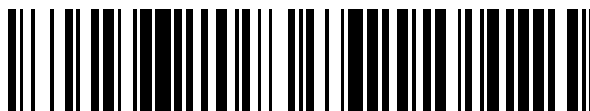


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 366**

51 Int. Cl.:

C07D 319/18 (2006.01)

C07C 243/38 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61K 31/166 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2004 E 11193098 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2460786**

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

30 Prioridad:

28.02.2003 US 455741 P

26.02.2004 US 787906

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

12.04.2016

73 Titular/es:

INTREXON CORPORATION (100.0%)

1750 Kraft Drive, Suite 1400

Blacksburg, VA 24060, US

72 Inventor/es:

HORMANN, ROBERT EUGENE;

POTTER, DAVID, W.;

CHORTYK, ORESTES;

TICE, COLIN, M.;

CARLSON, GLENN, RICHARD;

MEYER, ANDREW y

OPIE, THOMAS, R.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 566 366 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 diacilhidrazina biodisponibles para modular la expresión de genes exógenos a través de un complejo receptor de ecdisona

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología o de la ingeniería genética. Específicamente, la presente invención se refiere al campo de la expresión génica. Más específicamente, la presente invención se refiere a ligandos no esteroideos para receptores nucleares naturales y mutados y su uso en un sistema de expresión génica inducible basado en un receptor nuclear y a los métodos para modular la expresión de un gen dentro de una célula hospedadora usando estos ligandos y el sistema de expresión génica.

Antecedentes de la invención

En el presente documento se citan diversas publicaciones. Sin embargo, la cita de cualquier referencia en el presente documento no debe construirse como una admisión de que tal referencia está disponible como "Técnica Anterior" a la presente solicitud.

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 un número de interacciones proteína-proteína específicas. Para que se active la expresión génica, de tal manera que produzca el ARN necesario como el primer paso en la síntesis de proteínas, debe llevarse un activador transcripcional a la proximidad de un promotor que controle la transcripción génica. Típicamente, el activador transcripcional por sí mismo se asocia a una proteína que tiene al menos un dominio de unión al ADN que se une a los sitios de unión al ADN presentes en las regiones promotoras de los genes. De esta manera, para que se dé la expresión génica, una proteína que comprende un dominio de unión al ADN y un dominio de transactivación localizado a una distancia apropiada del dominio de unión al ADN debe llevarse a la posición correcta en la región promotora del gen.

La aproximación transgénica tradicional utiliza un promotor específico de tipo celular para dirigir la expresión de un transgen diseñado. Una construcción de ADN que contiene el transgen se incorpora en primer lugar en un genoma hospedador. Cuando se activa por un activador transcripcional, la expresión del transgen se da en un tipo celular dado.

Otro medio para regular la expresión de genes extraños en células es a través de promotores inducibles. Los ejemplos del uso de tales promotores inducibles incluyen el promotor PR1-a, los sistemas procarióticos represor-operador, los sistemas inmunosupresores-inmunofilina y los sistemas de activación de la transcripción eucarióticos superiores, tales como los sistemas del receptor de hormonas esteroideas y se describen a continuación.

El promotor PR1-a del tabaco se induce durante la respuesta de resistencia sistémica adquirida que sigue a un ataque patógeno. El uso del PR1-a puede limitarse debido a que normalmente responde a materiales endógenos y a factores externos tales como patógenos, radiación UV-B y contaminantes. Se han descrito sistemas de regulación génica basados en los promotores inducidos por choque térmico, interferón y metales pesados (Wurn et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83:5414-5418; Arnheiter 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 en la expresión de genes no objetivo. Estos sistemas también son filtrantes.

Los sistemas procarióticos de represor-operador utilizan proteínas represoras bacterianas y las secuencias de ADN operadoras únicas a las que se unen. Tanto el sistema represor-operador de tetraciclina ("Tet") como el de lactosa ("Lac") de la bacteria *Escherichia coli* se han usado 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 dé la transcripción. En el sistema Lac, se activa un operón Lac en respuesta a la presencia de lactosa o de análogos sintéticos tales como isopropil-b-D-tiogalactósido. Desafortunadamente, el uso de tales sistemas se restringe por la química inestable de los ligandos, es decir, la tetraciclina y la lactosa, su toxicidad, su presencia natural o los niveles relativamente altos requeridos para la inducción o la represión. Por razones similares, la utilidad de tales sistemas en animales se limita.

Las moléculas inmunosupresoras tales como FK506, rapamicina y ciclosporina A pueden unirse a las inmunofilinas FKBP12, la ciclofilina, etc. Usando esta información, se ha ideado una estrategia general para reunir dos proteínas cualquiera simplemente colocando FK506 en cada una de las dos proteínas o colocando FK506 en una y ciclosporina A en una otra. Puede usarse después 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 EE.UU. 93:4604-7). Se usaron el dominio de unión al ADN Gal4 fusionado a FKBP12 y el dominio del activador VP16 fusionado a la ciclofilina y el compuesto FKCsA para mostrar la heterodimerización y la activación de un gen indicador bajo el control de un promotor que

contiene sitios de unión a Gal4. Desafortunadamente, este sistema incluye inmunosupresores que pueden tener efectos secundarios no deseados y por lo tanto, limita su uso para diversas aplicaciones de intercambio de genes de mamíferos.

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

El crecimiento, la muda y el desarrollo en insectos se regula por la hormona esteroidea ecdisona (hormona de la muda) y por las hormonas juveniles (Dhadialla, et al., 1998. Annu. Rev. Entomol. 43:545-569). La diana molecular de la ecdisona en los insectos consiste en al menos un receptor de ecdisona (EcR) y una proteína ultraespiráculo (USP). El EcR es un miembro de la súper familia de receptores esteroideos nucleares que se caracteriza por un ADN firma y dominios de unión a ligandos y un dominio de activación (Koelle et al. 1991, Cell, 67:59-77). Los receptores EcR son responsables de un número de compuestos esteroideos tales como ponasterona A y muristerona A. Recientemente, se han descrito compuestos no esteroideos con actividad agonista ecdisteroidea, incluyendo los insecticidas disponibles en el mercado tebufenozida y metoxifenozida que se comercializan en todo el mundo por Rohm and Haas Company (véase Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/EP96/00686 y la Patente de EE.UU. N.º 5.530.028). Ambos análogos tienen perfiles de seguridad excepcionales hacia otros organismos.

El receptor de ecdisona (EcR) de insectos heterodimeriza con el Ultraespiráculo (USP), el homólogo insecto del RXR mamífero, y une ecdisteroides y elementos de respuesta al receptor de ecdisona y activa la transcripción de los genes de respuesta a ecdisona. Los complejos EcR/USP/ligando juegan papeles importantes 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, A/B (transactivación), C (unión al ADN, heterodimerización), D (bisagra, heterodimerización), E (unión a ligando, heterodimerización y transactivación y dominios F (transactivación)). Algunos de estos dominios tales como A/B, C y E retienen su función cuando se fusionan a otras proteínas.

Los sistemas de expresión génica inducibles regulados de forma ajustada o "interruptores génicos" son útiles para diversas aplicaciones tales como terapia génica, producción a gran escala de proteínas en células, ensayos de exploración de alto rendimiento basados en células, genómica funcional y regulación de rasgos en plantas y animales transgénicos.

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

Las Solicitudes de Patente Internacional N.º PCT/US97/05330 (documento WO 97/38117) y N.º PCT/US99/08381 (documento WO99/58155) desvelan métodos para modular la expresión de un gen exógeno en el que la construcción de ADN que comprende el gen exógeno y un elemento de respuesta a ecdisona se activa por una segunda construcción de ADN que comprende un receptor de ecdisona que, en presencia de un ligando del mismo y, opcionalmente en presencia de un receptor capaz de actuar como un compañero silencioso, se une al elemento de respuesta a ecdisona para inducir la expresión génica. El receptor de ecdisona de elección se aisló de *Drosophila melanogaster*. Típicamente, tales sistemas requieren la presencia del compañero silencioso, preferentemente el receptor X del retinoide (RXR), para proporcionar una activación óptima. En células de mamíferos, el receptor de ecdisona (EcR) de insectos heterodimeriza con el receptor X de retinoide (RXR) y regula la expresión de genes diana de forma dependiente de ligando. La Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US98/4215 (documento WO 99/02683) desvela que el receptor de ecdisona aislado de la polilla de la seda *Bombyx mori* es funcional en sistemas mamíferos sin la necesidad de un compañero dímero exógeno.

