preferiblemente, el dominio de unión a ligando de RXR de invertebrados es de un polipéptido ultraespiráculo de langosta *Locusta migratoria* ("LmUSP"), un homólogo de RXR 1 de garrapata *Amblyomma americanum* ("AmaRXR1"), un homólogo de RXR 2 de garrapata *Amblyomma americanum* ("AmaRXR2"), un homólogo de RXR de cangrejo violinista *Celuca pugilator* ("CpRXR"), un homólogo de RXR de escarabajo *Tenebrio molitor* ("TmRXR"), un homólogo de RXR de una abeja *Apis mellifera* ("AmRXR"), un homólogo de RXR de áfido *Myzus persicae* ("MpRXR") o un homólogo de RXR de no díptero/no lepidóptero.

Preferiblemente, el dominio de unión a ligando de RXR quimérico comprende al menos dos fragmentos de polipéptido seleccionados del grupo que consiste en un fragmento de polipéptido de RXR de especie de vertebrado, un fragmento de polipéptido de RXR de especie de invertebrado y un fragmento de polipéptido homólogo de RXR de especie de invertebrado no díptero/no lepidóptero. Un dominio de unión a ligando de RXR quimérico para su uso en la presente invención puede comprender al menos dos fragmentos de polipéptido de RXR de especies diferentes, o cuando la especies son iguales, los dos o más fragmentos de polipéptido pueden ser de dos o más isoformas diferentes del fragmento de polipéptido de RXR de la especie.

En una realización preferida, el dominio de unión a ligando de RXR quimérico comprende al menos un fragmento de polipéptido de RXR de especie de vertebrado y un fragmento de polipéptido de RXR de especie de invertebrado.

En una realización más preferida, el dominio de unión a ligando de RXR quimérico comprende al menos un fragmento de polipéptido de RXR de especie de vertebrado y un fragmento de polipéptido homólogo de RXR de especie de invertebrado no díptero/no lepidóptero.

En una realización específica, el gen cuya expresión va a modularse es un gen homólogo con respecto a la célula huésped. En otra realización específica, el gen cuya expresión va a modularse es un gen heterólogo con respecto a la célula huésped.

Los ligandos para su uso en la presente invención tal como se describe a continuación, cuando se combinan con el dominio de unión a ligando del/de los receptor(es) nuclear(es), que a su vez se une(n) al elemento de respuesta unido a un gen, proporcionan los medios para la regulación temporal externa de expresión del gen. El mecanismo de unión o el orden en el que los diversos componentes de esta invención se unen entre sí, es decir, por ejemplo, ligando a dominio de unión a ligando, dominio de unión a ADN a elemento de respuesta, dominio de transactivación a promotor, etc., no es crítico.

En un ejemplo específico, la unión del ligando al dominio de unión a ligando de un receptor nuclear de grupo H y su pareja de dominio de unión a ligando de receptores nucleares permite la expresión o supresión del gen. Este mecanismo no excluye la posibilidad de unión del ligando al receptor nuclear de grupo H (GHNR) o su pareja, y la formación resultante de complejos homodiméricos activos (por ejemplo GHNR + GHNR o pareja + pareja). Preferiblemente, uno o más de los dominios de receptor varían produciendo un cambio de gen híbrido. Normalmente, pueden elegirse uno o más de los tres dominios, DBD, LBD y dominio de transactivación, de una fuente diferente de la fuente de los otros dominios de modo que los genes híbridos y las proteínas híbridas resultantes se optimizan en la célula u organismo huésped elegido para la actividad de transactivación, unión complementaria del ligando y reconocimiento de un elemento de respuesta específico. Además, el propio elemento de respuesta puede estar modificado o sustituido con elementos de respuesta para otros dominios de proteína de unión a ADN tales como la proteína GAL-4 de levadura (véase Sadowski, *et al.* (1988) *Nature*, 335: 563-564) o la proteína LexA de *Escherichia coli* (véase Brent y Ptashne (1985), *Cell*, 43: 729-736), o elementos de respuesta sintéticos específicos para interacciones dirigidas con proteínas diseñadas, modificadas y seleccionadas para tales interacciones específicas (véase, por ejemplo, Kim, *et al.* (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 3616-3620) para acomodar receptores híbridos. Otra ventaja de los sistemas de dos híbridos es que permiten la elección de un promotor usado para dirigir la expresión del gen según un resultado final deseado. Un doble control de este tipo puede ser particularmente importante en áreas de terapia génica, especialmente cuando se producen proteínas citotóxicas, debido a que puede controlarse tanto el tiempo de expresión así como las células en las que se produce la expresión. Cuando los genes, unidos operativamente a un promotor adecuado, se introducen en las células del sujeto, la expresión de los genes exógenos está controlada por la presencia del sistema de esta invención. Los promotores pueden regularse de manera constitutiva o inducible o pueden ser específicos de tejido (es decir, expresados sólo en un tipo particular de célula) o específicos de determinadas etapas de desarrollo del organismo.

El receptor de ecdisona es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares y se clasifica en la subfamilia 1, grupo H (denominado en el presente documento "receptores nucleares de grupo H"). Los miembros de cada grupo comparten un 40-60% de identidad de aminoácidos en el dominio E (unión a ligando) (Laudet *et al.*, *A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Subfamily*, 1999; *Cell* 97: 161-163). Además del receptor de ecdisona, otros miembros de esta subfamilia 1 de receptores nucleares, grupo H, incluyen: receptor ubicuo (UR), receptor huérfano 1 (O-1), receptor nuclear de hormonas esteroideas 1 (NER-1), receptor X retinoide que interacciona con la proteína-15 (RIP-15), receptor X hepático  $\beta$  (LXR $\beta$ ), proteína similar al receptor de hormonas esteroideas (RLD-1), receptor X hepático (LXR), receptor X hepático  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), receptor X farnesoide (FXR), receptor que interacciona con proteína 14 (RIP-14) y receptor de farnesol (HRR-1).



En particular, en el presente documento se describen ligandos novedoso útiles en un sistema de modulación de la expresión génica que comprende un dominio de unión a ligando de receptores nucleares de grupo H que comprende una mutación de sustitución. Este sistema de expresión génica puede ser un sistema de expresión génica basado en "cambio individual" en el que el dominio de transactivación, dominio de unión a ADN y dominio de unión a ligando están en un polipéptido codificado. Alternativamente, el sistema de modulación de la expresión génica puede ser un sistema de modulación de la expresión génica basado en "cambio doble" o "en dos híbridos" en el que el dominio de transactivación y dominio de unión a ADN se ubican en dos polipéptidos codificados diferentes.

Un sistema de modulación de la expresión génica basado en el receptor de ecdisona de la presente invención puede ser o bien heterodimérico o bien homodimérico. Un complejo de EcR funcional se refiere en general a un complejo de proteína heterodimérico que consiste en dos miembros de la familia de receptores de esteroides, una proteína de receptor de ecdisona obtenida de diversos insectos y una proteína ultraespiráculo (USP) o el homólogo de vertebrados de USP, proteína de receptor X retinoide (véase Yao, *et al.* (1993) *Nature* 366, 476-479; Yao, *et al.*, (1992) *Cell* 71, 63-72). Sin embargo, el complejo también puede ser un homodímero tal como se detalla a continuación. El complejo de receptor ecdiesteroide funcional también puede incluir proteína(s) adicional(es) tal(es) como inmunofilinas. Los miembros adicionales de la familia de receptores de esteroides de proteínas, conocidos como factores de transcripción (tales como DHR38 o *betaFTZ-1*), también pueden ser parejas dependientes o independientes de ligando para EcR, USP y/o RXR. Adicionalmente, pueden requerirse otros cofactores tales como proteínas conocidas en general como coactivadores (también denominadas adaptadores o mediadores). Estas proteínas no se unen de manera específica de secuencia a ADN y no están implicadas en la transcripción basal. Pueden ejercer su efecto sobre la activación de la transcripción a través de diversos mecanismos, incluyendo estimulación de la unión a ADN de activadores, afectando a la estructura de la cromatina o mediando en las interacciones de activador-complejo de iniciación. Los ejemplos de tales coactivadores incluyen RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA-2, ACTR/AIB1/RAC3/pCIP así como la proteína de unión al elemento de respuesta B del coactivador C promiscuo, CBP/p300 (para revisión véase Glass *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:222-232, 1997). Además, pueden requerirse cofactores proteicos conocidos en general como correpresores (también conocidos como represores, silenciadores o mediadores del silenciamiento) para inhibir eficazmente la activación transcripcional en ausencia de ligando. Estos correpresores pueden interactuar con el receptor de ecdisona no ligado para silenciar la actividad en el elemento de respuesta. Las pruebas actuales sugieren que la unión del ligando cambia la conformación del receptor, lo que da como resultado la liberación del correpresor y el reclutamiento de los coactivadores descritos anteriormente, suprimiendo así su actividad de silenciamiento. Los ejemplos de correpresores incluyen N-CoR y SMRT (para revisión, véase Horwitz *et al.* *Mol Endocrinol.* 10: 1167-1177, 1996). Estos cofactores o bien pueden ser endógenos dentro de la célula u organismo o bien pueden añadirse exógenamente como transgenes para expresarse de modo o bien regulado o bien no regulado. Los complejos homodiméricos de la proteína de receptor de ecdisona, USP o RXR también pueden ser funcionales en ciertas circunstancias.

El complejo de receptor de ecdisona normalmente incluye proteínas que son miembros de la superfamilia de receptores nucleares en el que todos los miembros se caracterizan generalmente por la presencia de un dominio de transactivación amino-terminal, un dominio de unión a ADN ("DBD") y un dominio de unión a ligando ("LBD") separado del DBD por una región bisagra. Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio de unión a ADN" comprende una secuencia de polipéptido mínima de una proteína de unión a ADN, hasta la longitud completa de una proteína de unión a ADN, siempre que el dominio de unión a ADN funcione para asociarse con un elemento de respuesta particular. Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares también se caracterizan por la presencia de cuatro o cinco dominios: A/B, C, D, E, y en algunos miembros F (véase la patente estadounidense 4.981.784 y Evans, *Science* 240:889-895 (1988)). El dominio "A/B" corresponde al dominio de transactivación, "C" corresponde al dominio de unión a ADN, "D" corresponde a la región bisagra y "E" corresponde al dominio de unión a ligando. Algunos miembros de la familia también pueden tener otro dominio de transactivación en el lado carboxilo-terminal del LBD que corresponde a "F".

El DBD se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc-cisteína entre los que hay dos motivos de amino ácido, la caja P y la caja D, que confieren especificidad para elementos de respuesta a ecdisona. Estos dominios pueden ser o bien nativos o bien modificados o bien quimeras de diferentes dominios de proteínas de receptor heterólogas. El receptor de EcR, como un subconjunto de la familia de receptores de esteroides, también presenta menos regiones bien definidas responsables de las propiedades de heterodimerización. Debido a que los dominios de receptores nucleares son de naturaleza modular, pueden intercambiarse los LBD, DBD y dominios de transactivación.

Se sabe que los sistemas de cambio génico incorporan componentes del complejo de receptor de ecdisona. Sin embargo, en estos sistemas conocidos, siempre que se usa EcR, está asociado con dominios de unión a ADN nativos o modificados y dominios de transactivación en la misma molécula. USP o RXR se usan normalmente como parejas silenciosas. Anteriormente se ha mostrado que cuando los dominios de unión a ADN y los dominios de transactivación están en la misma molécula, la actividad de fondo en ausencia de ligando es alta y que tal actividad se reduce drásticamente cuando los dominios de unión a ADN y los dominios de transactivación están en moléculas diferentes, es decir, en cada una de las dos parejas de un complejo heterodimérico u homodimérico (véase el documento PCT/US01/09050).

MÉTODO DE MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA INVENCION

5 La presente invención también se refiere a métodos de modulación de la expresión génica en una célula huésped usando un sistema de modulación de la expresión génica según la invención. Específicamente, la presente invención proporciona un método de modulación de la expresión de un gen en una célula huésped que comprende las etapas de: a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica según la invención; y b) introducir en la célula huésped a ligando; en el que el gen que va a modularse es un componente de un casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta que comprende un dominio reconocido por dominio de unión a ADN del sistema de expresión génica; ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del sistema de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión va a modularse, mediante lo cual tras la introducción del ligando en la célula huésped, se modula la expresión del gen.

15 La invención también proporciona un método de modulación de la expresión de un gen en una célula huésped que comprende las etapas de: a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica según la invención; b) introducir en la célula huésped un casete de expresión génica según la invención, en el que el casete de expresión génica comprende i) un elemento de respuesta que comprende un dominio reconocido por el dominio de unión a ADN del sistema de expresión génica; ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del sistema de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión va a modularse; y c) introducir en la célula huésped un ligando; mediante lo cual tras la introducción del ligando en la célula huésped, se modula la expresión del gen.

25 La presente invención también proporciona un método de modulación de la expresión de un gen en una célula huésped que comprende un casete de expresión génica que comprende un elemento de respuesta que comprende un dominio al que se une el dominio de unión a ADN del primer polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; y un gen cuya expresión va a modularse; en el que el método comprende las etapas de: a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica según la invención; y b) introducir en la célula huésped un ligando; mediante lo cual tras la introducción del ligando en el huésped, se modula la expresión del gen.

35 Los genes de interés para la expresión en una célula huésped usando los métodos dados a conocer en el presente documento pueden ser genes endógenos o genes heterólogos. La información de la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos para un gen o una proteína deseada puede estar ubicada en una de las muchas bases de datos de acceso público, por ejemplo, GENBANK, EMBL, Swiss-Prot y PIR, o en muchas publicaciones de revistas relacionadas con la biología. Por tanto, los expertos en la técnica tienen acceso a la información de secuencias de ácidos nucleicos para prácticamente todos los genes conocidos. Tal información puede usarse entonces para construir los constructos deseados para la inserción del gen de interés dentro de los casetes de expresión génica usados en los métodos descritos en el presente documento.

40 Los ejemplos de genes de interés para la expresión en una célula huésped usando métodos expuestos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: antígenos producidos en plantas como vacunas, enzimas como alfa-amilasa, fitasa, glucanos y kilanasa, genes para la resistencia frente a insectos, nematodos, hongos, bacterias, virus y estrés abiótico, productos nutracéuticos, productos farmacéuticos, vitaminas, genes para modificar el contenido en aminoácidos, resistencia a herbicidas, tolerancia al frío, las sequías y el calor, productos industriales, aceites, proteínas, hidratos de carbono, antioxidantes, plantas macho estériles, flores, combustibles, otras características de producción, genes que codifican para polipéptidos terapéuticamente deseables o productos que pueden usarse para tratar un estado, una enfermedad, un trastorno, una disfunción, un defecto genético, tales como anticuerpos monoclonales, enzimas, proteasas, citocinas, interferones, insulina, eritropoyetina, factores de coagulación, otros factores o componentes sanguíneos, vectores virales para terapia génica, virus para vacunas, dianas para el descubrimiento de fármacos, análisis proteómicos y genómicos funcionales y aplicaciones, y similares.

MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN/TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

55 Una medición útil de los métodos de la invención es la del estado transcripcional de la célula que incluye las identidades y abundancias de ARN, preferiblemente especies de ARNm. Tales mediciones se realizan convenientemente midiendo las abundancias de ADNc mediante cualquiera de las diversas tecnologías de expresión génica existentes.

60 La tecnología de matriz de ácidos nucleicos es una técnica útil para determinar la expresión de ARNm diferencial. Una tecnología de este tipo incluye, por ejemplo, chips de oligonucleótidos y micromatrices de ADN. Estas técnicas se basan en fragmentos de ADN u oligonucleótidos que se corresponden con diferentes genes o ADNc que están inmovilizados sobre un soporte sólido y se hibridan con sondas preparadas a partir de conjuntos de ARNm total extraídos de células, tejidos u organismos completos y se convierten en ADNc. Los chips de oligonucleótidos son matrices de oligonucleótidos sintetizados en un sustrato usando técnicas fotolitográficas. Se han producido chips

que pueden analizar hasta 1700 genes. Las micromatrices de ADN son matrices de muestras de ADN, normalmente productos de PCR, que se imprimen robóticamente sobre un portaobjetos microscópico. Cada gen se analiza mediante una secuencia de ADN diana de longitud parcial o completa. Actualmente se preparan comercialmente de manera rutinaria micromatrices con hasta 10.000 genes. La diferencia principal entre estas dos técnicas es que los chips de oligonucleótidos normalmente utilizan oligonucleótidos de 25 meros que permiten el fraccionamiento de moléculas de ADN cortas mientras que las dianas de ADN más largas de las micromatrices, de aproximadamente 1000 pares de bases, pueden proporcionar más sensibilidad en el fraccionamiento de mezclas de ADN complejas.

Otra medición útil de los métodos de la invención es la determinación del estado de traducción de la célula midiendo las abundancias de la especie de proteína constituyente presente en la célula usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Cuando se desea la identificación de genes asociados con diversas funciones fisiológicas, puede emplearse un ensayo en el que se miden cambios en tales funciones como crecimiento celular, apoptosis, senescencia, diferenciación, adhesión, unión a una molécula específica, unión a otra célula, organización celular, organogénesis, transporte intracelular, facilitación del transporte, conversión de energía, metabolismo, miogénesis, neurogénesis, y/o hematopoyesis.

Además, puede usarse la expresión génica de marcador o indicador seleccionable para medir la modulación de la expresión génica usando la presente invención.

En la técnica se conocen bien otros métodos para detectar los productos de expresión génica e incluyen análisis de transferencias de tipo Southern (detección de ADN), transferencias de punto o de ranura (ADN, ARN), transferencias de tipo Northern (ARN), RT-PCR (ARN), inmunotransferencias de tipo Western (detección de polipéptidos) y ELISA (polipéptidos). Aunque es menos preferido, pueden usarse proteínas marcadas para detectar una secuencia de ácido nucleico particular a la que se hibrida.

En algunos casos es necesario amplificar la cantidad de una secuencia de ácido nucleico. Esto puede llevarse a cabo usando uno o más de varios métodos adecuados que incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"), amplificación basada en la transcripción, y similares. La PCR se lleva a cabo de acuerdo con técnicas conocidas en las que, por ejemplo, se trata una muestra de ácido nucleico en presencia de una ADN polimerasa termoestable, en condiciones de hibridación, con un par de cebadores oligonucleotídicos, con un cebador que se hibrida con una cadena (molde) de la secuencia específica que va a detectarse. Los cebadores son suficientemente complementarios a cada cadena de molde de la secuencia específica para hibridarse con la misma. Un producto de extensión de cada cebador se sintetiza y es complementario a la cadena de molde de ácido nucleico a la que se hibrida. El producto de extensión sintetizado de cada cebador también puede servir como molde para la síntesis adicional de productos de extensión usando los mismos cebadores. Tras un número suficiente de rondas de síntesis de productos de extensión, puede analizarse la muestra tal como se describió anteriormente para evaluar si la secuencia o secuencias que van a detectarse están presentes.

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se proporcionan para ilustrar la invención.

## Ejemplos

### MÉTODOS GENERALES

Las técnicas convencionales de clonación molecular y ADN recombinante usadas en el presente documento se conocen bien en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) (Maniatis) y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, y L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) y por Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Se conocen bien en la técnica materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos. Pueden encontrarse técnicas adecuadas para su uso en los siguientes ejemplos tal como se expone en *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, DC. (1994)) o por Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, segunda edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989). Todos los reactivos, enzimas de restricción y materiales usados para el crecimiento y mantenimiento de células huésped se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) o Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) a menos que se especifique lo contrario.

Pueden lograrse manipulaciones de secuencias genéticas usando el juego de programas disponible del Genetics

Computer Group Inc. (Wisconsin Package versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). Cuando se usa el programa de GCG "Pileup", puede usarse el valor por defecto de creación de huecos de 12 y el valor por defecto de extensión de huecos de 4. Cuando se usa el programa de CGC "Gap" o "Bestfit", puede usarse la penalización por creación de huecos por defecto de 50 y la penalización por extensión de huecos por defecto de 3.