La Patente de EE.UU. n.º 6.265.173 B1 desvela que diversos miembros de la familia esteroidea/tiroidea de receptores pueden combinarse con el receptor del ultraespiráculo (USP) de *Drosophila melanogaster* o fragmentos del mismo que comprenden al menos el dominio de dimerización del USP para usar en un sistema de expresión génica. La Patente de EE.UU. n.º 5.880.333 desvela un sistema de heterodímero del EcR y el ultraespiráculo (USP) de *Drosophila melanogaster* usado en plantas en el que el dominio de transactivación y el dominio de unión al ADN se posicionan en dos proteínas híbridas diferentes. Desafortunadamente, estos sistemas basados en USP son constitutivos en células 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 al ADN (bien como EcR nativo como en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US98/14215 o bien como EcR modificado como en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US97/05330) se incorporaron en una única molécula y los otros compañeros heterodiméricos, 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 usar tanto en plantas como en animales (véase la Patente de EE.UU. n.º 5.880.333). Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de sistemas basados en EcR mejorados para modular de forma precisa 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 proteínas y anticuerpos, ensayos de exploración de alto rendimiento basados en células, genómica funcional y regulación de rasgos en animales transgénicos. Para ciertas aplicaciones tales como la terapia génica, puede ser deseable tener un sistema de expresión génica inducible que responda bien a los ligandos no esteroideos sintéticos y que al mismo tiempo sea insensible a los esteroideos naturales. De esta manera, los sistemas mejorados que son simples, compactos y dependientes de ligandos que son relativamente baratos, fácilmente disponibles y de baja toxicidad para el hospedador serían útiles para regular sistemas biológicos.

Recientemente, se ha demostrado que un sistema de expresión génica inducible basado en el receptor de ecdisona en el que los dominios de transactivación y de unión al ADN están separados entre sí colocándolos en dos proteínas diferentes da como resultado una actividad de fondo muy reducida en ausencia de un ligando y una actividad significativamente aumentada sobre el fondo en presencia de un ligando (solicitud pendiente n.º PCT/US01/09050). Este sistema de doble híbrido es un sistema de modulación de la expresión génica inducible significativamente mejorado en comparación con los dos sistemas descritos en las solicitudes n.º PCT/US97/05330 y n.º PCT/US98/14215. El sistema de doble híbrido aprovecha la capacidad de un par de proteínas que interactúan para llevar al dominio de activación de la transcripción a una posición más favorable con respecto al dominio de unión al ADN de tal manera que cuando el dominio de unión al ADN se une al sitio de unión al ADN en el gen, el dominio de transactivación activa más eficazmente el promotor (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 5.283.173). Brevemente, el sistema de expresión génica de doble híbrido comprende dos casetes de expresión génica; la primera codifica un dominio de unión al ADN fusionado a un polipéptido receptor nuclear y el segundo codifica un dominio de transactivación fusionado a un polipéptido receptor nuclear diferente. En presencia del ligando, la interacción del primer polipéptido con el segundo polipéptido ata de forma eficaz el dominio de unión al ADN al dominio de transactivación. Ya que los dominios de unión al ADN y de transactivación residen en dos moléculas diferentes, la actividad de fondo en ausencia de ligando se reduce mucho.

Un sistema de doble híbrido también proporciona sensibilidad mejorada a los ligandos no esteroideos por ejemplo, diacilhidrazinas, cuando se compara con los ligandos esteroideos por ejemplo, ponasterona A ("PonA") o muristerona A ("MurA"). Esto es, cuando se compara con los esteroideos, los ligandos no esteroideos proporcionan una mayor actividad a una menor concentración. Además, ya que la transactivación basada en interruptores de genes EcR es normalmente dependiente de la línea celular, es más fácil adaptar los sistemas interruptores para obtener la capacidad de transactivación máxima para cada aplicación. Adicionalmente, el sistema de doble híbrido evita algunos efectos secundarios debidos a la sobreexpresión de RXR que se dan normalmente cuando se usa RXR sin modificar como un compañero de interrupción. En un sistema de doble híbrido preferido, los dominios nativos de unión al ADN y de transactivación de EcR o de RXR se eliminan y como resultado, estas moléculas híbridas tienen menos oportunidades de interactuar con otros receptores de hormonas esteroideas presentes en la célula dando como resultado efectos secundarios reducidos.

El documento WO02/066614 desvela un sistema de expresión génica inducible basada en el receptor de ecdisona/receptor X del retinoide quimérico y métodos para modular la expresión génica en una célula hospedadora.

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 mayor actividad que aquellos que actualmente existen. La patente de EE.UU. n.º 6.258.603 B1 (y las patentes citadas en la misma) desveló ligandos de dibenzilhidrazina, sin embargo, existe una necesidad de ligandos adicionales con estructuras y propiedades fisicoquímicas diferentes. Los presentes inventores han descubierto nuevos ligandos de diacilhidrazina que no se han descrito o mostrado previamente que tienen la capacidad de modular la expresión de transgenes.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;

- N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida de ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 5 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 10 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 15 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico.
- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora aislada, en la que la célula hospedadora incluye una primera casete de expresión génica que
 25 comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende:
- (i) un dominio de transactivación;
 (ii) un dominio de unión al ADN; y
 (iii) un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H;
- 30 una segunda casete de expresión génica que comprende:
- (i) un elemento de respuesta capaz de unirse a dicho dominio de unión al ADN;
 (ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación; y
 35 (iii) dicho gen diana;
- comprendiendo el método poner en contacto dicha célula hospedadora con un compuesto de la presente invención.
- La presente invención proporciona, en un aspecto adicional, un compuesto de la presente invención para su uso en
 40 la condificación de proteínas biológicamente activas para el tratamiento de enfermedades, que comprende modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto.
- La presente invención proporciona, en otro aspecto, un método para regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico no animal o no humano que comprende poner en contacto un ligando con un
 45 complejo receptor de ecdisona dentro de las células del sujeto, en el que las células contienen además una secuencia de unión al ADN para el complejo receptor de ecdisona cuando junto con el ligando y en el que la formación de un complejo de complejo receptor de ecdisona-ligando-secuencia de unión al ADN induce la expresión del gen y donde el ligando es un compuesto de la presente invención.
- La presente invención proporciona, en un aspecto adicional, un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora aislada que comprende las etapas de:
- a) introducir en la célula hospedadora un sistema de modulación de la expresión génica que comprende:
- 55 i) una primera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido híbrido que comprende:
- (a) un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y
 60 (b) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona;
- ii) una segunda casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido híbrido que comprende:
- 65 (a) un dominio de transactivación; y
 (b) un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide quimérico; y

iii) una tercera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende:

- 5 (a) un elemento de respuesta reconocido por dicho dominio de unión al ADN del primer polipéptido híbrido;
- (b) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido; y
- (c) un gen cuya expresión ha de modularse; y

b) introducir en la célula hospedadora un compuesto de la presente invención.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido en una célula hospedadora aislada que comprende las etapas de:

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

15 b) introducir en la célula:

1) una construcción de ADN que comprende:

- 20 i) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y
- ii) un elemento de respuesta;

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

2) una construcción de ADN que codifica un complejo receptor de ecdisona que comprende:

- 25 i) un dominio de unión al ADN;
- ii) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona; y
- iii) un dominio de transactivación; y

30 c) exponer la célula a dicho compuesto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la fabricación de un medicamento para:

35 1) modular la expresión de un gen en una célula hospedadora, que comprende poner en contacto dicha célula hospedadora con dicho compuesto, en la que dicha célula hospedadora incluye una primera casete de expresión génica que comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende:

- (i) un dominio de transactivación;
- 40 (ii) un dominio de unión al ADN; y
- (iii) un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H;

una segunda casete de expresión génica que comprende:

- 45 (i) un elemento de respuesta capaz de unirse a dicho dominio de unión al ADN;
- (ii) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación; y
- (iii) dicho gen diana;

2) modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto;

50 3) regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico que comprende poner en contacto dicho compuesto con un complejo receptor de ecdisona en las células de dicho sujeto, en el que dichas células contienen adicionalmente una secuencia de unión al ADN para dicho complejo receptor de ecdisona que junto con dicho compuesto y en el que la formación de un complejo de complejo receptor de ecdisona-compuesto-secuencia de unión al ADN induce la expresión de dicho gen;

55 4) modular la expresión de un gen en una célula hospedadora que comprende las etapas de:

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

60 i) una primera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido híbrido que comprende:

- (a) un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y
- (b) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona;

65

ii) una segunda casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido híbrido que comprende:

(a) un dominio de transactivación; y

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

iii) una tercera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende:

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

(b) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación de dicho segundo polipéptido híbrido; y

(c) un gen cuya expresión ha de modularse; y

b) introducir en dicha célula hospedadora dicho compuesto; o

5) producir un polipéptido que comprende las etapas de:

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

b) introducir en dicha célula:

1) una construcción de ADN que comprende:

i) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y

ii) un elemento de respuesta;

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

2) una construcción de ADN que codifica un complejo receptor de ecdisona que comprende:

i) un dominio de unión al ADN;

ii) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona; y iii) un dominio de transactivación; y

c) exponer dicha célula a dicho compuesto.

La presente invención se refiere a ligandos no esteroideos para usar en un sistema de expresión génica inducible basado en un receptor nuclear, y a métodos para modular la expresión de un gen dentro de una célula hospedadora usando estos ligandos con sistemas de expresión génica inducibles basados en receptores nucleares.

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

Figura 1. Esquema de una construcción de interruptor CVBE y la construcción de indicador 6XEcre Lac Z. Ambas construcciones están flanqueadas por repeticiones terminales largas, G418 y puromicina son marcadores seleccionables, CMV es el promotor del citomegalovirus, VBE es la secuencia que codifica los aminoácidos 26-546 del EcR de *Bombyx mori* insertados aguas abajo del dominio de transactivación VP16, 6X EcRE son seis copias del elemento de respuesta a ecdisona, lacZ codifica la enzima indicadora β-galactosidasa.

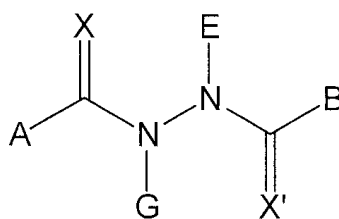
Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona ligandos para usar con el sistema de expresión génica inducible basada en el receptor de ecdisona útiles para modular la expresión de un gen de interés en una célula hospedadora. En un medio

particularmente deseable, la descripción 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. De esta manera, los ligandos de la solicitud y el sistema de expresión génica inducible y su uso en los métodos para modular la expresión génica en una célula hospedadora superan las limitaciones de los sistemas de expresión inducibles actualmente disponibles y proporcionan al experto en la materia un medio eficaz para controlar la expresión génica.

La presente invención es útil para aplicaciones tales como terapia génica, producción de proteínas y anticuerpos a gran escala, ensayos de exploración de alto rendimiento basados en células, genómica funcional, metabolómica y regulación de rasgos en organismos transgénicos, donde es deseable el control de los niveles de expresión génica. Una ventaja de la presente invención es que proporciona un medio para regular la expresión génica y para adaptar los niveles de expresión para ajustarse a los requerimientos del usuario.

La presente descripción concierne a los compuestos de la fórmula general:



en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-(CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenilo (C₁-C₆); alquilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alqueno opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquino (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcóxicarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a; sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-N-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄;

B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-(CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenilo (C₁-C₆); alquilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alqueno opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquino (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcóxicarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a; sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄;

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcóxicarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -CONR^aR^b; amino; alquilamino (C₁-C₆); dialquilamino (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye -CF₃; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado (C₄-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo (C₅-C₆); fenilo; alqueno (C₂-C₃); hidroxilo, alcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcocarbonilo (C₁-C₆); alcianoilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); formilo; trialkilsililo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -C=N-OR^a; -C=N-R^d; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

en el que R^a, R^b y R^c son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; R^d es hidroxialquilo (C₁-C₆); y n = 1-4; y

G es H o CN;

con la condición de que:

1) cuando E es alquilo ramificado (C₄-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; alqueno (C₂-C₃); carboxi; o alcocarbonilo (C₁-C₆); entonces B es

(a) fenilo sustituido que lleva al menos un grupo -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

(b) heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares que lleva al menos un grupo haloalquilo; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a, R^b son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; o

2) cuando E es alquilo ramificado (C₄-C₁₀) sustituido que lleva al menos uno de fenilo; hidroxilo, alcoxi (C₁-C₆); o formilo; entonces B es

(a) fenilo sustituido que lleva al menos un grupo -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

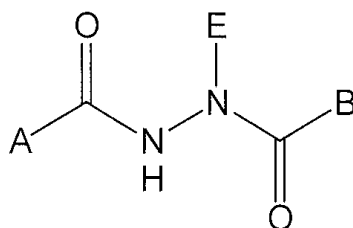
(b) heterociclo de 6 miembros sustituido o no sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo.

Se prefieren los compuestos de fórmula general cuando X y X' son O y G es H.

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



Compuesto	A	B	E
RG-100864	4-Cl-Ph	Ph	t-Bu
RG-101013	4-Et-Ph	2-NO ₂ -Ph	t-Bu
RG-101542	4-CH ₃ -Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-102125	4-Et-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100801	2,6-di-F-Ph	3-Cl, 5-Cl-Ph	t-Bu
RG-101202	2-CH ₃ , 3-Cl-Ph	3-Cl-Ph	t-Bu
RG-101248	2-Cl, 3-OMe-Ph	2-Cl-5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101664	2-CH ₃ , 3-Cl-Ph	3-CH ₃ -4-Br-Ph	t-Bu
RG-101862	4-Et-Ph	3,5-di-CH ₃ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-101863	4-Et-Ph	3,4-di-CH ₃ -5-Cl-Ph	t-Bu
RG-101057	4-OCH ₃ -Ph	2-Cl-4-F-Ph	t-Bu
RG-101774	4-Et-Ph	3-CH ₃ , 5-Cl-Ph	t-Bu

ES 2 566 366 T3

Compuesto	A	B	E
RG-102592	4-Et-Ph	2-Et-Ph	t-Bu
RG-101376	4-OCH ₃ -Ph	3-Cl, 5-Cl-Ph	t-Bu
RG-101398	4-Et-Ph	2-NO ₂ -5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100875	4-CH ₂ CN-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100694	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	3-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101759	4-Br-Ph	3-Cl, 5-Cl-Ph	t-Bu.
RG-100915	2-CH ₃ , 3-NO ₂ -Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100763	2-CH ₃ , 3-CH ₃ -Ph	2,5-di-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101178	2-CH ₃ , 3-CH ₃ -Ph	2-OCH ₃ -5-Cl-Ph	t-Bu
RG-100568	2-NO ₂ , 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100764	2-CH ₃ , 3-CH ₃ -Ph	3-OMe, 5-OMe-Ph	t-Bu
RG-101864	3-Cl, 4-Et-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100342	4-CH(OH)CH ₃ -Ph	3-F, 5-F-Ph	t-Bu
RG-101316	2-CH ₃ , 3-MMe ₂ -Ph	3-Cl, 5-Cl-Ph	t-B
RG-100814	2-CH ₃ , 3-Ac-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100749	2-CH ₃ , 3-OAc-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101734	2-CH ₃ , 3-I-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101408	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	3-Cl, 5-Br-Ph	t-Bu
RG-101670	2-CH ₃ , 3-Oi-Pr-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100127	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	2-Cl-3-piridil	t-Bu
RG-100766	2-CH ₃ , 3-OMc-Ph	2-OCH ₃ -5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100603	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2,5-F-Ph	t-Bu
RG-101062	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2-Et-Ph	t-Bu
RG-101353	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-Br-Ph	t-Bu
RG-100767	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	3-OMe, 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100848	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-101692	2-CH ₃ , 3-OCF ₃ -Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100768	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	3-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101585	3-OCH ₃ , 4-CH ₃ -Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100769	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100394	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	2,5-di-Cl-4-piridilo	t-Bu
RG-100569	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2-NO ₂ -5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100929	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2-F-4-Cl-Ph	t-Bu
RG-101048	3,4-OCH ₂ O-Ph	2-Cl-4-F-Ph	t-Bu
RG-102240	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101691	2-CH ₃ , 3-Et-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101531	3-CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101382	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	3,5-di-Cl-4-F-Ph	t-Bu
RG-100448	2-CH ₃ , 3,4-OCH ₂ O-Ph	4-F-Ph	t-Bu
RG-100698	2-Et, 3,4-OCH ₂ O-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101889	3,4-di-Et-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100812	2-Et, 3-OMe-Ph	4-F-Ph	t-Bu
RG-100725	2-Et, 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100524	2-CH ₃ , 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -4-F-Ph	t-Bu
RG-100667	2-Et, 3-OCH ₃ -Ph	2-Cl-6-CH ₃ -4-piridilo	t-Bu
RG-100778	2-Et, 3-OMe-Ph	3-OMe, 5-OMe-Ph	t-Bu
RG-101528	2-I, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100492	3,4-etilendioxi-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101887	3,4-(CH ₂) ₄ -Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115496	2-Et, 3-OMe-Ph	2,3-OCH ₂ O-Ph	t-Bu
RG-100901	2-F, 4-Et-Ph	4-F-Ph	t-Bu
RG-100699	2-Et, 3-OMe-Ph	3,4-metilendioxi-Ph	t-Bu
RG-100425	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	4-F-Ph	t-Bu
RG-101511	3,4-OCH(CH ₃)O-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101659	2-Et, 3,4-OCH(CH ₃)O-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-B
RG-100360	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3-OCH ₃ -Ph	t-Bu