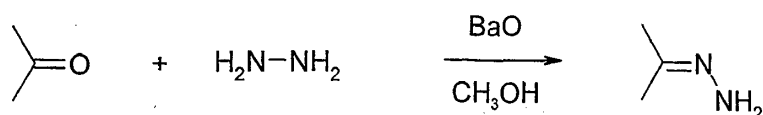
5 En cualquier caso en el que no se soliciten parámetros del programa de GCG, en estos o en cualquier otro programar de GCG pueden usarse valores por defecto.

El significado de las abreviaturas es tal como sigue: "h" significa hora(s), "min." significa minuto(s), "s" significa segundo(s), "d" significa día(s), "μl" significa microlitro(s), "ml" significa mililitro(s), "l" significa litro(s), "μM" significa micromolar, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimoles, "μg" significa microgramo(s), "mg" significa miligramo(s), "A" significa adenina o adenosina, "T" significa timina o timidina, "G" significa guanina o guanosina, "C" significa citidina o citosina, "x g" significa veces la gravedad, "nt" significa nucleótido(s), "aa" significa aminoácido(s), "pb" significa par(es) de base(s), "kb" significa kilobase(s), "k" significa kilo, "μ" significa micro, "°C" significa grados centígrados, "C" en el contexto de una ecuación química significa centígrado, "THF" significa tetrahidrofurano, "DME" significa dimetoxietano, "DMF" significa dimetilformamida, "RMN" significa resonancia magnética nuclear, "psi" se refiere a libras por pulgada cuadrada y "CCF" significa cromatografía en capa fina.

### EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE COMPUESTOS

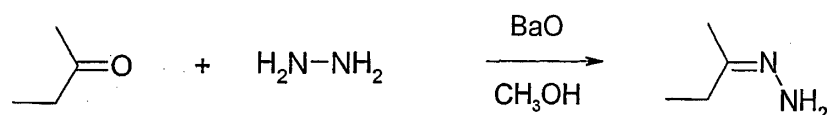
20 Pueden prepararse los compuestos de la presente invención según las siguientes rutas de síntesis.

#### 1.1 Preparación de isopropiliden-hidrazina



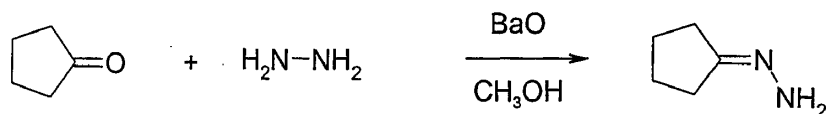
25 Se equipó un matraz de 3 bocas de 500 ml con un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición. Se cargó el recipiente con 140 ml de metanol y entonces se enfrió hasta -5°C en un baño de hielo/sal. Se añadió entonces BaO (7,5 g, 50 mmol) en porciones durante 5 minutos. Se observaron desprendimiento de gas y una emisión de calor. Se alcanzó una temperatura máxima de 5°C. Se enfrió la reacción hasta 0°C y se añadió monohidrato de hidrazina (32 g, 0,64 moles) en una porción, provocando que la mezcla se calentara hasta 5°C. Se enfrió el recipiente hasta 0°C y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de acetona (37 g, 0,64 moles) en 40 ml de metanol a lo largo de 1 hora a 5°C. Se continuó la agitación, permitiendo que la reacción se calentara lentamente hasta temperatura ambiente. Se continuó la agitación durante la noche, pero si se permitía que la reacción avanzara durante sólo una hora, se obtenían rendimientos bastante satisfactorios. La <sup>1</sup>H-RMN indicó la ausencia de acetona y una reacción completa. Se añadió éter (300 ml), que provocó que precipitara más sólido. Se añadieron Celite 545 y MgSO<sub>4</sub>, se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite sobre papel de piel de tiburón S&S en un embudo de vidrio sinterizado, y se eliminó la mayoría del éter a o por debajo de la temperatura ambiente en un evaporador rotatorio. Se destiló entonces cuidadosamente la disolución. Se colocó el destilado en un matraz limpio y se eliminó el metanol restante mediante evaporación en rotavapor sin aplicación de calor. Se monitorizó el procedimiento mediante <sup>1</sup>H-RMN hasta que quedaba <2,5% de metanol. Se obtuvo isopropiliden-hidrazina como un líquido incoloro ligeramente turbio (41 g, 89%), y se usó como tal en reacciones posteriores. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,85 (a, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,77 (s, 3H).

#### 1.2 Preparación de sec-butiliden-hidrazina



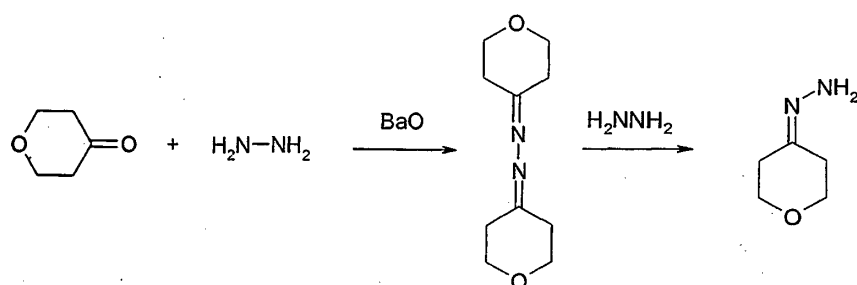
50 Se cargó un matraz de 1 l equipado con un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición con 250 ml de metanol y se enfrió hasta 0°C. Se añadió óxido de bario (15,3 g, 100 mmol) en porciones con emisión de calor. Se enfrió la reacción hasta 0°C y se añadió monohidrato de hidrazina (64,1 g, 1,28 mol) lentamente. Se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos, tras lo cual se añadió gota a gota metiletilcetona (92,3 g, 1,28 mol) a lo largo de un periodo de 30 minutos. Se agitó entonces la reacción durante 1 hora, manteniendo una temperatura por debajo de 8°C. La <sup>1</sup>H-RMN indicó la ausencia de cetona y una reacción completa. Se añadió entonces éter (200 ml), y se filtró el BaO a través de un lecho de gel de sílice. Se liberó el filtrado claro resultante de metanol en un evaporador rotatorio a o por debajo de la temperatura ambiente, se cambió el receptáculo y se destiló el producto hidrazona usando un baño de agua fijado a 38°C. Tras desechar un pequeño volumen inicial y residuo, se obtuvieron 70 g de sec-butiliden-hidrazina como un líquido incoloro claro. Se almacenó el material bajo refrigeración. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,9 (a, 2H), 2,25 (q, 2H), 1,78 (s, 3H), 1,07 (t, 3H). Angew. Chemie, 94, 2, 133 (1982).

## 1.3 Preparación de ciclopentiliden-hidrazina



5 Se preparó ciclopentiliden-hidrazina de una manera análoga con un rendimiento del 61%. Se almacenó el material bajo refrigeración. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,9 (a, 2H), 2,35 (t, 2H), 2,2 (t, 2H), 1,9 (m, 2H), 1,78 (m, 3H), 1,07 (t, 3H).

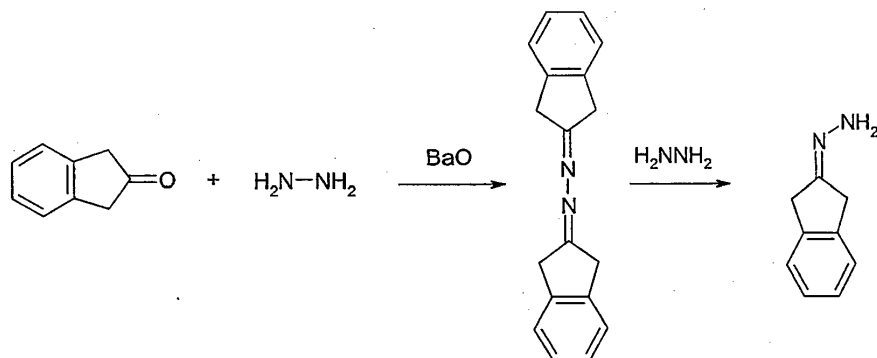
## 1.4 Preparación de (tetrahidro-piran-4-iliden)-hidrazina



15 Se cargaron tetrahidro-4H-piran-4-ona (10 g, 0,1 mol) y metanol (150 ml) en un matraz de tres bocas de 500 ml equipado con un embudo de adición. Se enfrió el recipiente en un baño de hielo y se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno mientras que se añadía gota a gota una disolución de hidrazina (2,5 g, 50 mol) en 50 ml de metanol a lo largo de un periodo de una hora. Se formó un precipitado blanco tras haberse añadido aproximadamente la mitad de la hidrazina. Se continuó la agitación durante la noche, y la CCF posterior indicó un producto. Se eliminó el metanol a vacío, y se suspendió el residuo en hexano y se filtró para producir 9,1 g (46,4 mol) de N,N'-bis-(tetrahidro-piran-4-iliden)-hidrazina como un sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDC13) δ (ppm): 3,88 (t, 2H), 3,77 (t, 2H), 2,67 (t, 2H), 2,50 (t, 2H).

25 Se cargó este material junto con hidrazina (1,6 g, 50 mol) en un matraz de 300 ml equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo que contenía 100 ml de etanol absoluto, que se había secado recientemente mediante destilación azeotrópica con la ayuda de una trampa de Dean-Stark. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 6 horas, momento en el que el análisis de <sup>1</sup>H-RMN indicó sólo una traza de azina. Se enfrió la mezcla de reacción y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio a 35°C. (Temperaturas superiores aceleran la reversión a la azina). Se eliminó el etanol restante mediante adición repetida de tetracloruro de carbono, seguido por eliminación a vacío. Pudo aislarse tetrahidro-piran-4-iliden-hidrazina que contenía aproximadamente el 5-10% de azina de esta manera. Tras reposar a temperatura ambiente, la hidrazona está en una cantidad desproporcionada con respecto a la azina en cuestión de días. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDC13) δ (ppm): 5,0 (a, 2H), 3,80 (m, 4H), 2,39 (m, 4H).

## 1.5 Preparación de indan-2-iliden-hidrazina



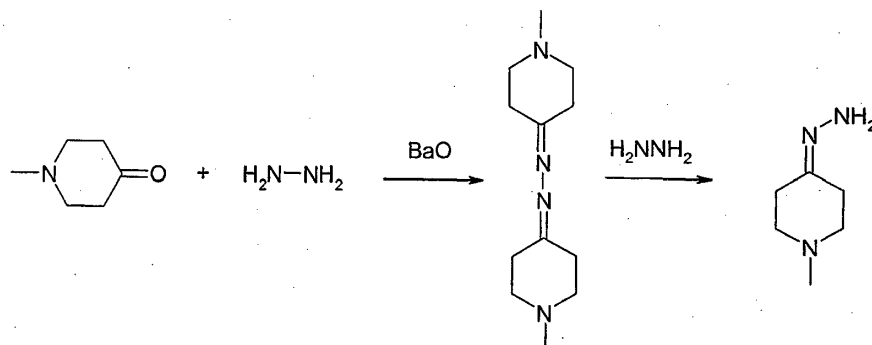
35 Se cargaron indan-2-ona (25 g) y metanol (25 ml) en un matraz de 3 bocas de 500 ml con un embudo de adición y agitador magnético bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota una disolución de monohidrato de hidrazina (4,73 g) en 50 ml de metanol a lo largo de una hora a temperatura ambiente. Se continuó la agitación durante la noche. Se recogió el precipitado resultante (aprox. 15,5 g), y se agitó con una mezcla de agua/cloroformo. Se secó la fase de cloroformo y se eliminó el disolvente a vacío para dar un sólido blanco-rojizo. El sobrenadante

40

original contenía más de la N,N'-di-indan-2-iliden-hidrazina deseada.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,4 (m, 1H), 7,3 (m, 3H), 3,93 (s, 2H), 3,82 (s, 2H).

Se disolvió la azina intermedia (15,35 g) en 200 ml de etanol absoluto en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se eliminaron por destilación aproximadamente 50 ml del disolvente, tras lo cual se añadió una disolución de 1,9 g de hidrazina anhidra en etanol. Se calentó la reacción a reflujo durante 90 minutos, momento en el que el compuesto de azina de partida ya no podía detectarse mediante  $^1\text{H-RMN}$ . Se aisló indan-2-iliden-hidrazina como un sólido marrón.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,3 (m, 4H), 5,05 (s a, 2H), 3,76 (s, 2H), 3,58 (s, 2H). La pureza de indan-2-ona comercial puede ser particularmente crítica para el éxito de esta reacción.

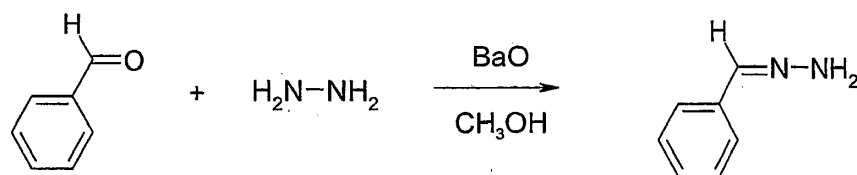
#### 1.6 Preparación de (1-metil-piperidin-4-iliden)-hidrazina



Se cargaron 1-metil-piperidin-4-ona (22,6 g, 0,2 mol) y metanol (200 ml) en un matraz de tres bocas de 500 ml equipado con un embudo de adición. Se enfrió el recipiente en un baño de hielo y se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno mientras que se añadía gota a gota una disolución de monohidrato de hidrazina (5 g, 0,1 mol) en 50 ml de metanol a lo largo de un periodo de una hora. Se formó un precipitado blanco tras haberse añadido aproximadamente la mitad de la hidrazina. Se continuó la agitación durante la noche, y la CCF posterior indicó un producto. Se eliminó el metanol a vacío, y se suspendió el residuo en hexano y se filtró para proporcionar N,N'-bis-(1-metil-piperidin-4-iliden)-hidrazina.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,6 (m, 8H), 2,5 (m, 8H), 2,33 (s, 6H).

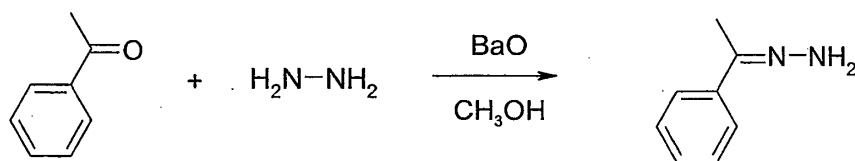
Se cargó este material junto con hidrazina anhidra (5,2 g, 0,162 mol) en un matraz de 500 ml equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo que contenía 200 ml de etanol absoluto, que se había secado recientemente mediante destilación azeotrópica con la ayuda de una trampa de Dean-Stark. Se calentó a reflujo la mezcla de reacción amarilla clara durante 4 horas, momento en el que el análisis de  $^1\text{H-RMN}$  indicó una pequeña cantidad de azina. Se añadieron 2 g adicionales de hidrazina y se continuó calentando durante 4 horas adicionales. Se enfrió la mezcla de reacción y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio. (Temperaturas superiores aceleran la reversión a la azina). Se eliminó el etanol restante mediante adición repetida de tetracloruro de carbono seguido por eliminación a vacío. Se obtuvo (1-metil-piperidin-4-iliden)-hidrazina como un aceite amarillo en una cantidad de 12,5 g, que contenía aproximadamente un 5% de azina.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 5,0 (a, 2H), 2,5 (m, 4H), 2,4 (m, 4H), 2,33 (s, 6H).

#### 1.7 Preparación de benciliden-hidrazina



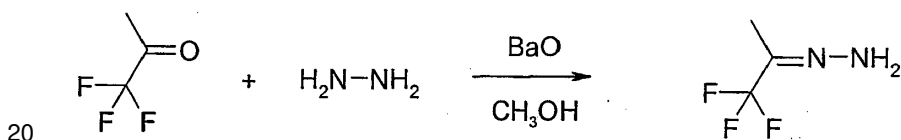
Se cargó un matraz de 1 l equipado con un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición con 250 ml de metanol y se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$ . Se añadió óxido de bario (9,8 g, 64 mmol) en porciones con emisión de calor. Se enfrió la reacción hasta  $0^\circ\text{C}$  y se añadió lentamente monohidrato de hidrazina (64,1 g, 1,28 mol). Se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos, momento tras el que se añadió gota a gota benzaldehído (135,8 g, 1,28 mol) a lo largo de un periodo de 30 minutos. Se agitó entonces la reacción durante 1 hora, mientras que se mantenía una temperatura por debajo de  $8^\circ\text{C}$ . La  $^1\text{H-RMN}$  indicó la ausencia de cetona y una reacción completa. Se añadió éter (200 ml) y se filtró el BaO a través de un lecho de gel de sílice. Se liberó el filtrado claro resultante de metanol en un evaporador rotatorio a o por debajo de la temperatura ambiente. Se retiró mediante filtración una gran masa de azina sólida amarilla brillante ( $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,67 (s, 2H), 7,85 (m, 4H), 7,47 (m, 6H)), y se destiló el filtrado para proporcionar aprox. 12 g de benciliden-hidrazina destilada. Se almacenó el material bajo refrigeración.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,74 (s, 1H), 7,53 (m, 2H), 7,35 (m, 3H), 5,5 (a, 2H).

## 1.8 Preparación de (1-fenil-etiliden)-hidrazina



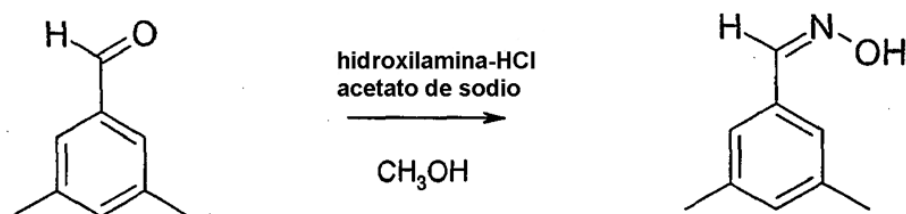
- 5 Se cargó un matraz de 1 l equipado con un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición con 300 ml de metanol y se enfrió hasta 0°C. Se añadió óxido de bario (8,4 g, 55 mmol) en porciones con emisión de calor. Se enfrió la reacción de nuevo hasta 0°C y se añadió lentamente monohidrato de hidrazina (54,6 g, 1,09 mol). Se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos, tras lo cual se añadió gota a gota benzaldehído (131,5 g, 1,09 mol) a lo largo de un periodo de 30 minutos. Se agitó entonces la reacción durante 1 hora, mientras que se mantenía una temperatura por debajo de 8°C. La <sup>1</sup>H-RMN indicó la ausencia de cetona y una reacción completa. Se añadió éter (200 ml) y se filtró el BaO a través de un lecho de gel de sílice. Se liberó el filtrado claro resultante de metanol en un evaporador rotatorio a o por debajo de la temperatura ambiente. Se destiló el concentrado restante a aprox. 1 torr y se recogió la (1-fenil-etiliden)-hidrazina deseada a 91-94°C en una cantidad de 50 g. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDC13) δ (ppm): 7,65 (m, 2H), 7,35 (m, 3H), 5,37 (a, 2H), 2,13 (s, 3H). Durante la destilación, apareció un sólido amarillo brillante de N,N'-bis-(1-fenil-etiliden)-hidrazina en el recipiente de destilación. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDC13) δ (ppm): 7,95 (m, 4H), 7,45 (m, 6H), 2,32 (s, 6H).

## 1.9 Preparación de (2,2,2-trifluoro-1-metil-etiliden):hidrazina



- 20 Se cargó monohidrato de hidrazina (69 g, 1,37 mol) a un matraz de una única boca de 300 ml equipado con un agitador magnético y embudo de adición. Se enfrió el recipiente en un baño de hielo, a medida que se añadía gota a gota trifluoroacetona (77 g, 0,687 moles) a lo largo de un periodo de horas. Se agitó la mezcla de reacción durante una hora adicional y se extrajo varias veces con éter. Se eliminó el disolvente de los extractos de éter combinados, proporcionando aproximadamente 50 g de un sólido ceroso. Se destiló este material a presión atmosférica, produciendo aprox. 13 g de (2,2,2-trifluoro-1-metil-etiliden)-hidrazina como un destilado incoloro claro. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDC13) δ (ppm): 5,7 (a, 2H), 1,87 (s, 3H); p.e. 135°C.