ES 2 566 366 T3

Compuesto	A	B	E
RG-101509	3-OCH(CH ₃)CH ₂ O-4-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101340	2-Br, 3,4-etilendioxi-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101494	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	3-CH ₃ , 5-Cl-Ph	t-Bu
RG-101036	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	3-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100690	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100691	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	3-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101312	3-S-C=N-4-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101218	2-Et, 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-100779	2-Et, 3-OMe-Ph	2,5-di-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101088	2-CH ₃ , 4,5-metilendioxi-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-101016	3-CH ₂ OCH ₂ O-4-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100216	2-CH ₃ , 3-OCH ₂ OCH ₂ -4-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100574	2-Et, 3-OCH ₂ OCH ₂ -4-Ph	4-F-Ph	t-Bu
RG-101171	2-Cl 4,5-metilendioxi-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-100620	2,3,6-tri-F-Ph	2-Cl-4-F-Ph	t-Bu
RG-115033	2-Et, 3-OMe-Ph	2,6-F-Ph	t-Bu
RG-115515	2-Et, 3-OMe-Ph	3-F-Ph	t-Bu
RG-115038	2-Et, 3-OMe-Ph	3-Br-Ph	t-Bu
RG-115330	2-Et, 3-OMe-Ph	2-NO ₂ -Ph	t-Bu
RG-115627	2-Et, 3-OMe-Ph	2,3-F-Ph	t-Bu
RG-115329	2-Et, 3-OMe-Ph	3,4,5-tri-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115088	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CF ₃ , 5-F-Ph	t-Bu
RG-115327	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CN-Ph	t-Bu
RG-115534	2-Vinilo, 3-OMe-Ph	2,4-di-Cl-5-F-Ph	t-Bu
RG-115046	2-Et, 3-OCH ₂ OCH ₂ -4-Ph	Ph	t-Bu
RG-115025	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ C(O)OEt
RG-115143	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH ₂ OH
RG-115407	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CHO
RG-115006	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH ₂ OCH ₃
RG-115258	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH=NOH
RG-115378	2-NH ₂ , 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115223	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₂ OAc, 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115310	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH ₂ OC(O)C H ₃
RG-115567	2-CH ₃ , 3-OH-Ph	2,3,4-F-Ph	t-Bu
RG-115443	2-CH ₃ , 3-OH-Ph	3-Cl-5-OCH ₃ -4-piridilo	t-Bu
RG-115261	2-CH ₃ , 3-OH-Ph	2,6-di-Cl-4-piridilo	t-Bu
RG-115595	2-CH ₃ , 3-OH-Ph	3-OCH ₃ -4-piridilo	t-Bu
RG-115220	2-CH ₃ , 3-OH-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115102	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115302	2-Et, 3-OMe-Ph	2,4-di-Cl-5-F-Ph	t-Bu
RG-115539	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2,4-di-Cl-5-F-Ph	t-Bu
RG-115499	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2-F, 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115055	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ - Ph	t-Bu
RG-115508	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2,5-F-Ph	t-Bu
RG-115580	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2,3,4-F-Ph	t-Bu
RG-115337	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2,3,4,5-h	t-Bu
RG-115280	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	3-CF ₃ -4-F-Ph	t-Bu
RG-115297	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2,6-di-Cl-4-piridilo	t-Bu
RG-115244	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115684	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2,4-di-Cl-5-F-Ph	t-Bu
RG-115514	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	2-F,4-Cl-Ph	t-Bu

ES 2 566 366 T3

Compuesto	A	B	E
RG-115557	2-CH ₃ , 3-OAc-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115253	2-Et, 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -5-Cl-Ph	t-Bu
RG-115085	2-Et, 3,4-OCH ₂ O-Ph	2-OCH ₃ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-115551	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2-OCH ₃ -5-Cl-Ph	t-Bu
RG-115162	2-Et, 3-OMe-Ph	2-NO ₂ -5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115647	2-Et, 3-OMe-Ph	2-NO ₂ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-115257	2-Et, 3-OMe-Ph	2-NO ₂ -5-Cl-Ph	t-Bu
RG-115664	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2-NO ₂ -5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115171	Benzo[1.2.5]oxadiazol-5-ilo	2-OCH ₃ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-115480	2-Vinilo, 3-OMe-Ph	2-Cl, 5-NO ₂ -Ph	t-Bu
RG-115095	2-Vinilo, 3-OMe-Ph	2-OCH ₃ -4-Cl-Ph	t-Bu
RG-115106	2-Et, 3-OCH ₃ -Ph	1-metil-1H-indol-2-ilo	t-Bu
RG-115130	2-Et, 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115532	2-Cl, 3-CH ₂ OCH ₂ O-4-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115167	2-F, 4-Et-Ph	3-NO ₂ -Ph	t-Bu
RG-115269	2-F, 4-Et-Ph	3-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115441	2-Cl, 3-CH ₂ OCH ₂ O-4-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115128	2-F, 4-Et-Ph	2,6-di-Cl-4-piridilo	t-Bu
RG-115077	2-F, 4-Et-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115259	2-F, 4-Et-Ph	3,4,5-F-Ph	t-Bu
RG-115674	2-F, 4-Et-Ph	3-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115422	2-F, 4-Et-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115086	2-F, 4-Et-Ph	2-NO ₂ -5-F-Ph	t-Bu
RG-115592	2-F, 4-Et-Ph	2-OCH ₂ CF ₃ , 5-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115112	2-F, 4-Et-Ph	2-Cl-6-CH ₃ -4-piridilo	t-Bu
RG-115050	2-F, 4-Et-Ph	2,6-di-OCH ₃ -3-piridilo	t-Bu
RG-115689	3-NH-C=C-4-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115199	2-Et, 3-OMe-Ph	2-S(O)CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115352	3,4-OCF ₂ O-Ph	2-NO ₂ -Ph	t-Bu
RG-115256	3,4-OCF ₂ O-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115683	3,4-OCF ₂ O-Ph	3-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115648	2-Et, 3-OMe-Ph	3-Br-Ph	-C(CH ₃) ₂ CN
RG-115306	2-CH ₂ OMe, 3-OMe-Ph	3,5-di-Cl-Ph	t-Bu
RG-115625	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH=NOH, 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115429	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH=NNHCONH ₂ , 5-CH ₃ -Ph	t-B
RG-115613	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH=NNHCOCONH ₂ , 5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115043	2-Et, 3-OMe-Ph	3-CH ₃ , 5-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CN
RG-115690	2-Et, 3-OMe-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CN
RG-115065	2-Et, 3-OCH ₂ OCH ₂ -4-Ph	2-OCH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115229	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2,4,5-F-Ph	t-Bu
RG-115575	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3,4,5-F-Ph	t-Bu
RG-115278	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3-F-Ph	t-Bu
RG-115260	2-Et, 3,4-OCH ₂ O-Ph	3-CF ₃ -Ph	t-Bu
RG-115118	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	4-F-Ph	t-Bu
RG-115416	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3,4-F-Ph	t-Bu
RG-115207	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3,5-di-F-Ph	t-Bu
RG-115518	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	2,3,4,5-tetra-F-Ph	t-Bu
RG-115611	2-Et, 3-OCH ₂ OCH ₂ -4-Ph	4-CH ₃ -Ph	tBu

ES 2 566 366 T3

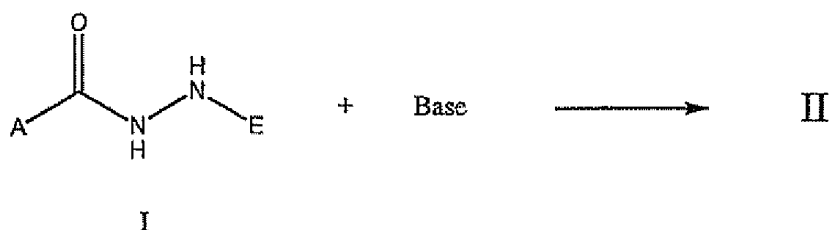
Compuesto	A	B	E
RG-115191	2-Et, 3-OMe-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-OAc-Ph	t-Bu
RG-115116	2-Et, 3-OMe-Ph	3,5-di-OCH ₃ -OH-Ph	tBu
RG-115637	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115517	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	2,6-di-OCH ₃ -3-piridilo	t-Bu
RG-115536	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	2,6-di-Cl-4-piridilo	t-Bu
RG-115350	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3-F-Ph	t-Bu
RG-115169	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3-CF ₃ , 5-F-Ph	t-Bu
RG-115384	2-CH ₃ ,3,4-etilendioxi-Ph	2-NO ₂ -5-CH ₃ -Ph	t-Bu
RG-115783	2-etilo, 3-metoxi	4,6-dimetil-piridilo	t-B
RG-115856	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115857	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115864	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115865	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115858	2-CH ₂ CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115859	2-CH ₂ CH ₃ , 3,4--Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115866	2-CH ₂ CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115867	2-CH ₂ CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115834	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	2-metoxi-6-trifluorometil-3-piridilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115835	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-3-piridilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115849	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	2,6-dimetoxi-4-pirimidinilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115850	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,6-dimetoxi-4-piridazinilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115861	2-CH ₃ ,3-OCH ₃ -Ph	3,6-dicloro-4-piridazinilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115862	2-CH ₃ ,3-OCH ₃ -Ph	4-piridazinilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115863	2-CH ₃ ,3-OCH ₃ -Ph	3-oxo-6-metoxi-4-piridazinilo (o regiosómero)	-C(CH ₃) ₃
RG-115819	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RNG-115820	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115823	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115824	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115832	2-CH ₂ CH ₃ ,3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115831	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115830	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-115829	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-OCH ₃ -4-CH ₃ -Ph	-CH(n-Pr)C(CH ₃) ₃
RG-103309	2-CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Et)C(CH ₃) ₃
RG-115595	2-CH ₃ , 3-OH-Ph	3-OCH ₃ -4-piridilo	-C(CH ₃) ₃
RG-100021	4-CH(OH)CH ₃ -Ph	3,5-di(CH ₂ OH)-Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115199	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	2-S(O)CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-100150	4-C(O)CH ₃ -Ph	3,5-di-CO ₂ H-Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115517	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	2,6-di-OCH ₃ -3-piridilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115280	2-CH ₂ CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3-CF ₃ -4-F-fenilo	-C(CH ₃) ₃
RG-101523	2-F,4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115555	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	2-SO ₃ H-Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-102408	2-CH ₃ , 3-CH ₂ CH ₂ CH ₂ O-4-Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-103451	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(CH ₃)C(CH ₃) ₃
RG-101036	2-CH ₂ CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-103361	2,3-di-CH ₃ -Ph	Ph	-CH(Et)(n-Bu)
RG-104074	2,3-di-CH ₃ -Ph	3-CH ₃ -Ph	-CH(Et)(t-Bu)
RG-115009	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ ,4-OH-Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115068	2-F, 3-CH ₂ OCH ₂ O-4-Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃

Compuesto	A	B	E
RG-115064	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	2-S(O)CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115092	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-OCH ₃ ,4-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CN
RG-115311	2-CH ₂ CH ₃ -3-OCH ₃ -Ph	6-CH ₃ -2-piridil-	-C(CH ₃) ₃
RG-115609	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	2-NO ₂ -3,5-di-OCH ₃ , 4-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-102317	2-CH ₃ , 3,4-etilendioxi-Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-102125	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-102398	2-CH ₃ -3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115836	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Et)(t-Bu)
RG-115837	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	2-OCH ₃ -3-piridilo	-CH(Et)(t-Bu)
RG-115840	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(n-Bu)(t-Bu)
RG-115841	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-OCH ₃ , 4-CH ₃ -Ph	-CH(n-Bu)(t-Bu)
RG-115842	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	2-OCH ₃ -3-piridilo	-CH(n-Bu)(t-Bu)
RG-115846	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-CH(Ph)(t-Bu)
RG-115847	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	3,S-di-OCH ₃ ,4-CH ₃ -Ph	-CH(Ph)(t-Bu)
RG-115848	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	2-OCH ₃ -3-piridilo	-CH(Ph)(t-Bu)
RG-115719	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	5-benzoimidazolilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115718	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	1- (o 3-)tritol-5-benzoimidazolilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115721	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	5-metil-1-fenil-1H-pirazol-3-	-C(CH ₃) ₃
RG-115716	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3-cloro-6-metilsulfanil-pirazina-	-C(CH ₃) ₃
RG-115723	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	1H-indazol-3-ilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115722	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	1-tritol-1H-indazol-3-ilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115717	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	5-metoxycarbonil-2-piridilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115550	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	pirazina-2-ilo	-C(CH ₃) ₃
RG-115665	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCPh ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH ₂ OSi(CH ₃) ₂ tBu
RG-115511	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH=NCH ₂ C H ₂ OH
RG-115653	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH=NNHC(O)NH ₂
RG-115597	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ CH=NNHC(O)C(O)NH ₂
RG-115044	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₂ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₂ COOH
RG-115172	2-CH ₂ S(O)CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115408	2-CH ₂ S(O) ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115497	2-CH ₂ NMe ₂ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115079	2-CH ₂ NHCH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-102021	2-CH=CH ₂ , 3-OCH ₃ -Ph-	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115117	2-CH ₂ OMe, 3-OCH ₃ -Ph-	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115358	2-CH ₂ SCH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115003	2-CH ₂ OCH ₂ CH=CH ₂ , 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115490	2-CH ₂ Cl, 3-OCH ₃ -Ph-	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115371	2-CH ₂ OH, 3-OCH ₃ -Ph-	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115225	2-CH ₂ OAc, 3-OCH ₃ -Ph	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115160	2-CH ₂ F, 3-OCH ₃ -Ph-	3,5-di-CH ₃ -Ph	-C(CH ₃) ₃
RG-115851	2-CH ₃ , 3-OCH ₃	3,5-di-CH ₃	-CH(n-Bu)(t-Bu)
RG-115852	2-CH ₃ , 3-OCH ₃	3,5-di-OCH ₃ , 4-CH ₃	-CH(n-Bu)(t-Bu)
RG-115091	2-CH ₂ CH ₃ , 3-OCH ₃ -Ph	5-Metil-pirazina-2-il-	-C(CH ₃) ₃

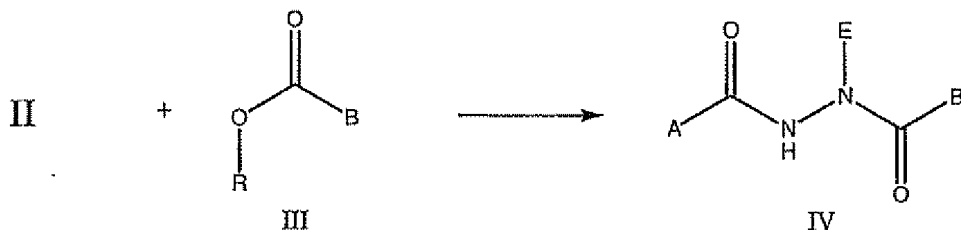
Debido a que los compuestos de la fórmula general de la presente descripción pueden contener un número de átomos de carbono estereogénicos, los compuestos pueden existir como enantiómeros, diastereómeros, estereoisómeros o sus mezclas, incluso si un centro estereogénico se especifica explícitamente.

5 La presente descripción también concierne a la preparación de un compuesto de fórmula (IV) que comprende las etapas de:

10 i hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I) con una base seleccionada de NaOH, KH o una amida MNR^aR^b para producir un producto II, en la que M es Li, Na o K y R^a y R^b son independientemente alquilo (C₁-C₆) o fenilo; y



ii hacer reaccionar el producto (II) de la etapa (i) con un compuesto de fórmula (III) en la que R es fenilo sustituido con tres a cinco del mismo o diferente cloro, fluoro o trifluorometilo;



en la que:

A y B son independientemente

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; amino ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilaminoalquilo ($-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); cianoalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); ($\text{C}_1\text{-C}_6$)alcoxi; fenoxi; haloalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquenilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$); alquino ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$); formilo; haloalquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); benzoilo; alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); carboxamido ($-\text{CONR}^a\text{R}^b$); amido ($-\text{NR}^a\text{COR}^b$); alcoxycarbonilamino ($-\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}^b$); alquilaminocarbonilamino ($-\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{CONR}^a\text{R}^b$); alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$); sulfamido ($-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$); fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$), ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{S}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$), ($=\text{N}-\text{O}-\text{N}=$), ($-\text{C}=\text{CH}-\text{NH}-$), ($-\text{OCF}_2\text{O}-$), ($-\text{NH}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), y ($-(\text{CH}_2)_4-$); o (b) heterociclo de 5 o 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno donde los sustituyentes son de uno a cuatro de los mismos o diferentes halo; nitro; alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); tioalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); $-\text{CONR}^a\text{R}^b$; amino ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; trialquilsililo ($\text{SiR}^a\text{R}^b\text{R}^c$); tritilo ($\text{C}(\text{Ph})_3$); o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); o cuando dos posiciones adyacentes están sustituidas, estas posiciones pueden formar un anillo benzo de fusión; y

E es fenilo o alquilo lineal o ramificado ($\text{C}_1\text{-C}_{10}$) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo ($\text{C}_5\text{-C}_6$); fenilo; alquenilo ($\text{C}_2\text{-C}_3$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); formilo; trialquilsililo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; o $-\text{C}=\text{N}-\text{OR}^a$;

en la que R^a , R^b y R^c son independientemente alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo y $n = 1-4$.

DEFINICIONES

Cuando se especifica un grupo R^x , en el que x representa una letra a-g y el mismo grupo R^x también se especifica con una longitud de cadena del grupo alquilo tal como " $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ ", se entiende que la longitud de cadena especificada se refiere solamente a los casos donde R^x puede ser alquilo y no concierne a los casos donde R^x puede ser un grupo distinto de alquilo, tal como H o arilo.

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

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.

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-hidroxiciclopentilo, ciclohexilo y 4-clorociclohexilo.

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.

El término “alquilsulfonilo” se refiere a un resto sulfonilo sustituido con un grupo alquilo tal como, por ejemplo, mesilo y *n*-propilsulfonilo.

El término “alquenilo” se refiere a un grupo hidrocarburo etilénicamente insaturado, de cadena recta o ramificada, que tiene 1 o 2 enlaces etilénicos tales como, por ejemplo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isopropenilo y 2-pentenilo.

El término “haloalquenilo” se refiere a un grupo alquenilo sustituido con uno o más grupos halo.

El término “alquinilo” se refiere a un grupo hidrocarburo insaturado, recto o ramificado, que tiene 1 o 2 enlaces acetilénicos tales como, por ejemplo, etinilo y propargilo.

El término “alquilcarbonilo” se refiere a una funcionalidad alquilceto, por ejemplo, acetilo, *n*-butirilo y similares.