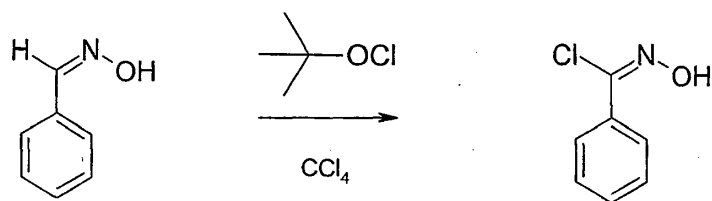
## 30 1.10 Preparación de oxima de 3,5-dimetil-benzaldehído



- 35 Se estableció un matraz de fondo redondo de 2 l con un agitador mecánico, termómetro, entrada de N<sub>2</sub> y condensador de reflujo. Se añadió una disolución de 3,5-dimetil-benzaldehído (70 g, 522 mmol) en 300 ml de metanol, seguido por la adición de acetato de sodio (44 g, 536 mmol). Se añadió hidroxilamina-HCl (37 g, 532 mmol) en porciones a lo largo de 5 minutos, tiempo durante el que la temperatura máxima alcanzada sin enfriamiento fue de 27°C. Se agitó la mezcla durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. La CCF (acetato de etilo al 10% en hexano) indicó la ausencia del aldehído de partida y la aparición de oxima. Se eliminó la mayoría del metanol en un evaporador rotatorio, dando como resultado la formación de un precipitado. Se añadieron éter y agua a la suspensión concentrada, y se recogió entonces la fase de éter, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se retiró en un evaporador rotatorio. Se secó el material cristalino blanco al aire, dando como resultado 77 g (100%) de oxima de 3,5-dimetil-benzaldehído. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDC13) δ (ppm): 8,09 (s, 1H), 7,22 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,33 (s, 6H).

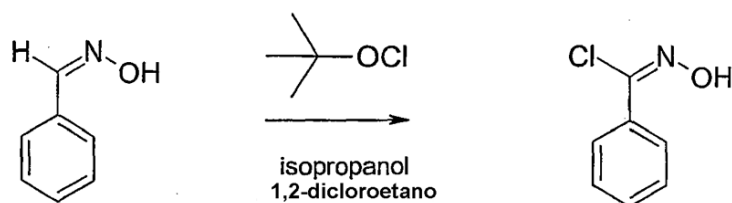
## 45 1.11 Preparación de cloruro de benzohidroximólo

Método A:



Se equipó un matraz de fondo redondo de 125 ml con un agitador magnético, termómetro y embudo de adición de presión igualada. Se cargó oxima de benzaldehído (25 g, 0,206 mol) disuelta en 40 ml de  $\text{CCl}_4$  en el recipiente. Se protegió la reacción de la luz brillante a medida que se añadía gota a gota una disolución de hipoclorito de t-butilo (12,1 g, preparado mediante la acción de  $\text{NaOCl}$  sobre alcohol t-butílico según Organic Syntheses, volumen 5, p. 183) en 20 ml de  $\text{CCl}_4$  a lo largo de un periodo de 40 minutos. Se desarrollaron una emisión de calor transitoria y color agua. Se continuó la agitación durante la noche a temperatura ambiente, momento tras el que se eliminó la mayor parte del  $\text{CCl}_4$  de la mezcla de reacción amarilla a vacío. Se añadió pentano y se enfrió la disolución, provocando la formación de cristal del cloruro de hidroximoílo deseado con un rendimiento de 9,0 g.  $^1\text{H-RMN}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,4 (s, 1H, N-OH), 7,87 (m, 2H), 7,45 (m, 3H).

Método B:



Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 100 ml, equipado con un agitador magnético y termómetro, con 40 ml de dicloroetano, 1,06 g de oxima de benzaldehído y 10 ml de isopropanol. Se enfrió el recipiente hasta  $-12^\circ\text{C}$  en un baño de hielo y sal. Se añadió gota a gota hipoclorito de t-butilo (opcionalmente como una disolución en dicloroetano) a lo largo de varios minutos con agitación rápida, mientras que se mantenía la temperatura por debajo de  $10^\circ\text{C}$ . Se observó un destello de color azul durante varios segundos. Se agitó la mezcla durante 15 minutos con enfriamiento continuo. Se eliminaron el disolvente y el subproducto alcohol t-butílico en un evaporador rotatorio y se capturó varias veces con cloroformo. Tras la tercera captura, se formó un polvo, que se lavó de nuevo con cloroformo, dando como resultado formación de cristal de 1,32 g del producto. La CCF indicó un único punto que eluyó ligeramente más arriba que la oxima inicial,  $R_f=0,4$ ;  $R_f(\text{oxima})=0,32$  (hexano:acetato de etilo 4:1). Se almacenó el producto cloruro de benzohidroximoílo en el congelador.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,63 (s, 1H, N-OH), 7,87 (m, 2H), 7,45 (m, 3H).

Precaución: El hipoclorito de t-butilo es odorífero y un intenso lacrimógeno. El cloruro de benzohidroximoílo puede no ser térmicamente estable, por tanto manipularlo con una espátula no metálica, protegerlo de la luz fuerte y almacenarlo en el congelador. McGillivray, G.; ten Krooden, E.; S. Africa J. Chem. 986, 39(1).

Se prepararon los siguientes cloruros de hidroximoílo adicionales mediante el método B:

Cloruro de 3,5-dimetilbenzohidroximoílo: un sólido blanco tras la cristalización en pentano frío, pentano/ $\text{CHCl}_3$  o heptano.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,4 (a, 1H), 7,45 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 2,35 (s, 6H).

Cloruro de 4-fenilbenzohidroximoílo: rendimiento del 87%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,95 (d, 2H), 7,65 (m, 4H), 7,37-7,5 (m, 3H), 1,65 (s a, 1H).

Cloruro de 4-clorobenzohidroximoílo: sólido floculento, rendimiento del 100%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,8 (d, 2H), 7,4 (d, 2H), 1,7 (s a, 1H).  $R_f$  (hexano:acetato de etilo 1:1) = 0,63.

Cloruro de 4-trifluorometoxibenzohidroximoílo: rendimiento del 98%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,95 (s, 1H, N-OH), 7,3 (d, 2H).

Cloruro de 3-trifluorometilbenzohidroximoílo: rendimiento del 99%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,12 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,72 (d, 1H), 7,55 (t, 1H).

Cloruro de 2-metoxibenzohidroximoílo: rendimiento del 99%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 9,6 (s, 1H), 7,6 (d, 1H), 7,34 (t, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,9 (s, 3H).  $R_f$  (hexano:acetato de etilo 1:1) = 0,5.

Cloruro de 2,3-[1,3]dioxol-benzohidroximoílo.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,95 (s a, 1H, N-OH), 7,4 (d, 1H),



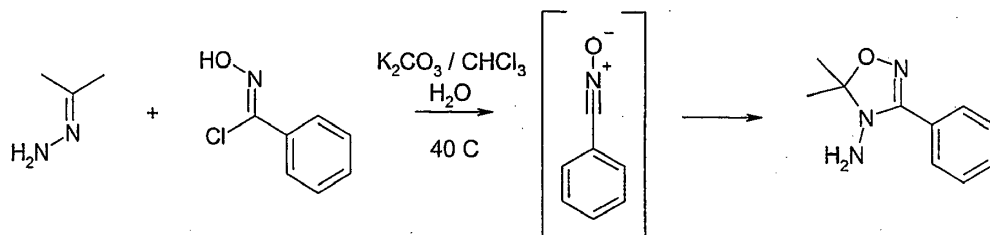
7,3 (s, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,05 (s, 2H).

Cloruro de 2,4-dimetoxibenzohidroximoilo.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,55 (d, 1H), 6,5 (d, 1H), 6,45 (s, 1H), 3,96 (s, 3H).

5 Cloruro de 3-nitrobenzohidroximoilo: rendimiento del 100%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,71 (s, 1H, N-OH), 8,45 (s, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,19 (d, 1H), 7,65 (t, 1H). Rf (hexano:acetato de etilo 1:1) = 0,5.

### 1.12 Preparación de aril-[1,2,4]oxadiazol-4-ilaminas

10 Método A-1



15 Se mezclaron una disolución de isopropilideno-hidrazina (0,59 g, 8 mmol) en 15 ml de cloroformo y una disolución acuosa de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,5 g en 3 ml de agua) y se enfrió en un matraz de fondo redondo de 50 ml enfriado con hielo y agua. Se añadió lentamente una disolución de cloruro de benzohidroximoilo (0,51 g, 3,2 mmol) en 10 ml de cloroformo con agitación magnética vigorosa. Se reemplazó el baño de hielo por un baño de agua a 40°C y se agitó la mezcla a 40°C durante 2 horas y entonces se monitorizó mediante CCF (acetato de etilo:hexanos 1:1). Cuando la  
20 progresión de la reacción comenzó a decelerar significativamente, se sometió la mezcla a tratamiento final mediante la adición de 10 ml de agua y 60 ml de cloroformo o cloruro de metileno. Se retiró la fase orgánica en un embudo de decantación, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio para producir un semisólido. Se trituró el producto en bruto con éter al 2% en hexanos (30 ml), mediante agitación magnética en un matraz de fondo redondo o manipulando el material con una espátula. La filtración y el secado al aire proporcionaron 5,5-  
25 dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina con un rendimiento de aprox. el 40%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,77 (m, 2H), 7,48 (m, 3H), 3,4 (a), 1,55 (s, 6H).

Se prepararon las siguientes oxadiazolinas adicionales mediante el método A-1:

30 3-(4-Cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: rendimiento del 52%, trituración en pentano.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,72 (d, 2H), 7,42 (d, 2H), 3,5 (s, 1H), 1,6 (s, 1H), 1,54 (s, 6H). Rf= 0,46 (acetato de etilo:hexano 1:1).

35 3-Benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: rendimiento del 35%, trituración en éter al 10% en hexano o cromatografía en gel de sílice con gradiente de acetato de etilo/hexano.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,22 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 6,0 (s, 2H), 3,5 (s a, 2H), 1,52 (s, 6H).

40 3-(2-Metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,5 (d, 2H), 7,05 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,7 (s a, 2H), 1,54 (s, 6H). Cromatografía en gel de sílice con gradiente de acetato de etilo/hexano, Rf= 0,25 (acetato de etilo:hexano 1:1).

3-(3-Trifluorometil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: trituración en heptano, rendimiento del 47%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,1 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,55 (t, 1H), 3,5 (s a, 2H), 1,57 (s, 6H).

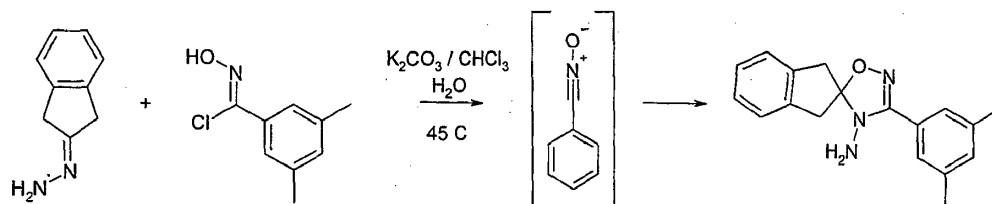
45 3-(4-Trifluorometoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: trituración en heptano, rendimiento del 28%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,85 (d, 2H), 7,3 (d, 2H), 3,55 (s a, 2H), 1,55 (s, 6H). Cromatografía en gel de sílice con gradiente de acetato de etilo/hexano.

50 3-Bifenil-4-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: trituración en pentano, rendimiento del 49%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,85 (d, 2H), 7,65 (m, 4H), 7,5 (t, 2H), 3,6 (s a), 1,57 (s, 6H).

3-(2,4-Dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: cromatografía en gel de sílice con gradiente de acetato de etilo/hexano, trituración en éter:hexano 2:3, Rf=0,14 (acetato de etilo:hexano 1:1).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,48 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,65 (s a, 2H), 1,52 (s, 6H).

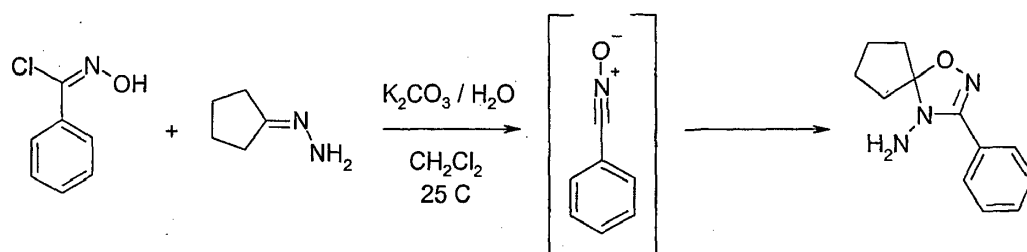
55 3-(2,4-Dicloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,5 (s, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 3,53 (s, 2H), 1,57 (s, 6H).

## Método A-2



- 5 Se mezclaron una mezcla de indan-2-iliden-hidrazina (250 mg) y clorooxima de 3,5-dimetil-benzaldehído (314 mg) con  $\text{CHCl}_3$  (10 ml) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  acuoso (6 ml, 0,167 g/ml) a  $45^\circ\text{C}$  durante un periodo de 4 horas. Se diluyeron las fases de la mezcla de reacción y se repartieron, y se secó la fase orgánica y se evaporó el disolvente a vacío. La cromatografía en columna del producto en bruto sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 10% en hexano produjo 0,52 g de 3-(3,5-dimetil-fenil)-7,8-benzo-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4,4]non-2-en-4-ilamina. Se cristalizó una muestra analítica en  $\text{CHCl}_3$ /pentano.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 7,37 (s, 2H), 7,22 (m, 4H), 7,11 (s, 1H), 3,6 (d, 2H), 3,57 (s a, 2H), 3,32 (d, 2H), 2,36 (s, 6H).

## Método B



- 15 Se cargó un matraz de fondo redondo con una disolución de 20 g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en 50 ml de agua y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió ciclopentiliden-hidrazina (7,9 g, 80 mmol) en 25 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , seguido por una adición gota a gota de cloruro de benzohidroximoílo (5 g, 0,032 mmol) en 25 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a lo largo de un periodo de 15 minutos.
- 20 Se agitó la mezcla durante varios días, y se permitió que se calentara hasta temperatura ambiente. Se añadieron agua (50 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) y se separaron las fases. Se lavó dos veces la fase orgánica con 50 ml de agua, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se filtró. Se eliminó el disolvente a vacío, dejando 9 g de un sólido ceroso. La cristalización en acetato de etilo/hexano proporcionó 3,5 g (50%) de 3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4,4]non-2-en-4-ilamina tras secar.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,72 ((m, 2H), 7,46 (m, 3H), 3,54 (s, 2H), 2,1 (m, 2H), 2,0 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,8 (m., 2H).

Se prepararon las siguientes oxadiazolinas adicionales mediante el método B:

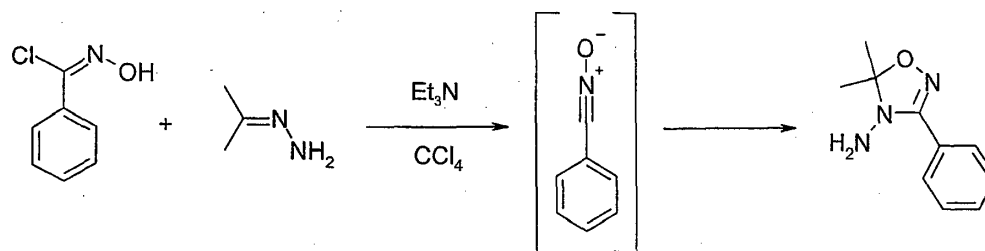
- 30 3-(3,5-Dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: cristales en hexanos, rendimiento del 9%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,31 ((s, 2H), 7,1 (s, 1H), 3,5 (s, 2H), 2,35 (s, 6H), 1,85 (m, 2H), 1,48 (s, 3H), 1,03 (t, 3H).

- 35 3-(3,5-Dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4,4]non-2-en-4-ilamina: cristales en acetato de etilo, rendimiento del 20%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,32 ((s, 2H), 7,1 (s, 1H), 3,55 (s, 2H), 2,35 (s, 6H), 2,1 (m, 2H), 2,0 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,8 (m., 2H).

- 3-(3,5-Dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4,5]dec-2-en-4-ilamina: cristales.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,34 (s, 2H), 7,15 (s, 1H), 4,0 (m, 2H), 3,87 (dt, 2H), 3,55 (s a, 2H), 2,36 (s, 6H), 2,1 (m, 2H), 1,9 (d a, 2H).

- 40 3-Fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4,5]dec-2-en-4-ilamina: cristales en  $\text{CHCl}_3$ /hexano tras cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo al 0-15% en hexanos), p.f.  $168-9^\circ\text{C}$ ,  $R_f=0,5$  (acetato de etilo:hexanos 1:1).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,86 (m, 2H), 7,157 (m, 3H), 3,92 (m, 2H), 3,87 (dt, 2H), 3,61 (s a, 2H), 2,1 (m, 2H), 1,85 (d a, 2H).

## Método C



5 Se añadió gota a gota una disolución de cloruro de benzohidroximoilo en  $\text{CCl}_4$  a lo largo de 15 minutos a una disolución de isopropilideno-hidrazina (3,6 g, 50 mmoles) y trietilamina (3,0 g, 50 mmoles) en 10 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Se continuó la agitación durante 2 horas mientras que se permitía que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente. La CCF indicó que la reacción era completa. Se lavó la mezcla de reacción tres veces con agua, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se filtró. Se eliminó el disolvente a vacío y se cristalizó el producto, 5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina, en  $\text{CHCl}_3$ /hexano, dando como resultado 1,2 g con un rendimiento del 20,9%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,79 (m, 2H), 7,5 (m, 3H), 3,55 (s, 2H), 1,55 (s, 6H). El uso de cloruro de hidroximoilo de alta calidad y la adición a  $0^\circ\text{C}$  dio como resultado rendimientos mejorados (40%).

Se preparó la siguiente oxadiazolina adicional mediante el método C:

15 3-(3,5-Dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina: purificación mediante cromatografía en gel de sílice con gradiente de acetato de etilo/hexano ( $R_f=0,5$  hexano:acetato de etilo 2:1), o cristalización en éter/heptano.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,32 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 3,52 (s, 2H), 2,35 (s, 6H), 1,53 (s, 6H).

Tabla 1: Optimización de la cicloadición [3+2] de N-óxido benzonitrilo e isopropilideno-hidrazina.

Método	Disolvente	Base	Temp.	Tiempo	Rendimiento	Comentarios
A	$\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$40-50^\circ\text{C}$	2 h	40%	más rápido, conveniente
B	$\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$0-40^\circ\text{C}$	6 h	45%	producto más fácil de purificar
C	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{Et}_3\text{N}$	$0-25^\circ\text{C}$	3 h	20-24%	
D	$\text{CHCl}_3$	$\text{Et}_3\text{N}$	$0-25^\circ\text{C}$	durante la noche	40%	aparecen impurezas tras 3 horas
E	isopropanol	$\text{Et}_3\text{N}$	$25^\circ\text{C}$	2 h	18%	
F	$\text{CHCl}_3$	piridina	$25^\circ\text{C}$	3 h	7%	
G	tolueno/ $\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$45^\circ\text{C}$	4 h	27%	

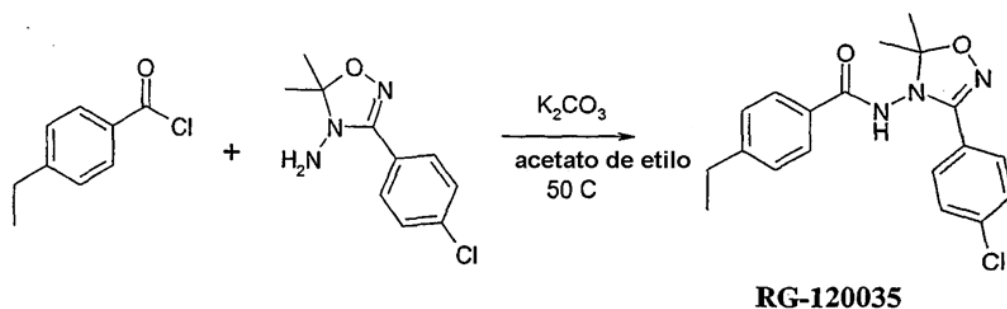
Notas:

- 20 1. Se añadió disolución de clorooxima/ $\text{CHCl}_3$  a la mezcla de hidrazona y base, a menos que se indique lo contrario.  
 2. Reacciones realizadas con hidrazona de acetona de una pureza de aproximadamente el 80% (el resto comprende azina).  
 3. Producto purificado mediante trituración con éter al 2%/hexanos, pero también puede someterse a cromatografía sobre gel de sílice usando EtOAc al 20% en hexanos,  $R_f = 0,4$  en etilacetato:hexanos 1:1.