El término “heterociclico” o “heterociclo” se refiere a un anillo de 5 o 6 miembros no sustituido o sustituido; saturado, parcialmente insaturado o insaturado que contiene uno, dos o tres heteroátomos, preferentemente uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos de heterociclicos incluyen, por ejemplo, piridilo, tienilo, furilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, indolilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, tetrahidropirranilo, morfolinilo, piperazinilo, dioxolanilo y dioxanilo.

El término “alcoxi” incluye tanto grupos alquilo de cadena ramificada como recta unidos a un átomo de oxígeno terminal. Los grupos alcoxi típicos incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi y *tert*-butoxi.

El término “haloalcoxi” se refiere a un grupo alcoxi sustituido con uno o más grupos halo tales como, por ejemplo, clorometoxi, trifluorometoxi, difluorometoxi y perfluoroisobutoxi.

El término “alquiltio” incluye tanto grupos alquilo de cadena ramificada como recta unidos a átomos de azufre terminales tales como, por ejemplo, metiltio.

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 alcoxi tal como, por ejemplo, isopropoximetilo.

“Cromatografía en gel de sílice” se refiere a un método de purificación en el que una sustancia química de interés se aplica como una muestra concentrada en lo alto de una columna vertical de gel de sílice o de gel de sílice modificado químicamente contenido en un cilindro de vidrio, de plástico o de metal y la elución a partir de tal columna con un disolvente o una mezcla de disolventes.

“Cromatografía ultrarrápida” se refiere a una cromatografía en gel de sílice realizada en una presión de aire, argón o nitrógeno típicamente en el intervalo de 68,95 a 344,74 kPa (10 a 50 psi).

“Cromatografía en gradiente” se refiere a una cromatografía en gel de sílice en la que la sustancia química se eluye de una columna con una composición progresivamente cambiante de una mezcla disolvente.

“R_f” es un término de cromatografía en capa fina que se refiere a la distancia fraccional de movimiento de una sustancia química de interés en una placa de cromatografía en capa fina, con respecto a la distancia de movimiento del sistema disolvente eluyente.

“Hidrogenador Parr” y “Agitador Parr” se refieren a aparatos disponibles de Parr Instrument Company, Moline IL, que se diseñan para facilitar la mezcla vigorosa de una solución que contiene una sustancia química de interés con un catalizador suspendido sólido opcional y una atmósfera presurizada contenida de un gas reactivo. Típicamente, el gas es hidrógeno y el catalizador es paladio, platino u óxidos de los mismos depositados en pequeñas partículas de carbón. La presión de hidrógeno está típicamente en el intervalo de 0,21 a 0,48 MPa (30 a 70 psi).

“Reactivo Dess-Martin” se refiere a (1,1,1-triacetoxi)-1,1-dihidro-1,2-benzodioxol-3(1H)-ona como una solución en diclorometano disponible de Acros Organics/Fisher Scientific Company, L.L.C.

“PS-NMM” se refiere a una resina de poliestireno -SO₂NH(CH₂)₃-morfolina funcionalizada disponible de Argonaut Technologies, San Carlos, CA.

“AP-NCO” se refiere a una resina isocianato funcionalizada disponible de Argonaut Technologies, San Carlos, CA.

“AP-trisamina” se refiere a una resina de poliestireno-CH₂NHCH₂CH₂NH(CH₂CH₂NH₂)₂ disponible de Argonaut Technologies, San Carlos, CA.

El término “aislado” para los fines de la presente descripción designa un material biológico (ácido nucleico o proteína) que se ha retirado de su medio original (el medio en el que está presente de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido presente en el estado natural en una planta o en un animal no está aislado, sin embargo el mismo polinucleótido separado de los ácidos nucleicos adyacentes en los que está presente de forma natural, se considera “aislado”. El término purificado no requiere que el material esté presente en una forma que muestre pureza absoluta, exclusiva de la presencia de otros compuestos. Es más bien una definición relativa.

Un polinucleótido está en el estado “purificado” después de la purificación del material de partida o del material natural por al menos una orden de magnitud, preferentemente 2 o 3 y preferentemente 4 o 5 órdenes de magnitud.

Un “ácido nucleico” es un compuesto polimérico comprendido por subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos. Los ácidos nucleicos incluyen el ácido polirribonucleico (ARN) y el ácido polidesoxirribonucleico (ADN), ambos de los cuales puede ser de cadena simple o de doble cadena. El ADN incluye pero no se limita a ADNc, ADN genómico, ADN de plásmidos, ADN sintético y ADN semisintético. El ADN puede ser lineal, circular o superenrollado.

Una “molécula de ácido nucleico” se refiere a la forma polimérica de éster fosfato de los ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; “moléculas de ARN”) o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; “moléculas de ADN”) o cualquier análogo fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma de cadena sencilla o bien una hélice de doble cadena. Son posibles las hélices de doble cadena ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. La frase molécula de ácido nucleico y, en particular molécula de ADN o ARN, se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula y no la limita a ninguna forma terciaria particular. De esta manera, este término incluye el ADN de doble cadena encontrado, entre otros, en las moléculas de ADN lineal o circular (por ejemplo fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. Analizando la estructura de moléculas particulares de ADN de doble hélice, las secuencias pueden describirse en el presente documento de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que se ha sometido a una manipulación biológica 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, sobre la porción común, una secuencia de nucleótido idéntica al ácido nucleico de referencia. Un fragmento de ácido nucleico tal de acuerdo con la descripción puede, donde sea apropiado, incluirse en un polinucleótido mayor del cual es un constituyente. Tales fragmentos comprenden o consisten alternativamente en nucleótidos que varían en longitud de 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 de acuerdo con la descripción.

Como se usa en el presente documento, un “fragmento de ácido nucleico aislado” es un polímero de ARN o de ADN que es de cadena sencilla o doble, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en la forma de un polímero de ADN puede estar comprendido por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Un “gen” se refiere a un conjunto de nucleótidos que codifican un polipéptido e incluye ADNc y ácidos nucleicos de ADN genómico. “Gen” también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína o un polipéptido específicos, incluyendo secuencias reguladoras precedentes (secuencias 5' no codificantes) y siguientes (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. “Gen nativo” se refiere a un gen 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. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de fuentes diferentes o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de manera diferente a la que se encuentran en la naturaleza. Un gen quimérico puede comprender secuencias codificantes derivadas de fuentes diferentes y/o secuencias reguladoras derivadas de fuentes diferentes. “Gen endógeno” se refiere a un gen nativo en su propia localización en el genoma de un organismo. Un gen “extraño” o un gen “heterólogo” se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo hospedador, pero que se introduce dentro del organismo hospedador por transferencia génica. Los genes extraños pueden

comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o genes quiméricos. Un “transgen” es un gen que se ha introducido en el genoma por un procedimiento de transformación.

ADN “heterólogo” se refiere a ADN que no se localiza de forma natural en la célula o en un sitio cromosómico de la célula. Preferentemente el ADN heterólogo incluye un gen extraño a la célula.

El término “genoma” incluye ADN o ARN cromosómico así como mitocondrial, de cloroplastos y vírico.

Una molécula de ácido nucleico puede “hibridarse” a otra molécula de ácido nucleico, tal como ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma de cadena sencilla de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse a la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y de fuerza iónica en solución (véase Sambrook et al., 1989 *infra*). La hibridación y las condiciones de lavado se conocen bien y se ejemplifican 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 el Capítulo 11 y la Tabla 11.1 del mismo. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la “rigurosidad” de la hibridación.

Las condiciones de la rigurosidad pueden ajustarse para explorar fragmentos moderadamente similares, tales como secuencias homólogas de organismos distantemente relacionados, hasta fragmentos altamente similares, tales como genes que duplican enzimas funcionales de organismos estrechamente relacionados. Para la exploración preliminar de ácidos nucleicos homólogos, pueden usarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad, que corresponden a 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 %). Las condiciones de hibridación con rigurosidad moderada corresponden a una T_m mayor, por ejemplo, formamida al 40 %, con 5x o 6x SCC. Las condiciones de hibridación con rigurosidad alta corresponden a la mayor T_m , por ejemplo, formamida al 50 %, 5x o 6x SCC.

La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles los desapareamientos entre bases. El término “complementario” se usa para describir la relación entre las bases de nucleótido que son capaces de hibridarse entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria a la timina y la citosina es complementaria a la guanina. En consecuencia, la presente descripción también incluye fragmentos de ácido nucleico que son complementarios a las secuencias completas como se describe o se usa en el presente documento así como aquellas secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares.

En una realización específica de la descripción, los polinucleótidos se detectan empleando condiciones de hibridación que comprenden una etapa de hibridación a una T_m de 55 °C y condiciones de utilización como se expone anteriormente. En una realización preferida, la T_m es 60 °C; en una realización más preferida, la T_m es 63 °C; en una realización incluso más preferida, la T_m es 65 °C.