25

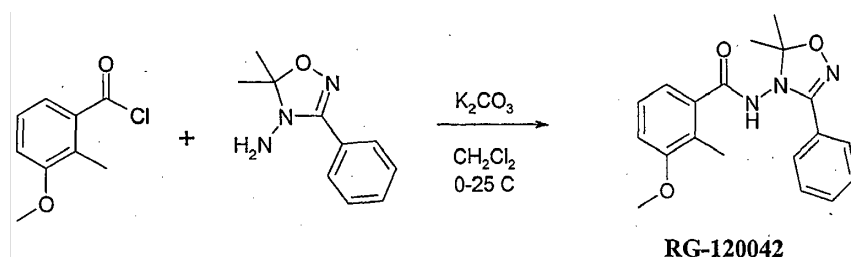
### 1.13 Preparación de N-aróil-4-amino- $\Delta^2$ -1,2,4-oxadiazolinas

Método A:



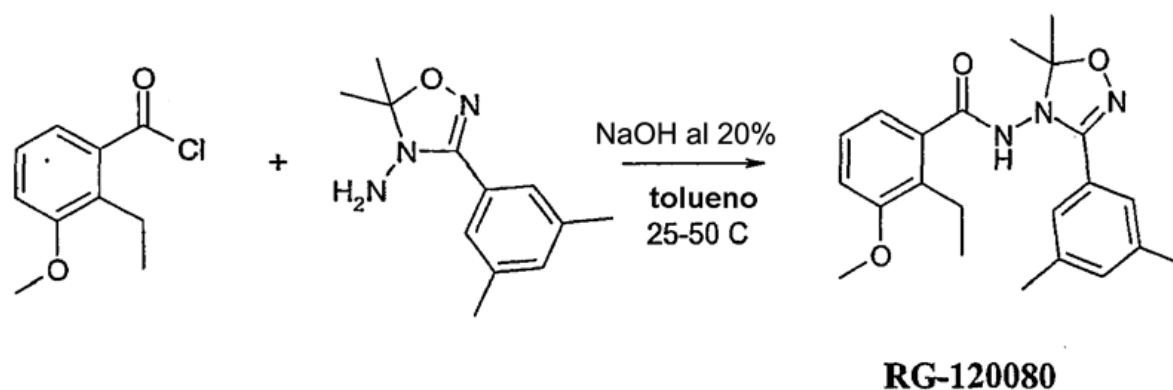
- 5 Se disolvieron cloruro de 4-etilbenzoilo (78,4 mg, 0,466 mmol) y 3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina (100 mg, 0,444 mmol) en 4 ml de acetato de etilo en un vial de 20 ml. Con agitación magnética, se añadió una disolución acuosa de  $K_2CO_3$  (2 ml, 0,166 g/ml), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18-64 horas. Se transfirió la mezcla de reacción a un embudo de decantación. Se retiró la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad a vacío a temperatura ambiente y entonces a 50°C durante 30 minutos. Se trituró el residuo con una disolución de éter al 10% en hexano (7 ml) durante 3-8 horas con agitación magnética, y se retiró el precipitado floculento resultante y se trituró de nuevo con éter al 5% en hexano. El secado en horno de vacío a 50°C durante 30 minutos produjo N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-etil-benzamida con una pureza del 90%.  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,72 (d, 2H), 7,6 (d, 2H), 7,35 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,63 (s, 6H), 1,22 (t, 3H). Se purificaron algunos análogos mediante trituración con pentano, hexano o heptano, o alternativamente, mediante cromatografía en columna usando un gradiente de acetato de etilo/hexano.
- 15 Se prepararon la mayoría de las N-aroil-4-amino- $\Delta^2$ -1,2,4-oxadiazolinas mediante este método.

Método B:



- 20 A una disolución de 5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina (0,5 g, 2,6 mmol) en 5 ml de  $CH_2Cl_2$ , se le añadió  $K_2CO_3$  acuoso (0,54 g, 3,9 mmol en 5 ml de agua). Se enfrió la mezcla en un baño de hielo, y se añadió una disolución de cloruro de 2-metil-3-metoxibenzoilo en 5 ml de  $CH_2Cl_2$  a la mezcla de reacción. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante varios días. Se añadieron agua y  $CH_2Cl_2$ , se separaron las fases y se lavó la fase orgánica dos veces con agua, una vez con salmuera y se secó sobre  $MgSO_4$ . Se filtró la disolución y se eliminó el disolvente a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice proporcionó N-(5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-3-metoxi-2-metil-benzamida de alta pureza, pero con bajo rendimiento.  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,75 (s, 1H[NH]), 7,70 (d, 2H), 7,4 (m, 3H), 7,1 (t, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,6 (d, 1H), 3,78 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,61 (s, 6H), p.f. 141-142°C. Un subproducto principal fue anhídrido de 2-metil-3-metoxibenzoilo.

Método C-1:

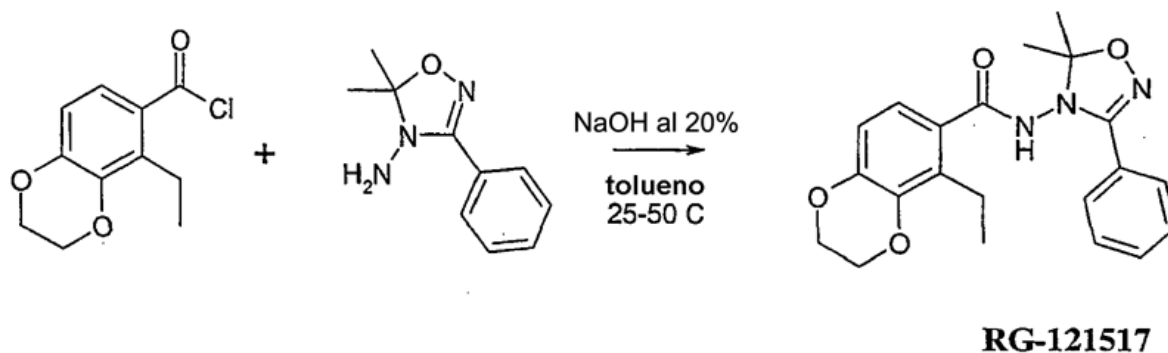


- 35 Se añadió una disolución acuosa al 20% de NaOH (275 mg, 1,37 mmol) a una disolución de 3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-

dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina (200 mg, 0,91 mmol) en 2 ml de tolueno. Se añadió entonces cloruro de 2-etil-3-metoxibenzoilo (199 mg, 1 mmol) a la mezcla. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces se calentó a 50°C durante 1 hora. La CCF indicó 3 puntos. Se añadieron entonces agua, NaOH diluido y  $\text{CHCl}_3$  a la mezcla de reacción. Se separó la fase orgánica, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se eliminó el disolvente a vacío.

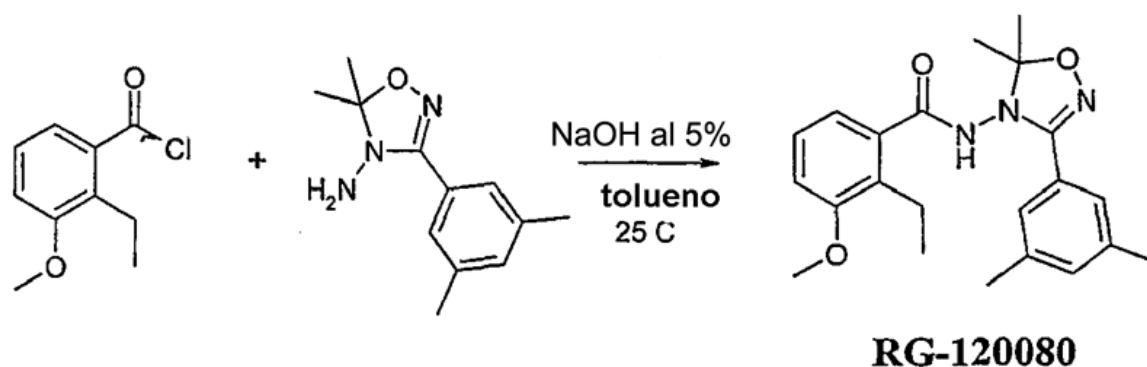
- 5 Se trituró el residuo con éter al 10% en hexano. La filtración y el secado al aire del sólido resultante proporcionaron 100 mg (rendimiento del 29%) de N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,42 (s, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,11 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,67 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,55 (q, 2H), 2,34 (s, 6H), 1,7 (s a, 6H), 1,05 (t, 3H), Rf=0,5 (acetato de etilo:hexano 1:1).

- 10 Método C-2:



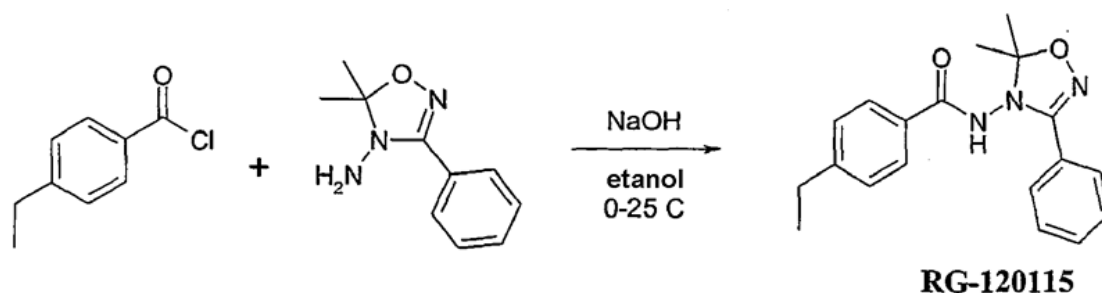
- 15 Se añadieron aproximadamente 18,5 mg (0,42 mmol) de cloruro de 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6-carbonilo a 103 mg (0,5 mmol) de 5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina en 2 ml de tolueno en un vial de 20 ml. Se añadieron entonces 400 mg de una disolución acuosa de NaOH al 20%. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 horas, y entonces se calentó cuidadosamente a 50°C durante 1 hora. Se transfirió la mezcla de reacción a un embudo de decantación con  $\text{CHCl}_3$  y se extrajo con  $\text{NaHCO}_3$  diluido. Se secó el extracto de  $\text{CHCl}_3$  y se evaporó hasta sequedad. Se trituró el residuo con pentano para eliminar el tolueno, y se trituró entonces con éter al 5%-hexano. La  $^1\text{H-RMN}$  indicó el producto deseado, ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6-carboxílico (5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-amida, con un nivel de pureza de aproximadamente el 60%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,42 (s, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,11 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,67 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,55 (q, 2H), 2,34 (s, 6H), 1,7 (s a, 6H), 1,05 (t, 3H), Rf=0,5 (acetato de etilo:hexano 1:1).

- 25 Método D:



- 30 Se añadió una disolución acuosa al 5% de NaOH (4 ml) a una disolución de 3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina (90 mg) en 6 ml de tolueno. Se añadió entonces cloruro de 2-etil-3-metoxibenzoilo (140 mg) a la mezcla. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 horas. Se añadieron agua y  $\text{CHCl}_3$ . Se separó la fase orgánica, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se eliminó el disolvente a vacío. Se trituró el residuo con 100 ml de éter al 10% en hexano mediante agitación magnética de la mezcla en un recipiente durante 1 hora. La filtración y el secado al aire del sólido resultante proporcionaron 62 mg (rendimiento del 40%) de N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,42 (s, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,11 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,67 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,55 (q, 2H), 2,34 (s, 6H), 1,7 (s a, 6H), 1,05 (t, 3H), Rf=0,5 (acetato de etilo:hexano 1:1). El filtrado contenía una cantidad adicional del producto deseado.

- 40 Método E:



A una disolución con agitación enfriada con hielo de la 5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina (0,5 g, 2,6 mmol) en 6 ml de etanol, se le añadió un exceso de cloruro de 4-etilbenzoílo (4 ml), seguido por NaOH acuoso (al 8%, 7 ml). Se agitó la disolución durante la noche y se permitió que se calentara hasta temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se secaron los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> combinados sobre MgSO<sub>4</sub> y se eliminó el disolvente a vacío. Se aisló el producto N-(5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-3-etil-benzamida mediante cromatografía en gel de sílice. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,8 (m, 3H), 7,6 (d, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,65 (s, 6H), 1,2 (t, 3H).

Tabla 2: Optimización de la formación de amida entre cloruro de 2-etil-3-metoxibenzoílo y 3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina.

**RG-120080**

Tiempo	Temp.	Base	Rendimiento
4-5 h	25°C	NaOH al 20%	24%
2 días	25°C	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 25%	20%
2 días	25°C	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 50%	8%
20-30 h	25°C	NaOH al 5%	40%
20+h	25°C	NaOH al 3%	>60%

1. La purificación mediante trituración con éter al 5-10%-hexanos dio producto puro al 90-98%. Un contenido en éter superior reduce el rendimiento pero mejora la pureza.

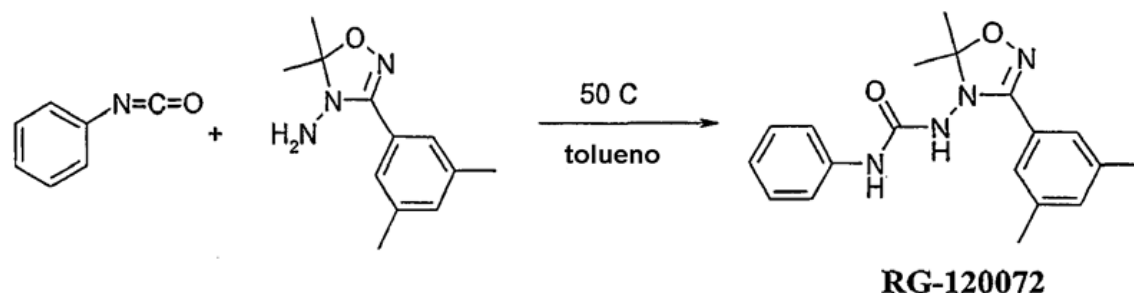
2. En experimentos separados con 3-NO<sub>2</sub>/oxadiazolina, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dio al menos rendimientos del 50%.

3. También se encontró que K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/EtOH era aceptable. (1 eq. de oxadiazolina, 2 eq. de ROCl, 2,5 eq. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

4. NaH/THF a 25°C o NaH/THF/DMF a 25-75°C para la oxadiazolina no sustituida y cloruro de 4-etilbenzoílo dan como resultado sólo una traza de producto como máximo. El calentamiento de los dos reactivos puros a 150°C durante 2 horas da como resultado un alquitrán.

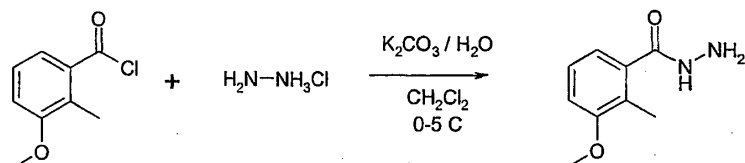
5. KOH en polvo en THF para la oxadiazolina no sustituida y cloruro de 2-metil-3-metoxibenzoílo da como resultado sólo una traza de producto.

1.14 Preparación de aril-[1,2,4]oxadiazol-4-il-ureas a partir de la reacción de aril-[1,2,4]oxadiazol-4-ilaminas con isocinatos

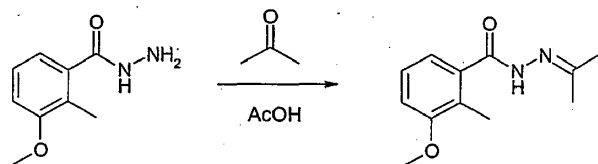


Se disolvieron 3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-ilamina (219 mg, 1 mmol) e isocianato de fenilo (131 mg, 1,1 mmol) en 1 ml de tolueno y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La CCF indicó una reacción parcial; por tanto se calentó la mezcla a 50°C durante 2 horas. Se retiró el disolvente a vacío y se agitó el residuo en 25 ml de éter al 10% en hexano. Se recuperó la 1-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea como un precipitado blanco (106 mg, rendimiento del 31%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,78 (s, 1H [NH]), 7,5 (d, 2H), 7,4 (t, 2H), 7,3 (s, 2H), 7,2 (t, 1H), 7,15 (s, 1H), 6,4 (s, 1H [NH]), 2,28 (s, 6H), 1,73 (s, 3H), 1,54 (s, 3H).

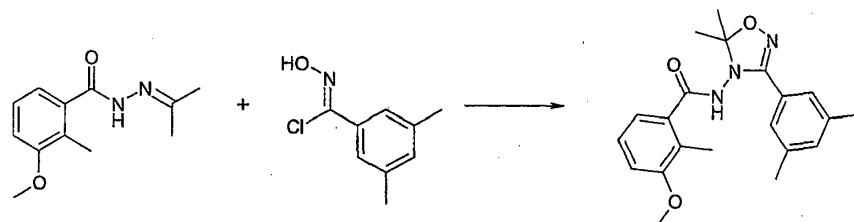
10 1.15 Preparación de N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida (RG-120045)



15 A un matraz de 3 bocas de 500 ml equipado con un agitador magnético y enfriado en un baño de hielo y agua, se le añadieron 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (pueden usarse cantidades significativamente mayores) y 22,5 g (450 mmol) de hidrato de hidrazina, seguido por una disolución de 31,5 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> disuelto en 60 ml de agua. A lo largo de un periodo de 30 minutos, se añadió una disolución de 31 g (168 mmol) de cloruro de 2-metil,3-metoxibenzoílo disuelto en 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mientras que se mantenía la temperatura por debajo de 5°C. Se dejó que se calentara la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y entonces se agitó durante 2 horas adicionales. Se añadieron agua (100 ml) y cloroformo (150 ml), se agitó la mezcla en un embudo de decantación y se separó por filtración un precipitado inorgánico. Se secó la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> y se retiró el disolvente a vacío para dejar 30 g de producto de hidrazida en bruto. Se suspendió este material con heptano durante 4 horas (la suspensión en pentano proporciona resultados comparables). La filtración y evaporación del disolvente residual produjeron 13 g de hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico, que contenía aproximadamente el 10% de material diacilado. Pudo purificarse adicionalmente el producto mediante precipitación con CHCl<sub>3</sub>/hexano caliente. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,2 (t, 1H), 6,95 (s a, 1H), 6,9 (m, 2H), 4,15 (s a, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,27 (s, 3H).



30 Se disolvió hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (1,1 g) en 10 ml de acetona en un matraz de fondo redondo de 25 ml. Se añadieron 2 gotas de ácido acético y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se colocó el recipiente en una nevera durante 1 hora y se separó por filtración el producto de isopropilidenedhidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico y se secó. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,2 (t, 1H), 7,02 (d, 1H), 6,94 (d, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 2,18 (s, 3H, bencílico), 1,88 (s, 3H).



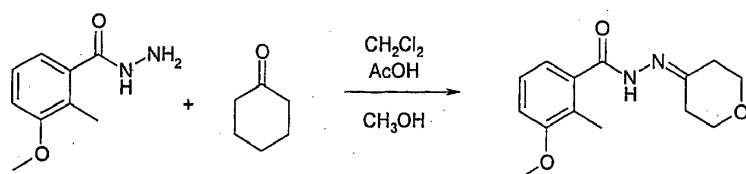
40 Se añadieron isopropilidenedhidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (1,71 g, 7,77 mmol) y clorooxima de 3,5-dimetil-benzaldehído (2,29 g, 12,4 mmol), ambas como disoluciones en CHCl<sub>3</sub> (volumen total de 40 ml), a un matraz de fondo redondo de 250 ml equipado con un agitador magnético. Se añadió una disolución acuosa de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 g en 30 ml), se colocó el recipiente en un baño de agua a 50°C y se agitó la reacción vigorosamente durante 24 horas. Se monitorizó la reacción mediante <sup>1</sup>H-RMN. Se añadieron cloroformo (100 ml) y agua (50 ml), y se agitó la mezcla en un embudo de decantación. Se separó la fase orgánica, se secó y se eliminó el disolvente a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo al 10-30% en hexano produjo 1,07 g de N-[3-(3,5-dimetilfenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida (32%). Se obtuvo una muestra analítica mediante cristalización en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano bajo refrigeración. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,4 (s, 2H), 7,1 (t, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,30 (s, 6H), 2,07 (s, 3H), 1,65 (s, 6H).