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), después repitiendo con 2X SSC, SDS al 0,5 % a 45 °C durante 30 minutos y después repitiendo dos veces con 0,2X SSC, SDS al 0,5 % a 50 °C durante 30 minutos. Un conjunto más preferido de condiciones rigurosas utiliza temperaturas mayores en las que los lavados son idénticos a aquellos anteriores salvo por que la temperatura de los dos lavados finales de 30 min en 0,2X SSC, SDS al 0,5 % se aumentó a 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 los desapareamientos entre bases.

La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, las variables se conocen bien en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias nucleotídicas, mayor será el valor de la T_m de los híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. La estabilidad relativa (que corresponde a una mayor T_m) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN: ARN, ADN: ARN, ADN: ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook et al., *supra*, 9,50-9,51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los desapareamientos se vuelve más importante y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook et al., *supra*, 11,7-11,8).

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

En una realización, la longitud de un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Es preferible una longitud mínima de un ácido nucleico hibridable de al menos 30 nucleótidos. Adicionalmente, el experto en la materia se dará cuenta de que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado puede ajustarse según sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

El término “sonda” se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que puede aparear bases con un ácido nucleico diana de cadena sencilla complementaria para formar una molécula de doble cadena.

Como se usa en el presente documento, el término “oligonucleótido” se refiere a un ácido nucleico, generalmente de al menos 18 nucleótidos, que se hibrida a 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 nucleótidos-³²P o nucleótidos a los que se les ha conjugado covalentemente un marcador, tal como biotina. Un oligonucleótido marcado puede usarse como una sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos (uno o ambos de los que pueden marcarse) pueden usarse como cebadores para PCR, para clonar la longitud completa o bien un fragmento de un ácido nucleico o para detectar la presencia de un ácido nucleico. Un oligonucleótido puede usarse también para formar una triple hélice con una molécula de ADN. Generalmente, los oligonucleótidos se preparan de forma sintética, preferentemente en un sintetizador de ácidos nucleicos. En consecuencia, los oligonucleótidos pueden prepararse con enlaces análogos fosfoéster de origen no natural, tales como enlaces tioéster, etc.

Un “cebador” es un oligonucleótido que se hibrida a una secuencia diana de ácido nucleico para crear una región de ácido nucleico de doble cadena que sirve como un punto de iniciación para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. Tales cebadores pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa.

“Reacción en cadena de la polimerasa” se abrevia PCR y significa un método *in vitro* para amplificar enzimáticamente secuencias específicas de ácidos nucleicos. La PCR implica una serie repetitiva de ciclos de temperatura comprendiendo cada ciclo tres etapas: desnaturalización del ácido nucleico molde para separar las hebras de la molécula diana, hibridar un cebador de oligonucleótido de PCR de cadena sencilla al ácido nucleico molde y extensión del cebador o cebadores hibridados por ADN polimerasa. La PCR proporciona un medio para detectar la presencia de una molécula diana y, en condiciones cuantitativas o semicuantitativas, para determinar la cantidad relativa de molécula diana dentro del conjunto de partida de ácidos nucleicos.

“Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa” se abrevia 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 de la amplificación enzimática de una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos específicas dentro de la molécula o moléculas de ADNc diana como se describe anteriormente. La RT-PCR también proporciona un medio para detectar la presencia de la molécula diana y, en condiciones cuantitativas o semi-cuantitativas, para determinar la cantidad relativa de esa molécula diana dentro del conjunto de partida de ácidos nucleicos.

Una “secuencia codificante” de ADN es una secuencia de ADN de doble cadena que se transcribe y se traduce en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. “Secuencias reguladoras adecuadas” se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias 5' no codificantes), dentro de, o aguas abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la 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 a efector y estructura de tallo-lazo. Los límites de la secuencia codificantes se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de fin de traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc a partir de ARNm, secuencias de ADN genómico e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia codificante se destina a la expresión en una célula eucariótica, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción se localizarán normalmente 3' hacia la secuencia codificante.

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

La frase “cabeza con cabeza” se usa en el presente documento para describir la orientación de dos secuencias polinucleotídicas en relación una con la otra. Dos polinucleótidos se posicionan en una orientación cabeza con cabeza cuando el extremo 5' de la hebra codificante de un polinucleótido está adyacente al extremo 5' de la hebra codificante del otro polinucleótido, con lo que la dirección de transcripción de cada nucleótido prosigue desde el extremo 5' del otro polinucleótido. La frase “cabeza con cabeza” puede abreviarse (5') a (5') y puede indicarse también por los símbolos (←→) o (3'←5'5'→3').

La frase “cola con cola” se usa en el presente documento para describir la orientación de dos secuencias polinucleotídicas en relación una con la otra. Dos polinucleótidos se posicionan en una orientación cola con cola

cuando el extremo 3' de la hebra codificante de un polinucleótido está adyacente al extremo 3' de la hebra codificante del otro polinucleótido, con lo que la dirección de transcripción de cada nucleótido prosigue hacia el otro polinucleótido. La frase "cola con cola" puede abreviarse (3') a (3') y puede indicarse también por los símbolos ($\rightarrow\leftarrow$) o ($5'\rightarrow 3'3'\leftarrow 5'$).

La frase "cabeza con cola" se usa en el presente documento para describir la orientación de dos secuencias polinucleotídicas en relación una con la otra. Dos polinucleótidos se posicionan en una orientación cabeza con cola cuando el extremo 5' de la hebra codificante de un polinucleótido está adyacente al extremo 3' de la hebra codificante del otro polinucleótido, con lo que la dirección de transcripción de cada nucleótido prosigue en la misma dirección que la del otro polinucleótido. La frase "cabeza con cola" puede abreviarse (5') a (3') y puede indicarse también por los símbolos ($\rightarrow\rightarrow$) o ($5'\rightarrow 3'5'\rightarrow 3'$).

La frase "aguas abajo" se refiere a una secuencia nucleotídica que se localiza 3' en la secuencia del nucleótido de referencia. En particular, las secuencias nucleotídicas aguas abajo se refieren generalmente a secuencias que siguen el punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, el codón de iniciación de la traducción de un gen se localiza aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.

La frase "aguas arriba" se refiere a una secuencia nucleotídica que se localiza 5' hacia la secuencia del nucleótido de referencia. En particular, las secuencias nucleotídicas aguas arriba se refieren generalmente a secuencias que se localizan en el lado 5' de una secuencia codificante del punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, la mayoría de los promotores se localizan aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Las frases "endonucleasa de restricción" y "enzima de restricción" se refieren a una enzima que se une y corta dentro de una secuencia nucleotídica específica dentro de ADN de doble cadena.

"Recombinación homóloga" se refiere a la inserción de una secuencia de ADN extraña en otra molécula de ADN, por ejemplo, la inserción de un vector en un cromosoma. Preferentemente, el vector se dirige a un sitio cromosómico específico para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá regiones de homología suficientemente largas a las secuencias del cromosoma para permitir la unión complementaria y la incorporación del vector en el cromosoma. Las regiones más largas de homología y los grados mayores de similitud de secuencias pueden aumentar la eficacia de la recombinación homóloga.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para propagar un polinucleótido de acuerdo con la descripción. Una vez que se establecen un sistema hospedador adecuado y unas condiciones de crecimiento, los vectores de expresión recombinantes pueden propagarse y prepararse en cantidad. Como se describe en el presente documento, los vectores de expresión que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, los siguientes vectores o sus derivados: virus de humanos o de animales tales como el virus vacuna o adenovirus; virus de insectos tales como baculovirus; vectores de levaduras, vectores de bacteriófagos (por ejemplo, lambda) y vectores de ADN de plásmidos y cósmidos, por nombrar unos pocos.

Un "vector" es cualquier medio para clonar y/o para transferir un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al que puede unirse otro segmento de ADN de tal manera que se provoque 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, capaz de replicarse bajo su propio control. El término "vector" incluye tanto medios víricos como no víricos para introducir el ácido nucleico en 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 dentro de genes, etc. Los posibles vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos o virus modificados que incluyen, por ejemplo bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como pBR322 o derivados del plásmido pUC o el vector Bluescript. Por ejemplo, la inserción de los fragmentos de ADN que corresponden a elementos de respuesta y promotores en un vector adecuado puede realizarse ligando los fragmentos de ADN apropiados en un vector elegido que tiene un extremo cohesivo complementario. De forma alternativa, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente o puede producirse cualquier sitio ligando secuencias nucleotídicas (conectores) en el extremo del ADN. Tales vectores pueden diseñarse para contener genes marcadores seleccionables que proporcionen la selección de células que hayan incorporado el marcador en el genoma celular. Tales marcadores permiten la identificación y/o la selección de células hospedadoras que incorporen y expresen las proteínas codificadas por el marcador.

Los vectores víricos, y particularmente los vectores retrovíricos, se han usado en una amplia diversidad de aplicaciones de transporte génico en células, así como en sujetos animales vivos. Los vectores víricos que pueden usarse incluyen pero no se limitan a vectores retrovirus, virus adeno-asociados, pox, baculovirus, vacuna, herpes simplex, Epstein-Barr, adenovirus, geminivirus y caulimovirus. Los vectores no víricos incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas) complejos ADN-proteína y biopolímeros. Además de un ácido nucleico, un vector también puede comprender una o más regiones reguladoras y/o marcadores seleccionables útiles para seleccionar, medir y monitorizar los resultados de la transferencia de ácidos nucleicos (transferencia a qué tejidos, duración de la expresión, etc.)