Tabla 3: Resumen de las condiciones de reacción exploradas.

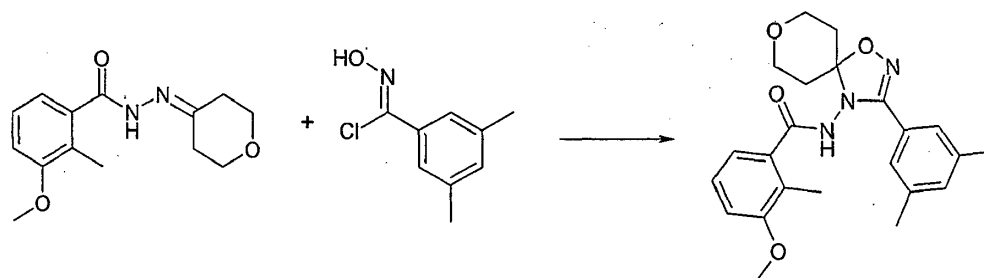
Base / Disolvente	Tiempo/temp.	Hidrazona:cloruro de oxima	Rendimiento (por $^1\text{H-RMN}$ )
1,25 eq. de $\text{Et}_3\text{N}$ , $\text{CHCl}_3$	De noche, $25^\circ\text{C}$	1:1	5-10%
1,25 eq. de $\text{Et}_3\text{N}$ , $\text{CHCl}_3$	4 h, $45^\circ\text{C}$	1:2	20-30%
$\text{K}_2\text{CO}_3$ ac. al 17%/ $\text{CHCl}_3$	3 h, $45^\circ\text{C}$	1:1	20-25%
$\text{K}_2\text{CO}_3$ ac. al 17%/ $\text{CHCl}_3$	5 h, $45^\circ\text{C}$	1:1	25-30%
1,8 eq. de $\text{Et}_3\text{N}$ , $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	2 h, reflujo	1:1,3	15-20%
$\text{K}_2\text{CO}_3$ (polvo)/ $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	2 h, $60^\circ\text{C}$	1:1,7	25-30%
$\text{K}_2\text{CO}_3$ (polvo) + $\text{MgSO}_4$ (polvo)	4 h, reflujo	1:1,5	10%
$\text{K}_2\text{CO}_3$ ac. al 17%/ $\text{CHCl}_3$	24 h, $60^\circ\text{C}$	1:3	32% (aislado)

En general,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base dio productos más limpios en comparación con el  $\text{Et}_3\text{N}$ .

5 1.16 Preparación de N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4,5]dec-2-en-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida (RG-120086).



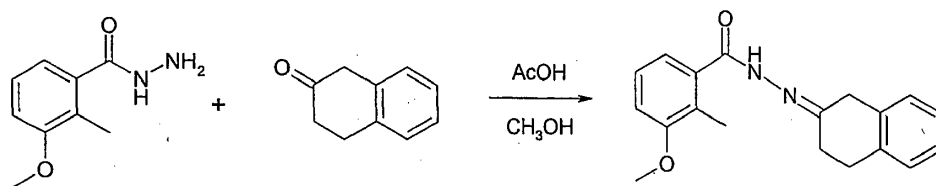
- 10 Se suspendió hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (4,14 g, 23 mmol) en una mezcla de 80 ml de éter, 40 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 2 gotas de ácido acético. Se añadieron una disolución de tetrahidro-piran-4-ona (2,3 g, 23 mmol) en 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 2-3 ml de metanol, y se sometió a reflujo la mezcla durante 10 minutos. Se dejó enfriar la mezcla de reacción y se concentró hasta aproximadamente 80 ml. Se añadió pentano (100 ml), dando como resultado la formación de un precipitado. Se enfrió la suspensión en un congelador y se filtró para producir 5,04 g de ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (tetrahidro-piran-4-iliden)-hidrazida como un material semi-cristalino, floculento, de color tostado.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,2 (t, 1H), 6,98 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 3,9 (t, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,8 (t, 2H), 2,65 (t, 2H), 2,42 (t, 2H), 2,35 (s, 3);  $R_f=0,15$  (acetato de etilo:hexano 3:1).
- 15



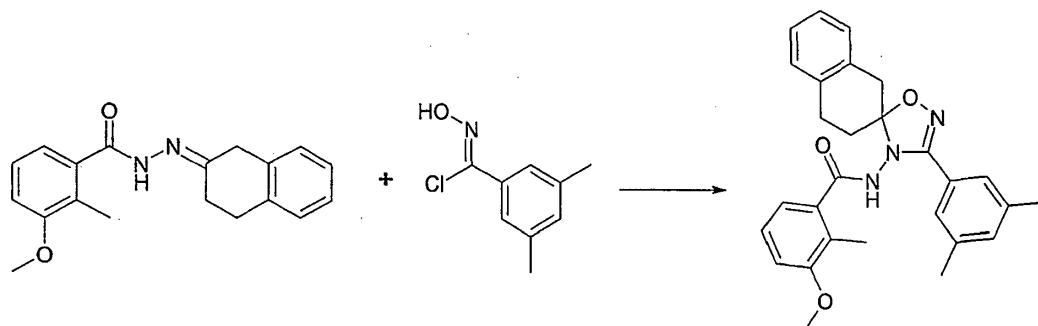
- 20 Se disolvió clorooxima de 3,5-dimetil-benzaldehído (1,84 g, 4 mmol) en 30 ml de  $\text{CHCl}_3$  en un matraz de fondo redondo. Se añadió una disolución acuosa de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (25 ml, 0,166 g/ml), seguido por 1,05 g de (tetrahidro-piran-4-iliden)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico. Se agitó la reacción durante la noche a  $55-60^\circ\text{C}$ . Se añadieron agua y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml), y se agitó la mezcla en un embudo de decantación. Se separó la fase acuosa y se extrajo una vez con  $\text{CHCl}_3$  (25 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron una vez con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  diluido y se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se eliminó el disolvente a vacío para producir 2,5 g de producto en bruto. Se trituró este material dos veces con éter al 10% en hexano y entonces una vez con éter al 25% en hexano. Se recogieron los sólidos y se filtraron, produciendo 720 mg de N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4,5]dec-2-en-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida al 80% de pureza y con un rendimiento del 49%.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,5 (s, 1H [NH]), 7,4 (s, 2H), 7,1 (m, 1H), 7,1 (s, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,9 (m, 4H), 3,8 (s, 3H), 2,4 (m, 4H), 2,35 (s, 6H), 2,05 (s, 3H).
- 25
- 30

1.17 Preparación de N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4,5]-7,8-benzo-dec-2-en-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida (RG-120037)





5 Se mezclaron hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (1,0 g) y  $\beta$ -tetralona (0,9 g) en 4 ml de metanol con 1 gota de ácido acético a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron aproximadamente 10 ml de éter y se refrigeró la mezcla. Se formaron cristales de ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (3,4-dihidro-1H-naftalen-2-iliden)-hidrazida, que se recogieron por filtración (0,85 g).  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 6,8-7,3 (m, 4H), 3,75+3,8 (2 s, 3H), 3,45+3,7 (2 s, 2H), 2,85 (t, 2H), 2,4 (t, 2H), 2,27+2,25 (2 s, 3H); confórmers múltiples;  $R_f=0,56$  (acetato de etilo:hexano 3:1); p.f.=138°C; p.f. de la hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico = 113-116°C.



10

**RG-120037**

15 Se mezcló (3,4-dihidro-1H-naftalen-2-iliden)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (1,25 g) con clorooxima de 3,5-dimetil-benzaldehído (1,68 g) y 3,1 g de trietilamina en 5 ml de DMF en una matraz de fondo redondo, provocando que la mezcla de reacción se volviera de color rojo inmediatamente. Se añadió agua a la mezcla de  
 20 reacción y se extrajo con éter para producir 2,05 g de producto en bruto, que se sometió a cromatografía entonces dos veces sobre alúmina usando un gradiente de hexano/acetato de etilo/metanol. El producto deseado, N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4,5]-7,8-benzo-dec-2-en-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida, eluyó con composiciones de disolvente que oscilaban entre acetato de etilo:hexano 60:40 y acetato de etilo:metanol 97:3.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,1 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 7,03 (m, 2H), 7,0 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 6,75 (m, 1H), 4,8 (a, 1H [NH]), 3,71 (s, 3H), 2,8 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,22 (m, 4H), 2,2 (s, 6H), 2,1+2,05 (2 s, 3H). Una reacción análoga en  $\text{CHCl}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$  acuoso a 60°C durante la noche o en acetonitrilo con base de Koenig's a reflujo dio poco o nada del producto deseado.

Tabla 4: Caracterización física de compuestos

Compuesto	Frecuencia de RMN	Disolvente	R <sup>1</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>1</sup> + R <sup>4</sup>	R <sup>2</sup> + R <sup>3</sup>	NH
RG-120111	300 MHz	$\text{CDCl}_3$	7,95 (d, 2H), 7,65 (m, 1H), 7,55 (m, 2H)	7,35 (s, 2H), 7,03 (s, 1H), 2,26 (s, 6H)		1,62 (s, 6H)	9,15 (s, 1H)
RG-120056	300 MHz	$\text{CDCl}_3$	6,95 (m, 1H), 7,3 (s, 3H), 2,38 (s, 3H)	7,35 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,29 (s, 6H)		1,56 (s, 6H)	7,7 (s, 1H), 6,0 (s, 1H)
RG-120072	300 MHz	$\text{CDCl}_3$	7,5 (d, 2H), 7,4 (t, 2H), 7,2 (t, 1H)	7,3 (s, 2H), 7,15 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,73 (s, 3H), 1,54 (s, 3H)	7,78 (s, 1H), 6,4 (s, 1H)
RG-120075	300 MHz	$\text{CDCl}_3$	8,1 (d, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,1 (m, 1H), 6,95 (d, 1H), 3,83 (s, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		1,56 (s, 6H)	9,0 (s, 1H) H
RG-120091	300 MHz	$\text{CDCl}_3$	8,4 (d, 1H), 8,0 (d, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,65 (t, 1H)	7,4 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,29 (s, 6H)		1,57 (s, 6H)	8,45 (s, 1H)

ES 2 445 822 T3

RG-120098	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	8,1 (m, 1H), 7,6 (m, 2H), 7,1 (m, 1H)	7,45 (s, 2H), 7,15 (s, 1H), 2,37 (s, 6H)		1,56 (s, 6H)	
RG-120077	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,50 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,35 (m, 1H), 7,05 (s, 1H), 2,36 (s, 3H)	7,41 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,57 (s, 6H)	
RG-120060	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,25 (t, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,3 (s, 6H)		1,56 (s, 6H)	
RG-120024	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,56 (s, 6H)	
RG-120080	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,11 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,67 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,55 (q, 2H), 1,05 (t, 3H)	7,42 (s, 2H), 7,11 (s, 1H), 2,34 (s, 6H)		1,7 (s a, 6H)	
RG-120002.	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (s, 1H), 7,2-7,4 (m, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,29 (s, 6H)		1,57 (s, 6H)	
RG-120015	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (m, 2H), 7,5 (m, 1H), 7,4 (t, 2H)	8,07 (s, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,55 (m, 1H)		1,66 (s, 6H)	
RG-120148	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,68 (q, 2H), 1,21 (t, 3H), 1H,	8,1 (s, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,7 (d, 7,5 (d, 1H)		1,64 (s, 6H)	7,75 (a, 1H)
RG-120022	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,15 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,62 (d, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,50 (s a, 2H), 0,97 (t, 3H)	7,87 (d, 2H), 7,3 (d, 2H)		1,65 (sa, s, 6H)	7,20 (s, 1H)
RG-120094	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,42 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,55 (m, 1H)	7,85 (d, 2H), 7,22 (d, 2H)		1,62 (s, 6H)	
RG-120160	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,85 (m, 1H), 7,25 (m, 2H), 7,05 (m, 2H), 3,48 (s, 2H)	7,67 (d, 2H), 7,18 (d, 2H)		1,48 (s, 6H)	6,85 (s, 1H)
RG-120066	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,32 (m, 3H), 7,18 (m, 2H), 4,44 (s, 2H), 3,98 (s, 2H)	7,77 (d, 2H), 7,25 (d, 2H)		1,66 (s, 6H)	7,95 (s, 1H)
RG-120088	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3-7,4 (m, 4H), 6,15 (m, 1H), H), 4,6 (dd, 1H), 4,45 (dd, 1H)	7,2 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		1,56 (s, 6H)	5,95 (s, 1H)
RG-120029	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,25 (m, 4H), 7,05 (t, 1H), 4,52 (s, 2H)	7,75 (d, 2H), 6,78 (d, 2H)		1,55 (s, 6H)	7,9 (s, 1H)
RG-120109	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,95 (m, 1H), 7,8 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,47 (m, 2H)	7,85 (d, 2H), 7,21 (d, 2H)		1,66 (s, 6H)	
RG-120033	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,62 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,4 (t, 2H)	7,82 (d, 2H), 7,21 (d, 2H)		1,65 (s, 6H)	

ES 2 445 822 T3

RG-120055	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,8 (d, 2H), 7,21 (d, 2H)		1,61 (s, 6H)	7,65 (s, 1H)
RG-120147	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,57 (m, 3H), 7,42 (m, 2H)	7,52 (m, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,05 (t, 1H), 6,97 (d, 1H), 3,89 (s, 3H)		1,66 (s, 6H)	8,05 (s, 1H)
RG-120062	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>		7,5 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,07 (t, 1H), 7,02 (d, 1H), 3,95 (s, 3H)		1,62 (s, 6H)	8,55 (s a, 1H)
RG-120026	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,5 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,65 (q, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,6 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,05 (t, 1H), 7,0 (d, 1H), 3,91 (s, 3H)		1,65 (s, 6H)	8,05 (s, 1H)
RG-120070	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,45 (s, 1H), 7,2 (d, 1H), 6,5 (m, 1H)	8,07 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,55 (t, 1H)		1,65 (s, 6H)	7,85 (s, 1H)
RG-120093	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,2 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,47 (s a, 2H), 0,97 (t, 3H)	8,1 (s, 1H), 8,05 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,6 (t, 1H)		1,7 (s a, 6H)	
RG-120006	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 3H), 7,18 (m, 2H), 4,45 (s, 2H), 3,95 (s, 2H)	8,0 (s, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,57 (t, 1H)		1,57 (s, 6H)	
RG-120108	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,85 (m, 2H), 7,8 (s, 1H), 7,45 (m, 2H)	8,1 (s, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,55 (m, 1H)		1,57 (s, 6H)	
RG-120021	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 3H), 7,05 (m, 2H), 3,46 (s, 2H)	7,9 (s, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,5 (t, 1H)		1,48 (s a, 6H)	8,1 (s, 1H)
RG-120163	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,25 (d, 1H), 1,01 (t, 1H), 7,79 (d, 1H), 4,5 (s, 2H)	8,05 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,55 (t, 1H)		1,57 (s, 6H)	7,9 (s, 1H)
RG-120059	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>		8,1 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,57 (t, 1H)		1,57 (s, 6H)	3,55 (s a, 1H)
RG-120001	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,75 (m, 1H), 7,37 (m, 2H), 7,17 (m, 2H)	8,0 (s, 1H), 7,8 (m, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,47 (m, 1H)		1,71 (s, 3H), 1,53 (s, 3H)	
RG-120153	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,05 (q, 2H), 2,55 (a, 2H), 2,30 (m, 2H), 1,57 (s, 6H), 1,2 (t, 3H)	8,1 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,57 (t, 1H)			3,55 (s a, 1H)
RG-120018	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 3H), 7,2 (m, 2H), 4,4 (s, 2H), 3,95 (s, 2H)	7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 1H), 7,02 (t, 1H), 6,85 (d, 1H), 3,63 (s, 3H)		1,59 (s, 6H)	8,4 (s, 1H)
RG-120057	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,25 (m, 2H), 6,75 (m, 3H), 4,45 (s, 2H)	7,55 (d, 1H), 7,4 (t, 1H), 7,05 (m, 2H), 3,77 (s, 3H)		1,57 (s, 6H)	8,4 (s, 1H)
RG-120025	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,45 (m, 2H), 7,35 (m, 2H), 6,97 (m, 1H)	7,5 (m, 2H), 7,05 (m, 2H), 3,83 (s, 3H)		1,8 (s, 3H), 1,5 (s, 3H)	7,75 (s, 1H), 6,35 (s, 1H)

ES 2 445 822 T3

RG-120122	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,5 (d, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,2 (t, 1H)	7,75 (d, 2H), 7,3 (d, 2H)		1,59 (s, 6H)	6,55 (s, 1H)
RG-120047	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,9 (m, 2H), 7,6 (m, 1H), 7,5 (m, 2H)	7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,0 (m, 1H), 3,95 (s, 3H)		1,68 (s, 6H)	
RG-120144	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,1 (q, 1H), 2,2-2,7 (m, 4H), 1,2 (t, 3H)	7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,0 (m, 1H), 3,9 (s, 3H)		1,57 (s, 6H)	
RG-120127	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,25 (m, 2H), 7,05 (t, 1H), 6,8 (d, 2H), 4,52 (s, 2H)	7,3 (d, 1H), 7,2 (s, 1H), 6,8 (d, 1H), 6,0 (s, 2H)		1,53 (s, 6H)	7,9 (s, 1H)
RG-120017	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,5 (m, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,15 (m, 1H)	7,22 (s, 1H), 7,2 (d, 1H), 6,8 (d, 1H), 5,99 (s, 2H)		1,73 (s, 6H)	
RG-120140	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,85 (m, 3H), 7,45 (m, 2H)	7,3 (d, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,8 (d, 1H), 5,96 (s, 2H)		1,64 (s, 6H)	
RG-120083	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,1 (q, 2H), 2,6 (a, 2H), 2,3 (t, 2H), 1,25 (t, 3H)	7,2 (m, 2H), 6,8 (d, 1H), 6,02 (s, 2H)		1,56 (s, 6H)	
RG-120156	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,7 (m, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,45 (t, 2H)	7,3 (m, 2H), 6,8 (d, 1H), 5,98 (s, 2H)		1,62 (s, 6H)	
RG-120012	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (s, 1H), 7,5 (s, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,6 (d, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,05 (t, 1H), 6,95 (d, 1H), 3,95 (s, 3H)		1,65 (s, 6H)	8,35 (s, 1H)
RG-120061	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,3 (m, 2H), 6,8 (d, 1H), 5,98 (s, 2H)		1,62 (s, 6H)	
RG-120016	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,05 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,45 (d, 1H), 3,83 (s, 3H), 2,4 (q, 2H), 0,95 (t, 3H)	7,65 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,1 6,97 (d, 1H), 3,80 (s, 3H)		1,7 (s, 6H)	7,4 (s, 1H)
RG-120157	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,2 (m, 3H), 6,9 (m, 2H), 3,45 (s, 2H)	7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 1H), 7,0 (m, 1H), 6,8 (d, 1H), 3,57 (s, 3H)		1,5 (s, 6H)	
RG-120149	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,45 (s, 1H), 7,22 (m, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,3 (d, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,8 (d, 1H), 5,98 (s, 2H)		1,60 (s, 6H)	7,8 (s, 1H)
RG-120081	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3 (m, 3H), 7,15 (m, 2H), 3,5 (s, 2H)	7,1 (m, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,8 (d, 1H), 6,02 (s, 2H)		1,45 (s, 6H)	
RG-120145	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 3H), 7,18 (m, 2H), 4,45 (s, 2H), 4,0 (s, 2H)	7,25 (m, 2H), 6,81 (d, 1H), 6,01 (s, 2H)		1,55 (s, 6H)	
RG-120076	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,6 (d, 1H), 3,80 (s, 3H)	7,8 (m, 2H), 7,45 (m, 3H)		2,5 (s a, 2H), 1,9 (s a, 2H), 1,65 (s a, 3H), 1,15 (s a, 3H)	
RG-120100	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,45 (m, 1H), 7,2 (m, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,8 (m, 2H), 7,4 (m, 3H)		1,9 (m, 2H), 1,57 (s, 3H), 1,13 (t, 3H)	

## ES 2 445 822 T3

RG-120146	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	3,46 (s, 2H)		7,8-7,0 (m, 10H)	1,8 (m, 2H), 1,38 (s a, 3H), 1,0 (m, 3H)	6,85 (s, 1H)
RG-120154	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3 (m, 3H), 7,15 (m, 2H), 4,39 (s, 2H), 3,96 (s, 2H)	7,75 (d, 2H), 7,45 (m, 3H)		1,85 (m, 2H), 1,51 (s, 3H), 1,09 (t, 3H)	
RG-120103	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3 (m, 2H), 7,0 (t, 1H), 6,85 (d, 2H), 4,49 (s, 2H)	7,7 (d, 2H), 7,4 (m, 3H)		1,85 (q, 2H), 1,47 (s, 3H), 1,08 (t, 3H)	7,9 (s, 1H)
RG-120095	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>			7,1-7,9 (m, 10H)	1,97 (m, 2H), 1,52 (s, 3H), 1,15 (t, 3H)	6,3 (s a, 1H)
RG-120133	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>			7,8 (m, 5H), 7,4 (m, 5H)	1,95 (m, 2H), 1,61 (s, 3H), 1,15 (t, 3H)	
RG-120118	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 2H)	7,8 (d, 2H), 7,4 (m, 3H)		1,95 (m, 2H), 1,59 (s, 3H), 1,15 (t, 3H)	
RG-120137	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,8 (m, 2H), 7,45 (m, 3H)		1,95 (m, 2H), 1,15 (t, 3H), 1,58 (s, 3H)	
RG-120058	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,6 (d, 1H), 3,95 (s, 3H), 2,45 (q, 2H), 1,0 (t, 3H)	7,67 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,81 (s, 3H)		1,65 (s, 6H)	
RG-120102	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,45 (s, 1H), 7,15 (m, 1H), 6,55 (m, 1H)	7,6 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,5 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,91 (s, 3H)		1,62 (s, 6H)	8,1 (s, 1H)
RG-120078	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 2H), 7,1 (m, 3H), 3,44 (s, 2H)	7,5 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,3 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,62 (s, 3H)		1,49 (s, 6H)	
RG-120110	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,37 (m, 3H), 7,22 (m, 2H), 4,45 (s, 2H), 3,97 (s, 2H)	7,55 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 6,45 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,67 (s, 3H)		1,57 (s, 6H)	8,2 (s, 1H)
RG-120079	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,22 (m, 2H), 7,05 (t, 1H), 6,75 (d, 2H), 4,47 (s, 2H)	7,55 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,25 (s, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,77 (s, 3H)		1,56 (s, 6H)	
RG-120114	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,5 (m, 2H), 7,35 (m, 2H), 7,1 (t, 1H)	7,7 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 6,5 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,82 (s, 3H)		1,76 (s, 3H), 1,52 (s, 3H)	6,2 (s, 1H)
RG-120129	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,9 (m, 3H), 7,45 (m, 2H)	7,8 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 6,5 (s, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,90 (s, 3H)		1,6 (s, 6H)	
RG-120038	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,1 (m, 2H), 2,2-2,7 (m, 4H), 1,2 (t, 3H)	7,5 (s, 1H), 7,4 (s, 1H), 6,5 (s, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,90 (s, 3H)		1,54 (s, 6H)	
RG-120096	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (m, 2H), 7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 1H)	7,8 (s, 1H), 7,6 (s, 1H), 6,5 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,89 (s, 3H)		1,64 (s, 6H)	

## ES 2 445 822 T3

RG-120135	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,23 (t, 3H)	7,8 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 6,5 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,89 (s, 3H)		1,63 (s, 6H)	
RG-120023	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,15 (t, 1H), 7,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,6 (q, 2H), 1,05 (t, 1H)	7,37 (d, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,87 (d, 1H), 6,01 (s, 2H)		1,65 (s a, 6H)	
RG-120037	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,03 (m, 2H), 6,75 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,1, 2,05 (2s, 3H)	7,1 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,2 (s, 6H)		7,0 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 2,8 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,22 (m, 4H)	9,35 (s, 1H), 4,8 (a, 1H)
RG-120086	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (m, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,8 (s, 3H), 2,05 (s, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,35 (s, 6H)		3,9 (m, 4H), 2,4 (m, 4H)	8,5 (s, 1H)
RG-120051	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,5 (d, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,2 (m, 2H)	7,4 (d, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		2,0 (m, 2H), 1,75, 1,6, 1,5 (3s, 3H), 1,2, 1,1 (2d, 3H)	8,8 (d a, 1H), 6,25 (t a, 1H)
RG-120161	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,85 (m, 2H), 7,8 (s, 1H), 7,45 (m, 2H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		1,95 (m, 2H), 1,60 (s, 3H), 1,15 (t, 3H)	7,6 (s, 1H)
RG-120126	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,05 (q, 2H), 2,55 (a, 2H), 2,37 (m, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,3 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,31 (s, 6H)		1,85 (m, 2H), 1,52 (s, 3H), 1,1 (t, 3H)	
RG-120004	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>		7,3 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,3 (s, 6H)		1,9 (q, 2H), 1,53 (s, 3H), 1,1 (t, 3H)	
RG-120039	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,45 (d, 1H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,95 (m, 2H), 1,58 (s, 3H), 1,14 (t, 3H)	
RG-120128	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,22 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,2 (t, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,23 (s, 6H)		1,9 (m, 2H), 1,57 (s, 3H), 1,15 (t, 3H)	
RG-120162	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,27 (m, 2H), 7,05 (t, 1H), 6,8 (d, 2H), 4,5 (s, 2H)	7,65 (d, 2H), 7,35 (d, 2H)		1,55 (s, 6H)	7,9 (s, 1H)
RG-120067	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,8 (s, 1H), 7,5 (d, 1H), 7,3 (m, 1H), 7,2 (t, 1H)	7,75 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)		1,73, 1,58 (2s, 6H)	6,5 (s, 1H)
RG-120087	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,85 (t, 2H), 7,8 (s, 1H), 7,45 (t, 2H)	7,75 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)		1,65 (s, 6H)	
RG-120164	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,05 (q, 2H), 2,6 (a, 2H), 2,35 (t, 2H), 1,25 (t, 3H)	7,72 (d, 2H), 7,35 (d, 2H)		1,55 (s, 6H)	
RG-120151	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,65 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,42 (m, 2H)	7,7 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)		1,65 (s, 6H)	3,5 (a, 1H)
RG-120035	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,72 (d, 2H), 7,35 (d, 2H)		1,63 (s, 6H)	
RG-120045	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,07 (s, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,07 (s, 1H), 2,30 (s, 6H)		1,65 (s, 6H)	

## ES 2 445 822 T3

RG-120042	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,6 (d, 1H), 3,78 (s, 3H), 1,99 (s, 3H)	7,70 (d, 2H), 7,4 (m, 3H)		1,61 (s, 6H)	7,75 (s, 1H)
RG-120115	200 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,2 (t, 3H)	7,8 (m, 3H), 7,4 (m, 2H)		1,65 (s, 6H)	
RG-120003	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (s, 1H), 7,22 (m, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,29 (s, 6H)		2,1 (m, 4H), 1,85 (m, 4H)	7,8 (s, 1H)
RG-120073	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>		7,7 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)		1,592 (s, 6H)	3,5 (a, 1H)
RG-120005	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,55 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,2 (t, 3H)	7,35 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,26 (s, 6H)		3,95 (a, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,1 (a, 4H)	7,8 (s, 1H)
RG-120008	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,15 (t, 1H), 2,4 (a, 2H), 0,98 (t, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,6 (d, 1H), 2,33 (s, 6H)		4,02 (s a, 2H), 3,9 (m, 2H), 2,1 (a, 4H)	
RG-120009	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,30 (s a, 3H), 7,12 (s a, 2H), 4,39 (s, 2H), 3,97 (s, 2H)	7,35 (s, 2H), 7,15 (s, 1H), 2,32 (s, 6H)		3,95 (s a, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,0 (s a, 4H)	7,95 (s, 1H)
RG-120011	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,62 (m, 2H), 7,5 (m, 3H)	7,45 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		2,12 (s a, 4H), 1,85 (s a, 4H)	
RG-120013	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,27 (m, 2H), 7,0 (t, 1H), 6,75 (d, 2H), 4,5 (s, 2H)	7,75 (d, 2H), 7,45 (m, 3H)		3,95 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,0 (s a, 4H)	7,9 (s, 1H)
RG-120014	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,05 (q, 2H), 2,55 (a, 2H), 2,35 (t, 2H), 1,23 (t, 3H)	7,72 (m, 2H), 7,45 (m, 3H)		2,05 (a, 4H), 1,8 (a, 4H)	3,55 (s, 1H)
RG-120019	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 2H)	7,39 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		2,1 (a, 4H)	7,75 (s, 1H)
RG-120020	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,79 (s, 3H), 2,55 (q, 2H), 1,0 (t, 3H)	7,9 (d, 2H), 7,82 (d, 1H), 7,7 (d, 2H), 7,65 (d, 2H), 7,5 (m, 2H)		1,69 (s a, 6H)	
RG-120027	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (m, 4H), 7,2 (m, 1H)	7,7 (d, 2H), 7,5 (m, 3H)		4,05 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,05 (m, 4H)	6,3 (s, 1H)
RG-120030	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,67 (d, 2H), 7,27 (m, 1H), 7,05 (m, 2H), 3,47 (s, 2H)	7,5 (m, 2H), 7,35 (m, 3H)		1,95 (s a, 4H), 1,8 (m, 4H)	6,87 (s, 1H)
RG-120031	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	4,0 (q, 2H), 1,22 (t, 3H), 2,6 (a, 2H), 2,35 (t, 2H)	7,3 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,31 (s, 6H)		2,02 (a, 4H), 1,8 (m, 4H)	7,5 (s, 1H)
RG-120034	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 3H), 7,15 (m, 2H), 4,40 (s, 2H), 3,95 (s, 2H)	7,75 (d, 2H), 7,5 (m, 3H)		3,97 (a, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,0 (s a, 4H)	8,0 (s, 1H)
RG-120040	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,6 (d, 2H), 7,22 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,22 (t, 3H)	7,45 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		2,1 (a, 4H), 1,8 (a, 4H)	

ES 2 445 822 T3

RG-120041	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,27 (t, 2H), 7,01 (t, 1H), 6,8 (d, 2H), 4,5 (s, 2H)	7,35 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,30 (s, 6H)		2,05 (s a, 4H), 1,8 (m, 4H)	7,95 (s, 1H)
RG-120044	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (m, 5H)	7,8 (d, 2H), 7,6 (d, 2H), 7,5 (m, 1H)		4,0 (a, 2H), 3,9 (t, 2H), 2,1 (a, 4H)	7,7 (s, 1H)
RG-120046	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3 (m, 3H), 7,05 (m, 2H), 3,5 (s, 2H)	7,25 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,95 (s a, 4H), 1,75 (m, 4H)	
RG-120048	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,27 (m, 2H), 7,0 (m, 1H), 6,75 (d, 2H), 4,5 (s, 2H)	7,35 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,31 (s, 6H)		3,95 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 1,95 (a, 4H)	7,9 (s, 1H)
RG-120049	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,15 (m, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,5 (q, 2H), 1,0 (t, 3H)	7,45 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,33 (s, 6H)		2,15 (s a, 4H), 1,85 (s a, 4H)	
RG-120050	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,30 (m, 3H), 7,12 (m, 2H), 4,4 (s, 2H), 3,9 (s, 2H)	7,32 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,32 (s, 6H)		1,85 (m, 2H), 1,5 (s, 3H), 1,1 (t, 3H)	7,9 (s, 1H)
RG-120052	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3 (m, 3H), 7,15 (m, 2H), 4,4 (s, 2H), 3,97 (s, 2H)	7,37 (s, 2H), 7,10 (s, 1H), 2,32 (s, 6H)		2,0 (s a, 4H), 1,8 (s a, 4H)	7,93 (s, 1H)
RG-120054	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,5 (m, 2H), 7,4 (m, 3H)	7,3 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		4,05 (m, 2H), 3,9 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,1 (m, 2H)	
RG-120063	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>		7,72 (m, 2H), 7,4 (m, 3H)		2,05 (a, 4H), 1,8 (a, 4H)	3,55 (s, 1H)
RG-120069	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,65 (a, 2H), 1,05 (t a, 3H)	7,41 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,33 (s, 6H)		1,95 (s a, 2H), 1,65 (s a, 3H), 1,15 (t a, 3H), 1,05 (t a, 3H)	
RG-120071	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,47 (m, 1H), 7,2 (m, 1H), 6,52 (m, 1H)	7,82 (m, 2H), 7,4 (m, 3H)		2,1 (a, 4H), 1,8 (a, 4H)	
RG-120082	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,45 (s, 1H), 7,2 (m, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,75 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)		1,62 (s, 6H)	
RG-120084	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,25 (m, 3H), 7,0 (m, 2H), 3,45 (s, 2H)	7,1 (s, 2H), 6,87 (s, 1H), 2,30 (s, 6H)		3,9 (m, 2H), 3,8 (m, 2H), 1,90 (a, 4H)	
RG-120089	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,8 (d, 2H), 7,4 (m, 3H)	7,65 (d, 2H), 7,5 (m, 1H), 7,4 (m, 2H)		2,15 (a, 4H), 1,85 (a, 4H)	
RG-120090	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>		7,35 (s, 2H), 7,10 (s, 1H), 2,30 (s, 6H)		2,05 (m, 4H), 1,87 (m, 4H)	
RG-120092	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,10 (t, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,6 (d, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,5 (q, 2H), 1,0 (t, 3H)	7,82 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,45 (m, 3H)		2,1 (m, 2H), 1,7-2,0 (m, 6H)	7,18 (s, 1H)



## ES 2 445 822 T3

RG-120099	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,73 (d, 2H), 7,42 (d, 2H), 7,15 (t, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,5 (a, 2H), 1,0 (t, 3H)	6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H)		1,7 (a, 6H)	7,2 (s, 1H)
RG-120106	MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,92 (s, 1H), 7,22 (m, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,9 (m, 2H), 1,56 (s, 3H), 1,13 (t, 3H)	7,75 (s, 1H)
RG-120112	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 7,15 (t, 1H)	7,5 (2s, 1H), 7,1 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		1,7-2,2 (m, 8H)	6,3 (s, 1H), 7,8 (s, 1H)
RG-120117	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,35 (m, 3H), 7,2 (m, 2H), 4,45 (s, 2H), 4,0 (s, 2H)	7,65 (d, 2H), 7,4 (d, 2H)		1,6 (s, 6H)	
RG-120120	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,23 (m, 3H), 7,05 (m, 2H), 3,45 (s, 2H)	7,21 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		1,8 (a, 2H), 1,4 (s a, 3H), 1,05 (t, 3H)	6,9 (s, 1H)
RG-120121	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,3 (m, 3H), 7,1 (m, 2H), 3,47 (s, 2H)	7,55 (d, 2H), 7,35 (d, 2H)		1,47 (s, 6H)	6,9 (s, 1H)
RG-120124	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 2,65 (q, 2H), 1,21 (t, 3H)	7,8 (d, 2H), 7,55 (m, 3H)		3,98 (m, 2H), 3,9 (m, 2H), 2,1 (a, 4H)	
RG-120125	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,8 (d, 2H), 7,23 (d, 2H), 2,65 (q, 2H), 1,21 (t, 3H)	7,6 (m, 3H), 7,4 (m, 2H)		2,1 (a, 4H), 1,8 (a, 4H)	
RG-120130	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 7,0 (m, 1H), 3,44 (s, 2H)	7,8 (d, 1H), 7,65 (d, 2H), 7,5 (m, 2H)		3,8-4,0 (m, 4H), 1,85 (m a, 4H)	
RG-120132	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>			7,1-7,7 (m, 10H)	1,8-2,3 (m, 8H)	7,85 (s, 1H), 6,25 (s, 1H)
RG-120138	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (m, 1H), 7,2 (m, 1H), 6,5 (m, 1H)	7,4 (s, 2H), 7,07 (s, 1H), 2,29 (s, 6H)		3,95 (a, 2H), 3,85 (m, 2H), 2,05 (m, 4H)	7,8 (s, 1H)
RG-120141		CDCl <sub>3</sub>	7,27 (t, 2H), 7,0 (t, 1H), 6,8 (d, 2H), 4,5 (s, 2H)	7,32 (s, 2H), 7,1 (s, 1H), 2,3 (s, 6H)		1,8 (m, 2H), 1,45 (s, 3H), 0,9 (t, 3H)	7,87 (s, 1H)
RG-120142	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,9 (d, 2H), 7,22 (d, 2H), 2,65 (q, 2H), 1,21 (t, 3H)	7,45 (m, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,6		1,66 (s, 6H)	
RG-120150	300 MHz	DMSO-d <sub>6</sub>	8,05 (s a, 1H), 7,99 (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,3 (m, 1H)	7,7 (m, 2H), 7,45 (m, 3H)		2,15 (a, 2H), 1,85 (a, 2H), 1,65 (s a, 4H)	4,6 (s, 1H)
RG-120152	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,8 (m, 3H), 7,40 (m, 2H)	7,45 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,27 (s, 6H)		2,05 (m, 4H), 1,85 (m, 4H)	
RG-120155	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,4 (m, 3H), 7,15 (m, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,0 (s, 2H)	7,77 (d, 2H), 7,3 (m, 3H)		2,05 (s a, 4H), 1,8 (s a, 4H)	7,95 (s, 1H)
RG-120158	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,77 (d, 2H), 7,02 (t, 1H), 6,8 (d, 2H), 4,49 (s, 2H)	7,42 (m, 3H), 7,3 (m, 2H)		2,05 (s a, 4H), 1,8 (m, 4H)	7,95 (s, 1H)

RG-120159	300 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,55 (d, 1H), 2,4 (a, 2H), 0,95 (t, 3H)	7,8 (m, 2H), 7,5 (m, 3H)		4,0 (m, 2H), 3,9 (m, 2H), 2,1 (m, 2H), 1,9 (m, 2H)	7,22 (s, 1H)
RG-121517	500 MHz	CDCl <sub>3</sub>	6,55 (d, 1H), 6,45 (d, 1H), 4,3 (m, 4H), 2,55 (m, 2H), 1,05 (t, 3H)	7,8 (m, 2H), 7,45 (m, 3H)		1,62 (s, 6H)	
RG-121518	500 MHz	CDCl <sub>3</sub>	6,73 (d, 1H), 6,64 (d, 1H), 4,3 (m, 4H), 2,6 (a, 2H), 1,14 (t, 3H)	7,31 (s, 1H), 7,1 (s, 2H)		2,33 (s, 6H), 1,8 (m, 2H), 1,49 (s, 3H), 1,03 (t, 3H)	7,4 (s a, 1H)
RG-121513	500 MHz	CDCl <sub>3</sub>	7,9 (t, 1H), 7,2 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 2,7 (q, 2H), 1,13 (t, 3H)	7,37 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 2,3 (s, 6H)		1,9 (m, 2H), 1,57 (s, 3H), 1,22 (t, 3H)	
RG-121544	500 MHz	CDCl <sub>3</sub>	8,1 (d, 1H), 7,9 (t, 1H), 7,1 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 2,65 (q, 2H), 1,2 (t, 3H)	7,8 (d, 2H), 7,4 (m, 3H)		2,1 (s a, 4H), 1,9 (m, 2H), 1,8 (m, 2H)	
RG-121515	500 MHz	CDCl <sub>3</sub>	8,0 (d, 1H [NH]), 7,9 (m, 1H), 7,1 (m, 1H), 6,95 (d, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,2 (t, 3H)	7,4 (s, 2H), 7,05 (s, 1H), 2,28 (s, 6H)		2,1 (s a, 4H), 1,87 (m, 2H), 1,75 (m, 2H)	
RG-121516	500 MHz	CDCl <sub>3</sub>	8,05 (d 1H [NH]), 7,9 (m, 1H), 7,1 (d, 1H), 6,9 (d, 1H), 2,65 (q, 2H), 1,2 (t, 3H)	7,8 (m, 2H), 7,4 (m, 3H)		1,65 (s, 6H)	

## EJEMPLO 2: ENSAYO BIOLÓGICO DE COMPUESTOS

- 5 Los ligandos de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones incluyendo terapia génica, expresión de proteínas de interés en células huésped, producción de organismos transgénicos y ensayos basados en células.

### ENSAYO 27-63

#### Casete de expresión génica

- 10 GAL4 DBD (1-147)-CfEcR(DEF)/VP16AD-βRXREF-LmUSPEF: Se fusionaron los dominios D, E y F de tipo natural de EcR de gusano de la yema de las píceas, *Choristoneura fumiferana* ("CfEcR-DEF"; SEQ ID NO: 1) a un dominio de unión a ADN de GAL4 ("Gal4DBD1-147"; SEQ ID NO: 2) y se colocaron bajo el control de un promotor de fosfoglicerato cinasa ("PGK"; SEQ ID NO: 3). Se fusionaron las hélices 1 a 8 de los dominios EF de RXRβ de *Homo sapiens* ("HsRXRβ-EF"; nucleótidos 1-465 de SEQ ID NO: 4) y las hélices 9 a 12 de los dominios EF de la proteína ultraespiráculo de *Locusta migratoria* ("LmUSP-EF"; nucleótidos 403-630 de SEQ ID NO: 5) al dominio de transactivación de VP16 ("VP16AD"; SEQ ID NO: 6) y se colocaron bajo el control de un promotor de factor-α de elongación ("EF-1α"; SEQ ID NO: 7). Se fusionaron cinco sitios de unión al elemento de respuesta a GAL4 consenso ("5XGAL4RE"; que comprende 5 copias de un GAL4RE que comprende SEQ ID NO: 8) a un promotor mínimo TATA
- 15 sintético (SEQ ID NO: 9) y se colocaron aguas arriba del gen indicador de luciferasa (SEQ ID NO: 10).
- 20

#### Línea celular estable

- 25 Se transfectaron transitoriamente células CHO con casetes de transcripción para GAL4 DBD (1-147) CfEcR(DEF) y para VP16AD βRXREF-LmUSPEF controlados por promotores celular activos de manera ubicua (PGK y EF-1α, respectivamente) en un único plásmido. Se seleccionaron células transfectadas de forma estable mediante resistencia a zeocina. Se transfectaron transitoriamente clones de células CHO aislados individualmente con un indicador de GAL4 RE-luciferasa (pFR Luc). Se seleccionó el clon 27-63 usando higromicina.

- 30 Tratamiento con ligando

Se tripsinizaron células y se diluyeron hasta una concentración de  $2,5 \times 10^4$  células/ml. Se colocaron 100  $\mu$ l de suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C bajo un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Se prepararon disoluciones madre de ligando en DMSO y se diluyeron 300 veces para todos los tratamientos. Las pruebas de respuesta a la dosis consistieron en 8 concentraciones que oscilaban entre 33  $\mu$ M y 0,01  $\mu$ M.

5

#### Ensayo de gen indicador

Se midió la expresión de gen indicador de luciferasa 48 h después del tratamiento celular usando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ de Promega (E2650). Se detectó la luminiscencia a temperatura ambiente usando un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX.

10

### ENSAYO Z3

#### Línea celular estable

15

El Dr. F. Gage proporcionó una población de células transformadas de manera estable que contenían CVBE y 6XEcRE tal como se describe en Suhr, S.T., Gil, E.B., Senut M.C., Gage, F.H. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7999-804. Se infectaron secuencialmente células de riñón 293 humanas, también denominadas células HEK-293, con vectores retrovirales que codificaban en primer lugar para el constructo conmutador CVBE, y posteriormente para el constructo indicador 6XEcRE Lac Z. El constructo conmutador contenía la secuencia codificante para los aminoácidos 26-546 de EcR de *Bombyx mori* (BE) (Iatrou) insertados en marco y aguas abajo del dominio de transactivación de VP16 (VBE). Se colocó un codón de iniciación ATG sintético bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CVBE) y flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR). El constructo indicador contenía seis copias del sitio de unión a elemento de respuesta a ecdisona (EcRE) colocadas aguas arriba de LacZ y flanqueadas en ambos lados con secuencias LTR (6XEcRE).

20

25

Se usó clonación por dilución para aislar clones individuales. Se seleccionaron clones usando G418 450  $\mu$ g/ml y puomicina 100 ng/ml. Se evaluaron clones individuales basándose en su respuesta en presencia y ausencia de ligandos de prueba. Se seleccionó el clon Z3 para examen y fines de SAR.

30

Se mantuvieron células de riñón 293 humanas transformadas de manera estable con CVBE y 6XEcRE LacZ en medio esencial mínimo (Mediatec, 10-010-CV) que contenía FBS al 10% (Life Technologies, 26140-087), G418 450  $\mu$ g/ml (Mediatec, 30-234-CR) y 100  $\mu$ g/ml de puomicina (Sigma, P-7255), a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> y se subcultivaron cuando alcanzaron una confluencia del 75%.

35

#### Tratamiento con ligando

Se sembraron células Z3 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una concentración de  $2,5 \times 10^3$  células por pocillo y se incubaron a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub> durante veinticuatro horas. Se prepararon disoluciones madre de ligando en DMSO. Se diluyeron las disoluciones madre de ligando 100 veces en medios y se añadieron 50  $\mu$ l de esta disolución de ligando diluida (33  $\mu$ M) a las células. Se mantuvo la concentración final de DMSO al 0,03% tanto en los controles como en los tratamientos.

40

#### Ensayos de gen indicador

45

Se evaluó la expresión de gen indicador 48 horas después del tratamiento de las células, se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa usando el sistema de ensayo de gen indicador bioluminescente Gal Screen™ de Tropix (GSY1000). Se calcularon las actividades de inducción en veces dividiendo las unidades relativas de luz ("URL") en células tratadas con ligando por las URL en células tratadas con DMSO. Se detectó la luminiscencia a temperatura ambiente usando un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX.

50

En la figura 1 se muestra un esquema del constructo conmutador CVBE y el constructo indicador 6XEcRE Lac Z. Hay repeticiones terminales largas flanqueando ambos constructos, G418 y puomicina son marcadores seleccionables, CMV es el promotor de citomegalovirus, VBE es la secuencia codificante para los aminoácidos 26-546 de EcR de *Bombyx mori* insertada aguas abajo del dominio de transactivación de VP16, 6X EcRE son seis copias del elemento de respuesta a ecdisona, lacZ codifica para la enzima indicadora  $\beta$ -galactosidasa.

55

### ENSAYO 13B3

#### Casete de expresión génica

60

GAL4 DBD-CfEcR(DEF)/VP16AD-MmRXRE: Se fusionaron los dominios D, E y F de tipo natural de EcR de gusano de la yema de las píceas, *Choristoneura fumiferana* ("CfEcR-DEF"; SEQ ID NO: 1) a un dominio de unión a ADN de GAL4 ("Gal4DBD1-147"; SEQ ID NO: 2) y se colocaron bajo el control del promotor SV40e del vector pM (PT3119-5, Clontech, Palo Alto, CA). Se fusionaron los dominios D y E de *Mus Musculus* RXR ("MmRXR-DE"; SEQ ID NO: 11)

65

al dominio de transactivación de VP16 ("VP16AD"; SEQ ID NO: 6) y se colocaron bajo el control del promotor SV40e del vector pVP16 (PT3127-5, Clontech, Palo Alto, CA).

Línea celular estable

5 Se transfectaron transitoriamente células CHO con casetes de transcripción para GAL4 DBD-CfEcR(DEF) y para VP16AD-MmRXRE controlados por promotores SV40e. Se seleccionaron células transfectadas de manera estable usando higromicina. Se transfectaron transitoriamente clones de células CHO aislados individualmente con un  
10 indicador de GAL4 RE-luciferasa (pFR-Luc, Stratagene, La Jolla, CA). Se seleccionó el clon 13B3 usando zeocina.

Tratamiento con ligando

15 Se tripsinizaron células y se diluyeron hasta una concentración de  $2,5 \times 10^4$  células/ml. Se colocaron 100  $\mu$ l de suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C bajo un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Se prepararon disoluciones madre de ligando en DMSO y se diluyeron 300 veces para todos los tratamientos. Las pruebas de respuesta a la dosis consistían en 8 concentraciones que oscilaban entre 33  $\mu$ M y 0,01  $\mu$ M.

Ensayo de gen indicador

20 Se midió la expresión de gen indicador de luciferasa 48 h después del tratamiento de células usando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ de Promega (E2650). Se detectó la luminiscencia a temperatura ambiente usando un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX.

25 Se muestran los resultados de los ensayos en las tablas 5 y 6. Se llevó a cabo cada ensayo en dos pocillos separados y se calculó el promedio de los dos valores. Se calcularon las inducciones en veces dividiendo las unidades relativas de luz ("URL") en células tratadas con ligando por las URL en células tratadas con DMSO. Se calcularon las CE<sub>50</sub> a partir de los datos de respuesta a la dosis usando un modelo logístico de tres parámetros. Se determinó FI máxima relativa como la inducción en veces máxima del ligando sometido a prueba (una realización de la invención) observada a cualquier concentración en relación con la inducción en veces máxima de ligando GS™-E  
30 (N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico) observada a cualquier concentración.

Tabla 5: Resultados del ensayo biológico para compuestos: Inducción en veces

Compuesto	Promedio de inducción en veces		
	Ensayo 13B3	Ensayo 27-63	Ensayo Z3
	33/33,3 ( $\mu$ M)	33,3 ( $\mu$ M)	33 ( $\mu$ M)
RG-103441	1,6		0,8
RG-103468	2,2		1,1
RG-120001	3,3		0,3
RG-120002	0,2	5,7	3,9
RG-120005		0,8	
RG-120006	1,1		0,5
RG-120008	0,0		567,3
RG-120009	1,3	0,8	0,8
RG-120012	0,7		0,7
RG-120014	0,0		1,1
RG-120015	0,0		0,8
RG-120016	4,4	1146,6	226,9
RG-120017	0,8		0,9
RG-120018	0,8		0,7
RG-120019		1,5	
RG-120020	1,3		0,2
RG-120021	0,0		0,7

ES 2 445 822 T3

RG-120022	0,0	0,3	0,1
RG-120023	0,0	1,4	0,2
RG-120024	2,1	6,3	3,8
RG-120025	0,9		0,8
RG-120026	0,9	8,5	41,1
RG-120029	1,5		0,7
RG-120033	0,9		0,7
RG-120035	1,2		9,1
RG-120037	0,3	0,4	0,5
RG-120038	0,0		0,2
RG-120040	174,4	241,6	202,3
RG-120042	3,3		19,3
RG-120045	1412,3	2707,3	275,8
RG-120046	1,3		8,9
RG-120047	973,9		31,9
RG-120048	0,0		1,0
RG-120049	2661,5	2070,7	310,0
RG-120050	0,9		3,5
RG-120052	0,7		4,9
RG-120055	0,7	0,5	0,2
RG-120056	0,1		1,0
RG-120057	0,6		0,8
RG-120058	0,3	0,3	1,7
RG-120059	0,0		0,6
RG-120060	16,8		108,5
RG-120061	0,4	0,9	0,6
RG-120062	0,2		0,6
RG-120066	1,4		0,6
RG-120067	2,6		0,5
RG-120069	477,7	1872,1	
RG-120070	0,4		0,7
RG-120072	0,6		1,3
RG-120073	0,9		0,5
RG-120075	1,1		0,7
RG-120076	20,2	4091,3	0,2
RG-120077	0,4		14,6
RG-120078	0,0		0,4
RG-120079	0,7		0,6
RG-120080	716,9		310,4
RG-120081	0,5		0,6
RG-120082	0,1		0,8
RG-120083	1,3		0,8

ES 2 445 822 T3

RG-120086	4,0		111,6
RG-120087	0,4		0,4
RG-120088	0,9		8,2
RG-120091	0,5		1,5
RG-120092		2186,5	
RG-120093	0,0	5,0	0,2
RG-120094	0,6		0,8
RG-120096	0,2		0,7
RG-120098	0,3		1,8
RG-120099	0,0	1327,0	0,2
RG-120101	1,2		0,7
RG-120102	0,5		0,8
RG-120105	0,5		0,8
RG-120108	0,0		0,3
RG-120109	0,0		0,2
RG-120110	0,8		0,5
RG-120111	0,6		0,7
RG-120113	3,4		0,6
RG-120114	1,1		0,6
RG-120115	0,8		9,1
RG-120117	1,2		0,8
RG-120118	0,8	13,4	1,4
RG-120119	0,4		0,8
RG-120121	0,1		0,7
RG-120122	0,5		0,6
RG-120124	1,2	1,0	2,0
RG-120125	82,6	509,9	253,6
RG-120126	0,4		2,4
RG-120127	0,6		0,7
RG-120128	129,0	338,2	403,0
RG-120129	0,9		0,4
RG-120134	0,3		0,6
RG-120135	0,4	0,7	0,7
RG-120136	0,3		0,6
RG-120137	5,3	4,6	59,0
RG-120140	1,4		0,5
RG-120142	0,3		0,4
RG-120144	0,1		0,7
RG-120145	1,4		0,5
RG-120147	1,1		1,0
RG-120148	0,0	0,7	1,1
RG-120149	1,1		0,7

ES 2 445 822 T3

RG-120151	0,3		0,8
RG-120152	264,3		59,9
RG-120153	0,8		0,7
RG-120156	1,4		0,7
RG-120157	0,0		0,9
RG-120159	0,1	3,7	0,2
RG-120160	0,3		0,6
RG-120161	59,9		
RG-120162	0,9		0,7
RG-120163	1,1		0,5
RG-120164	1,7		0,6
RG-120326	0,0		
RG-121513		1015,2	
RG-121514		1,7	
RG-121515		36,6	
RG-121516		7,9	
RG-121517		3514,1	
RG-121518		2336,5	

Tabla 6: Resultados del ensayo biológico para compuestos: CE50/FI máxima relativa

Compuesto	EC50 (µM)/FI máx.rel	EC50 (µM)/ FI máx. rel	EC50 (µM)/ FI máx.rel
	Ensayo 13B3	Ensayo 27-63	Ensayo Z3
RG-120002		>33/0	
RG-120005		>33/0	
RG-120016		~20/0,71	
RG-120019		>33/0	
RG-120022		>33/0	
RG-120023		>33/0	
RG-120024		>33/0	
RG-120026		>33/0	
RG-120037		>33/0	
RG-120040		~20/0,13	
RG-120042		>33/0	
RG-120045		~20/1,25	
RG-120049	3,57/1,56	3,42/1,58	1,6/0,88
RG-120055		>33/0	
RG-120058		>33/0	
RG-120060		>33/0,01	
RG-120061		>33/0	
RG-120069	2,95/1,02	3,31/1,11	1,68/0,8
RG-120076	>33,3/0,05	~20/1,4	12,43/0,9
RG-120080	12,35/1,04	8,35/1,29	3,95/0,71

RG-120092		7,16/1,15	
RG-120093		>33/0	
RG-120096	>33,3/0		>50/0
RG-120099		~20/0,64	
RG-120115		>33/0	
RG-120118		>33/0	
RG-120124		>33/0	
RG-120125	>33,3/0,16	~20/0,27	10,02/0,67
RG-120126	>33,3/0		>50/0,04
RG-120128		~20/0,18	
RG-120135		>33/0	
RG-120137		>33/0	
RG-120148		>33/0	
RG-120159		>33/0	
RG-120161	3,46/0,14		2,14/0,08
RG-121513		~10/0,44	
RG-121514		3,89/0,5	
RG-121515		~5/0,17	
RG-121516		>33/0	
RG-121517		~20/1,55	
RG-121518		3,57/1,08	

### EXPERIMENTO DE REFERENCIA 3: ACTIVIDAD INSECTICIDA DE COMPUESTOS

Se proporciona este experimento para fines de referencia.

5

Se disolvió el compuesto que iba a evaluarse en un disolvente apropiado, habitualmente una mezcla de acetona, metanol y agua. Se hicieron disoluciones de prueba mediante dilución en serie de una disolución madre de prueba con acetona, metanol y agua. Se realizaron evaluaciones iniciales a una o más concentraciones en uno o más de los siguientes insectos:

10

Símbolo de código	Nombre común	Nombre científico
BAW	Rosquilla verde	<i>Spodoptera exigua</i>
CL	Gusano falso medidor	<i>Trichoplusia ni</i>
TBW	Gusano bellotero	<i>Heliothis virescens</i>

Se llevaron a cabo bioensayos de alimentación en bandejas de bioensayo que contenían dieta de insectos. Se realizaron tratamientos mediante la aplicación de 50 µl de disolución de prueba en la superficie de la dieta en cada uno de 5 pocillos. Tras secarse la disolución de ensayo, se infestó cada pocillo con una única larva neonata. Se mantuvieron las bandejas durante seis días y entonces se determinó el índice de mortalidad para cada tratamiento.

15

Se llevaron a cabo bioensayos de contacto (pulgón verde del melocotonero, ácaro de dos puntos, mosca blanca) mediante la aplicación de una disolución del compuesto de prueba a la superficie interna de una placa Petri. Se permitió que la disolución se secara al aire, entonces se infestó cada placa y se transfirieron las larvas de cada tratamiento a una bandeja de bioensayo. Se mantuvieron las bandejas de uno a siete días, y se determinó el índice de mortalidad para cada tratamiento.

20

Se llevaron a cabo algunos de los ensayos de gusano bellotero tal como sigue. Se preparó una disolución de ensayo que contenía 600 ppm mediante la disolución de un compuesto de la invención en una disolución de acetona:metanol 1:1, añadiendo luego agua para dar una disolución de acetona:metanol:agua 5:5:90, y finalmente se añadió un tensioactivo a una equivalencia de 7,37 g de tensioactivo por 100 l de disolución de prueba (1 onza de

25



5 tensioactivo por 100 galones de disolución de ensayo). Se prepararon diluciones apropiadas en agua a partir de la disolución de 600 ppm. Se colocó una hoja de algodón desprendida, *Gossypium hirsutum*, sobre papel de filtro humedecido en una placa Petri (100 x 20 mm). Se pulverizó la hoja con la disolución de prueba usando un pulverizador de plataforma giratoria y se permitió que se secase. Se infestó la placa con 10 larvas en primer estadio de gusano bellotero y se cubrieron con la tapa. Si las larvas estaban vivas dos días después de tratamiento, se añadieron hojas de algodón no tratadas nuevas. Se mantuvieron todos los tratamientos a 23,9-26,7°C (75-80°F) bajo luz fluorescente en una habitación bien ventilada. Se determinó el porcentaje de mortalidad cuatro días después del tratamiento.

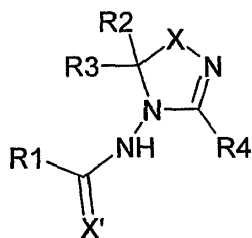
10 Tabla 7: Resultados del ensayo de actividad insecticida para compuestos

Compuesto	Proteína de fusión CfEcR (CDEF)/CfUSP, GST	Toxicidad en insectos (CL50 (ppm) o % de control a 150 ppm)				
		MTA	BAW	CL	TBW	WFN
RG-120096	6% a 10 uM	74 a 150	0% a 150	60% a 150	0% a 150	55% a 150
RG-120076	8,35 nM	92	47	47	>150	>150
RG-120128	28,5 nM (28% a 1 uM)	>150	47	17	>150	>150
RG-120039	203 nM (21% a 1 uM)					
RG-120126	136 nM	0% a 150	0% a 150	0% a 150	0% a 150	79% a 150
RG-120008	81% a 1 uM					
RG-120080	Kd=11,9 nM	0% a 150	23	47	>150	0% a 150
RG-120060	Kd=38 nM	0% a 150	23	47	>150	0% a 150
RG-120161	62,4 nM	110	87	17	>150	>150
RG-120051	147 nM					
RG-120069	14,2 nM	146	4,7	4,7	>150	>150
RG-120125	57,9 nM	167	98	23	>150	150
RG-120092	99% a 1 uM	>150	47	13	98	>150
RG-120152	92% a 1 uM					
RG-120035		0% a 150	40% a 150	100% a 150	0% a 150	0% a 150
RG-120099		0% a 150	100% a 150	40% a 150	0% a 150	0% a 150
RG-120015		0% a 150	80% a 150	0% a 150	0% a 150	0% a 150
RG-120001		0% a 150	80% a 150	20% a 150	0% a 150	0% a 150
RG-120021		51% a 150	100% a 150	0% a 150	0% a 150	0% a 150
RG-120026		40% a 150	100% a 150	0% a 150	0% a 150	0% a 150
RG-120042	481 nM (Plodia EC50); 29 uM (Kc EC50)					
RG-120115		Inactivo como insecticida				
RG-120077		0% a 150	50% a 150	100% a 150	0% a 150	0% a 150

Además, un experto habitual en la técnica puede predecir también que los ligandos dados a conocer en el presente documento funcionarán también para modular la expresión génica en diversos tipos de células descritos anteriormente usando sistemas de expresión génica basados en receptores nucleares de grupo H y grupo B.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general:



5

en la que:

X es O o S, y X' es O;

10

R<sup>1</sup> es

a) H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxicarbonil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o benciloxilo;

15

b) fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); fenoxilo; haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alcoxicarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>); alquilaminocarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>); mercapto; alquiltio (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros;

30

c) naftilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino;

35

d) benzotiofen-2-ilo, benzotiofen-3-ilo, benzofuran-2-ilo o benzofuran-3-ilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo o alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>);

e) 2, 3 ó 4-piridilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

40

f) heterociclo de 5 miembros sustituido o no sustituido seleccionado de furilo, tiofenilo, triazolilo, pirrolilo, isopirrolilo, pirazolilo, isoimidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo o isooxazolilo en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o amino (-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>);

45

g) fenilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenoxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o

50

h) fenilamino, fenilalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-amino o fenilcarbonilamino sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino;

en los que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

55

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo, o juntos como una unión de alcano (- (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-), una unión de alquiloxialquilo (- (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-), una unión de alquilaminoalquilo (- (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>NR<sup>a</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-) o una unión de alquilbenzoalquilo (- (CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-1-

benzo-2-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-) forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos,

en los que x = de 3 a 7, y = de 1 a 3, z = de 1 a 3 y R<sup>a</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo; y

- 5 R<sup>4</sup> es fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); fenoxilo; haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoílo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alcoxycarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>); alquilaminocarbonilamino (-NR<sup>a</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>); mercapto; alquiltio (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse para formar un anillo heterocíclico dioxolano (-OCH<sub>2</sub>O-) o dioxano (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) de 5 ó 6 miembros; en los que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

siempre que R<sup>4</sup> no sea 3-nitrofenilo o 4-nitrofenilo, y

20 cuando R<sup>4</sup> es fenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilo,

cuando R<sup>4</sup> es 3-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilamino o

25 cuando R<sup>4</sup> es 4-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es metilo.

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

R<sup>1</sup> es

- 30 a) H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxycarbonil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o benciloxilo;
- 35 b) fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alqueno (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoílo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros;
- 45 c) benzotiofen-2-ilo o benzofuran-2-ilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);
- 50 d) 2, 3 ó 4-piridilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);
- 55 e) heterociclo de 5 miembros sustituido o no sustituido seleccionado de furilo, tiofenilo, triazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo o isooxazolilo en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo o alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>);
- 60 f) fenilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenoxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);
- g) fenilamino, fenilalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-amino o fenilcarbonilamino sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);
- 65 en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo, o juntos como una unión de alcano  $-(\text{CH}_2)_x-$ , una unión de alquiloalquilo  $-(\text{CH}_2)_y\text{O}(\text{CH}_2)_z-$ , una unión de alquilaminoalquilo  $-(\text{CH}_2)_y\text{NR}^a(\text{CH}_2)_z-$  o una unión de alquilbenzoalquilo  $-(\text{CH}_2)_y-1$ -benzo-2- $(\text{CH}_2)_z-$  forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos,

5 en los que x = de 3 a 7, y = de 1 a 3, z = de 1 a 3 y R<sup>a</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo; y

10 R<sup>4</sup> es fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); cianoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); hidroxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcanoiloxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquenoil (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); alquinoil (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); formilo; carboxilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; haloalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; benzoilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcanoiloxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (-OCOR<sup>a</sup>); carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfonilo; alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-sulfóxido (-S(O)R<sup>a</sup>); sulfamido (-SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); o fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o amino; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros; en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

20 siempre que R<sup>4</sup> no sea 3-nitrofenilo o 4-nitrofenilo, y

cuando R<sup>4</sup> es fenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilo,

25 cuando R<sup>4</sup> es 3-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es fenilamino o

cuando R<sup>4</sup> es 4-clorofenilo, entonces R<sup>1</sup> no es metilo.

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

30 X es O;

X' es O;

35 R<sup>1</sup> es

a) H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alcocarbonil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

40 b) fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); haloalcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo; carboxamido (-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>); amido (-NR<sup>a</sup>COR<sup>b</sup>); o fenilo; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión (-OCH<sub>2</sub>O-) o (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros;

45 c) benzotiofen-2-ilo o benzofuran-2-ilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

50 d) furilo o tiofenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carboxilo, alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-carbonilo (-CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>) o fenilo;

e) fenilalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenoxialquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); o

55 f) fenilamino, fenilalquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-amino o fenilcarbonilamino sustituido o no sustituido por aromático en el que los sustituyentes aromáticos son independientemente de 1 a 3 halo, nitro, alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

en los que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo;

60 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo, o juntos como una unión de alcano  $-(\text{CH}_2)_x-$ , una unión de alquiloalquilo  $-(\text{CH}_2)_y\text{O}(\text{CH}_2)_z-$ , una unión de alquilaminoalquilo  $-(\text{CH}_2)_y\text{NR}^a(\text{CH}_2)_z-$  o una unión de alquilbenzoalquilo  $-(\text{CH}_2)_y-1$ -benzo-2- $(\text{CH}_2)_z-$  forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos,

65 en los que x = de 3 a 7, y = de 1 a 3, z = de 1 a 3 y R<sup>a</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o fenilo; y

5  $R^4$  es fenilo sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes son independientemente de 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; alquilo ( $C_1-C_6$ ); haloalquilo ( $C_1-C_6$ ); alcoxilo ( $C_1-C_6$ ); haloalcoxilo ( $C_1-C_6$ ); alquil ( $C_1-C_6$ )-carbonilo; alcoxi ( $C_1-C_6$ )-carbonilo; carboxamido ( $-CONR^aR^b$ ); amido ( $-NR^aCOR^b$ ); o fenilo; o cuando dos posiciones adyacentes en el anillo de fenilo están sustituidas con grupos alcoxilo, estos grupos, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden unirse como una unión ( $-OCH_2O-$ ) o ( $-OCH_2CH_2O-$ ) para formar un anillo heterocíclico dioxolano o dioxano de 5 ó 6 miembros; en los que  $R^a$  y  $R^b$  son independientemente H, alquilo ( $C_1-C_6$ ) o fenilo;

10 siempre que  $R^4$  no sea 3-nitrofenilo o 4-nitrofenilo, y

cuando  $R^4$  es fenilo, entonces  $R^1$  no es fenilo,

cuando  $R^4$  es 3-clorofenilo, entonces  $R^1$  no es fenilamino o

15 cuando  $R^4$  es 4-clorofenilo, entonces  $R^1$  no es metilo.

4. Compuesto según la reivindicación 3 en el que:

20 X y X' son O;

$R^1$  es

25 fenilo, 4-clorofenil-, 4-etilfenil-, 2-etil-3,4-etilendioxifenilo, 3-fluorofenil-, 2-fluoro-4-etilfenil-, 2-metil-3-metoxifenil-, 2-etil-3-metoxifenilo, 3-metilfenil-, 2-metoxifenil-, 2-nitrofenil-, 3-nitrofenil-, 2-furanil-, bencil-, benzotiofen-2-il-, fenilamino-, benciloximetilo, fenoximetil-, 3-toluoilamino-, bencilamino-, benzoilamino-, etoxicarboniletil- o 3-cloro-2,2,3,3-tetrafluoroetilo;

30  $R^2$  y  $R^3$  son independientemente metilo, etilo, o juntos como una unión de tetrametileno ( $-(CH_2)_4-$ ), 4-pirano ( $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ ) o metillenbenzoetileno ( $-CH_2-1-benzo-2-CH_2CH_2-$ ) forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos; y

$R^4$  es fenilo, 4-bifenilo, 4-clorofenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetilfenilo, 2-metoxifenilo, 3,4-metilendioxifenilo, 3-trifluorometilfenilo o 4-trifluorometoxifenilo;

35 siempre que cuando  $R^4$  es fenilo, entonces  $R^1$  no es fenilo.

5. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

40 1-bencil-3-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-urea;

1-benzoil-3-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-urea;

N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-4-etil-benzamida;

45 3-cloro-N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2,2,3,3-tetrafluoro-propionamida;

N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;

[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;

50 éster etílico del ácido N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-succinámico;

1-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea;

55 N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenoxi-acetamida;

2-benciloxi-N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-acetamida;

[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;

60 N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenil-acetamida;

N-[3-(4-cloro-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;

65 N-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;

- N-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-4-etil-benzamida;
- [5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;
- 5 1-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea;
- N-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenoxi-acetamida;
- 2-benciloxi-N-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-acetamida;
- 10 N-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenil-acetamida;
- [5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- 15 N-[5,5-dimetil-3-(4-trifluorometoxi-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;
- N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-4-etil-benzamida;
- N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;
- 20 3-cloro-N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2,2,3,3-tetrafluoro-propionamida;
- éster etílico del ácido N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-succinámico;
- 25 1-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea;
- 2-benciloxi-N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-acetamida;
- [5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- 30 4-etil-N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;
- N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;
- 35 N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;
- N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenil-acetamida;
- N-[5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenoxi-acetamida;
- 40 [5,5-dimetil-3-(3-trifluorometil-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;
- 3-cloro-2,2,3,3-tetrafluoro-N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-propionamida;
- 45 éster etílico del ácido N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-succinámico;
- [3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;
- 1-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea;
- 50 N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenoxi-acetamida;
- 2-benciloxi-N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-acetamida;
- 55 N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenil-acetamida;
- [3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- 2-etil-3-metoxi-N-[3-(2-metoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;
- 60 N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-4-etil-benzamida;
- N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-benzamida;
- 65 éster etílico del ácido N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-succinámico;

- (3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;  
 1-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-3-fenil-urea;
- 5 N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-fenoxi-acetamida;  
 N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-benciloxi-acetamida;  
 N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-fenil-acetamida;
- 10 (3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-amida del ácido furan-2-carboxílico;  
 N-(3-benzo[1,3]dioxol-5-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-etil-3-metoxi-benzamida;
- 15 N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-4-etil-benzamida;  
 N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;  
 éster etílico del ácido N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-succinámico;
- 20 [3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;  
 1-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea;
- 25 N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenoxi-acetamida;  
 2-benciloxi-N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-acetamida;  
 N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenil-acetamida;
- 30 [3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;  
 N-[3-(2,4-dimetoxi-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;
- 35 N-(3-bifenil-4-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-4-etil-benzamida;  
 N-(3-bifenil-4-il-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-etil-3-metoxi-benzamida;  
 4-etil-N-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-benzamida;
- 40 N-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4] oxadiazol-4-il)-benzamida;  
 (5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;
- 45 1-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-3-fenil-urea;  
 N-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-fenoxi-acetamida;  
 2-benciloxi-N-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-acetamida;
- 50 N-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-2-fenil-acetamida;  
 (5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- 55 2-etil-N-(5-etil-5-metil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-3-metoxi-benzamida;  
 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-4-etil-benzamida;  
 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-benzamida;
- 60 3-cloro-N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2,2,3,3-tetrafluoro-propionamida;  
 éster etílico del ácido N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-succinámico;
- 65 [3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;

- 1-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-fenil-urea;  
 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenoxi-acetamida;
- 5 2-benciloxi-N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-acetamida;  
 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-fenil-acetamida;
- 10 [3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;  
 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;  
 4-etil-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-benzamida;
- 15 N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-benzamida;  
 3-cloro-2,2,3,3-tetrafluoro-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-propionamida;  
 éster etílico del ácido N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-succinámico;
- 20 (3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;  
 1-fenil-3-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-urea;
- 25 2-fenoxi-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-acetamida;  
 2-benciloxi-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-acetamida;
- 30 2-fenil-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-acetamida;  
 (3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- 35 2-etil-3-metoxi-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-benzamida;  
 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-4-etil-benzamida;
- 40 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-benzamida;  
 3-cloro-N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-2,2,3,3-tetrafluoro-propionamida;  
 éster etílico del ácido N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-succinámico;
- 45 [3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-amida del ácido benzo[b]tiofen-2-carboxílico;  
 1-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-3-fenil-urea;
- 50 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-2-fenoxi-acetamida;  
 2-benciloxi-N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-acetamida;
- 55 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-2-fenil-acetamida;  
 [3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- 60 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;  
 4-etil-N-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-benzamida;
- 65 N-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-benzamida;  
 1-fenil-3-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-urea;
- 2-fenoxi-N-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-acetamida;
- 2-benciloxi-N-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-acetamida;



- 2-fenil-N-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-acetamida;
- 2-etil-3-metoxi-N-(3-fenil-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il)-benzamida;
- 5 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-4-etil-benzamida;
- N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-benzamida;
- 10 1-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-3-fenil-urea;
- N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-2-fenoxi-acetamida;
- 2-benciloxi-N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-acetamida;
- 15 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-2-fenil-acetamida;
- [3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-amida del ácido furan-2-carboxílico;
- N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-2-etil-3-metoxi-benzamida;
- 20 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.5]-7,8-benzo-dec-2-en-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida;
- N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1,8-dioxa-2,4-diaza-espiro[4.5]dec-2-en-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida;
- 25 N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5,5-dimetil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-3-metoxi-2-metil-benzamida;
- N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-4-etil-2-fluoro-benzamida;
- 30 4-etil-2-fluoro-N-(3-fenil-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il)-benzamida;
- N-[3-(3,5-dimetil-fenil)-1-oxa-2,4-diaza-espiro[4.4]non-2-en-4-il]-4-etil-2-fluoro-benzamida;
- N-(5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-4-etil-2-fluoro-benzamida;
- 35 (5,5-dimetil-3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-4-il)-amida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico; y
- [3-(3,5-dimetil-fenil)-5-etil-5-metil-[1,2,4]oxadiazol-4-il]-amida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico.
- 40 6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la modulación de la expresión de un gen diana en una célula huésped, en el que la célula huésped incluye un primer casete de expresión génica que comprende un primer polinucleótido que codifica para un primer polipéptido que comprende:
- 45 (i) un dominio de transactivación,
- (ii) un dominio de unión a ADN, y
- (iii) un dominio de unión a ligando del receptor nuclear de grupo H;
- 50 un segundo casete de expresión génica que comprende:
- (i) un elemento de respuesta que puede unirse a dicho dominio de unión a ADN,
- (ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación, y
- 55 dicho gen diana.
7. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la fabricación de un medicamento para modular la expresión de un gen diana en una célula huésped, en el que la célula huésped incluye un primer casete de expresión génica que comprende un primer polinucleótido que codifica para un primer polipéptido que comprende:
- 60 (i) un dominio de transactivación,
- 65 (ii) un dominio de unión a ADN, y

(iii) un dominio de unión a ligando del receptor nuclear de grupo H;

un segundo casete de expresión génica que comprende:

5 (i) un elemento de respuesta que puede unirse a dicho dominio de unión a ADN,

(ii) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación, y

(iii) dicho gen diana.

10 8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la modulación de la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto.

15 9. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la regulación de la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico que comprende poner en contacto dicho compuesto con un complejo de receptor de ecdisona dentro de las células del sujeto, en el que las células contienen además una secuencia de unión a ADN para el complejo de receptor de ecdisona cuando está en combinación con dicho compuesto y en el que la formación de un complejo de receptor de ecdisona-compuesto-secuencia de unión a ADN induce la expresión del gen.

20 10. Compuesto según la reivindicación 9, en el que el complejo de receptor de ecdisona es un complejo de receptor de ecdisona quimérico y el constructo de ADN comprende además un promotor.

25 11. Compuesto según la reivindicación 9, en el que el sujeto es una planta.

12. Compuesto según la reivindicación 9, en el que el sujeto es un mamífero.

30 13. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la fabricación de un medicamento para regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico que comprende poner en contacto dicho compuesto con un complejo de receptor de ecdisona dentro de las células del sujeto, en el que las células contienen además una secuencia de unión a ADN para el complejo de receptor de ecdisona cuando está en combinación con dicho compuesto y en el que la formación de un complejo de receptor de ecdisona-compuesto-secuencia de unión a ADN induce la expresión del gen.

35 14. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la modulación de la expresión de un gen en una célula huésped que comprende las etapas de:

a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica que comprende:

40 i) un primer casete de expresión génica que puede expresarse en una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un primer polipéptido híbrido que comprende:

(a) un dominio de unión a ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado con un gen cuya expresión va a modularse; y

45 (b) un dominio de unión a ligando del receptor de ecdisona;

ii) un segundo casete de expresión génica que puede expresarse en la célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un segundo polipéptido híbrido que comprende:

50 (a) un dominio de transactivación; y

(b) un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide quimérico; y

55 iii) un tercer casete de expresión génica que puede expresarse en una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido que comprende:

(a) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión a ADN del primer polipéptido híbrido;

60 (b) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido; y

(c) un gen cuya expresión va a modularse; y

b) introducir en la célula huésped dicho compuesto.

65 15. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la fabricación de un medicamento

para modular la expresión de un gen en una célula huésped que comprende las etapas de:

a) introducir en la célula huésped un sistema de modulación de la expresión génica que comprende:

5 i) un primer casete de expresión génica que puede expresarse en una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un primer polipéptido híbrido que comprende:

(a) un dominio de unión a ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado con un gen cuya expresión va a modularse; y

10 (b) un dominio de unión a ligando del receptor de ecdisona;

ii) un segundo casete de expresión génica que puede expresarse en la célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un segundo polipéptido híbrido que comprende:

15 (a) un dominio de transactivación; y

(b) un dominio de unión a ligando del receptor X retinoide quimérico; y

20 iii) un tercer casete de expresión génica que puede expresarse en una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido que comprende:

(a) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión a ADN del primer polipéptido híbrido;

25 (b) un promotor que se activa mediante el dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido; y

(c) un gen cuya expresión va a modularse; y

30 b) introducir en la célula huésped dicho compuesto.

16. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la producción de un polipéptido que comprende las etapas de:

35 a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a dicho compuesto;

b) introducir en la célula:

1) un constructo de ADN que comprende:

40 i) un gen exógeno que codifica para el polipéptido; y

ii) un elemento de respuesta;

en el que el gen está bajo el control del elemento de respuesta; y

45 2) un complejo de receptor de ecdisona que comprende:

i) un dominio de unión a ADN;

50 ii) un dominio de unión para dicho compuesto; y

iii) un dominio de transactivación; y

55 c) exponer la célula a dicho compuesto.

17. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la fabricación de un medicamento para producir un polipéptido que comprende las etapas de:

60 a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a dicho compuesto;

b) introducir en la célula:

1) un constructo de ADN que comprende:

65 i) un gen exógeno que codifica para el polipéptido; y

ii) un elemento de respuesta;

en el que el gen está bajo el control del elemento de respuesta; y

5 2) un complejo de receptor de ecdisona que comprende:

i) un dominio de unión a ADN;

ii) un dominio de unión para dicho compuesto; y

10

iii) un dominio de transactivación; y

c) exponer la célula a dicho compuesto.