El término “plásmido” se refiere a un elemento extracromosómico que normalmente lleva un gen que no es parte del metabolismo central de la célula y normalmente en forma de moléculas de ADN circular de doble cadena. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración del genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, de un ADN o ARN de cadena sencilla o doble lineal, circular o superenrollado, derivado de cualquier fuente, en el que un número de secuencias nucleotídicas se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia sin traducir 3' apropiada dentro de una célula.

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

Los vectores pueden introducirse en las células hospedadoras deseadas por 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 un cañón génico o un transportador de vectores 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, enviada 15 de marzo, 1990).

Un polinucleótido de acuerdo con la descripción puede introducirse también *in vivo* por lipofección. Durante la década pasada, se ha aumentado el uso de liposomas para la encapsulación y la transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y los peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas pueden usarse para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner et al., 1987, PNAS 84:7413; Mackey, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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). Los compuestos y las composiciones lipídicos particularmente útiles para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en las Publicaciones de Patente Internacional n.º WO95/18863 y n.º WO96/17823 y en la Patente de EE.UU. N.º 5.459.127. El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en los órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. La focalización molecular de los liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que dirigir la transfección a tipos celulares particulares se preferiría particularmente en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, el hígado, el riñón y el cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para el fin de focalizar (Mackey et al., 1988, *supra*). Los péptidos diana, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores y proteínas tales como anticuerpos o las moléculas distintas a péptidos pueden acoplarse a los liposomas químicamente.

Otras moléculas también son útiles 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 al ADN (por ejemplo, documento WO96/25508) o un polímero catiónico (por ejemplo, documento WO95/21931).

También es posible introducir un vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo (véase las Patentes de EE.UU. n.º 5.693.622, n.º 5.589.466 y n.º 5.580.859). Las aproximaciones de transporte de ADN mediado por receptor también pueden usarse (Curiel et al., 1992, Hum. Gene Ther. 3: 147-154; y Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432).

El término “transfección” significa la toma de ARN o ADN exógeno o heterólogo por una célula. Una célula se ha “transfectado” con ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando tal ARN o ADN se ha introducido dentro de la célula. Una célula se ha “transformado” con un ARN o un ADN exógeno o heterólogo cuando el ARN o el ADN transfectado efectúa un cambio fenotípico. El ARN o el ADN transformante puede integrarse (unirse covalentemente) en el ADN cromosómico constituyendo el genoma de la célula.

“Transformación” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico dentro del genoma de un organismo hospedador, dando como resultado la herencia genéticamente estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácidos nucleicos transformados se denominan organismos “transgénicos” o “recombinantes” o “transformados”.

La frase “región genética” se referirá a una región de una molécula de ácido nucleico o de una secuencia nucleotídica que comprende un gen que codifica un polipéptido.

Además, el vector recombinante que comprende un polinucleótido de acuerdo con la descripción puede incluir uno o más orígenes de replicación en los hospedadores celulares en los que se busca su amplificación o su expresión, marcadores o marcadores seleccionables.

La frase “marcador seleccionable” significa un factor de identificación, normalmente un gen de resistencia a un antibiótico o a un químico, que es capaz de seleccionarse basándose en el efecto del gen marcador, es decir,

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 o un 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, estreptomicina, gentamicina, canamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de la antocianina, gen de la isopentanol transferasa y similares.

El término "gen indicador" significa un ácido nucleico que codifica un factor de identificación que es capaz de 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 o un organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés y/o para medir la inducción o la transcripción de la expresión génica. Los ejemplos de genes indicadores conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -galactosidasa (LacZ), β -glucuronidasa (Gus) y similares. Los genes marcadores seleccionables también pueden considerarse genes indicadores.

"Promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o un ARN funcional. En general, una secuencia codificante se localiza 3' hacia una secuencia promotora. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo o pueden componerse de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Se entiende por los expertos en la materia que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares o en diferentes etapas de desarrollo o en respuesta a condiciones ambientales o fisiológicas diferentes. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos celulares al mismo tiempo 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 etapa específica de desarrollo o de la diferenciación celular se denominan comúnmente "promotores específicos del desarrollo" o "promotores específicos de la diferenciación celular". Los promotores que se inducen y hacen que un gen se exprese después de la exposición o el tratamiento de la célula con un agente, una molécula biológica, un químico, un ligando, luz o similares que induce al promotor se denominan comúnmente "promotores inducibles" o "promotores regulables". Se reconoce además que ya que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener actividad promotora idéntica.

Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Para el fin de definir la presente descripción, la secuencia promotora se une en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la descripción a niveles detectables sobre el fondo. Dentro de la secuencia promotora 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 la ARN polimerasa.

Una secuencia codificante está "bajo el control" de las secuencias de control transcripcional y traduccional en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que después se corta y empalma el ARN en trans (si la secuencia codificante contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

"Secuencias de control transcripcional y traduccional" son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula hospedadora. En células eucariotas, las señales de poliadenilación son las secuencias control.

La frase "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 al ADN del primer gen quimérico. Este elemento de ADN puede ser palindrómico (perfecto o imperfecto) en su secuencia o bien estar compuesto por motivos secuencia o medios sitios separados por un número variable de nucleótidos. Los medios sitios pueden ser similares o idénticos y disponerse como repeticiones directas o bien invertidas o como un medio sitio único o múltiples de medios sitios adyacentes en tándem. El elemento de respuesta puede comprender un promotor mínimo aislado de diferentes organismos dependiendo de la naturaleza de la célula o el organismo en el que se incorporará el elemento de respuesta. El dominio de unión al 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 de un gen o genes aguas abajo bajo la regulación de este elemento de respuesta. Los ejemplos de secuencias de ADN para los elementos de respuesta del receptor de ecdisona natural incluyen: RRGG/TTCANTGAC/ACY (véase Cherbas L. et al., (1991), *Genes Dev.* 5, 120-131); AGGTCAN_(n)AGGTCA, donde N_(n) 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).

La frase “unido operativamente” se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos en un único fragmento de ácido nucleico de tal manera que la función de una se afecte por la otra. Por ejemplo, un promotor se une operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

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

Las frases “casete”, “casete de expresión” y “casete de expresión génica” se refiere a un segmento de ADN que puede insertarse en un ácido nucleico o un polinucleótido en diferentes sitios de restricción específicos o por recombinación homóloga. El segmento de ADN comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y la casete y los sitios de restricción se diseñan para asegurar la inserción de la 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 un polipéptido de interés y que tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula hospedadora particular. Las casetes, las casetes de expresión, las casetes de expresión génica y las casetes de transformación de la descripción también pueden comprender elementos que permiten la expresión mejorada de un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula hospedadora. Estos elementos pueden incluir, pero no se limitan a: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, una secuencia terminadora, una secuencia de poliadenilación y similares.

Para los fines de la presente descripción, el término “interrupción génica” se refiere a la combinación de un elemento de respuesta asociado a 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.

Los términos “modular” y “modula” significan inducir, reducir o inhibir la expresión génica o del ácido nucleico, dando como resultado la inducción, la reducción o la inhibición respectiva de la producción de proteína o de polipéptido.

Los plásmidos o vectores de acuerdo con la descripción pueden comprender adicionalmente al menos un promotor adecuado para dirigir la expresión de un gen en una célula hospedadora. El término “vector de expresión” significa un vector, un plásmido o un vehículo diseñado para permitir la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada después de la transformación en el hospedador. El gen clonado, es decir, la secuencia de ácido nucleico insertada, se coloca normalmente bajo el control de elementos de control tales como un promotor, un promotor mínimo, un potenciador o similares. Las regiones de control iniciadoras o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de un ácido nucleico en la célula hospedadora deseada son numerosas y familiares para los expertos en la materia. Prácticamente cualquier promotor capaz de dirigir estos genes es adecuado para la presente descripción incluyendo pero no limitado a: promotores víricos, promotores bacterianos, promotores animales, promotores mamíferos, promotores sintéticos, promotores constitutivos, promotor específico de tejido, promotores específicos del desarrollo, promotores inducibles, promotores regulados por la luz; *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL4*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI*, promotores de la fosfatasa alcalina (útil para la expresión en *Saccharomyces*); promotor *AOX1* (útil para la expresión en *Pichia*); β -lactamasa, promotores *lac*, *ara*, *tet*, *trp*, *IP_L*, *IP_R*, *T7*, *tac* y *trc* (útiles para la expresión en *Escherichia coli*); virus del mosaico de la coliflor 35S regulado por luz, específico de semilla, específico de polen, específico de ovario, relacionado con patogenicidad o enfermedad, CMV 35S mínimo, virus del mosaico de la vaina de yuca (CsVMV), proteína de unión a la clorofila a/b, ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, virus baciliforme del tungro del arroz específico de brote, específico de raíz, inducible por quitinasa, por estrés, súper-promotor vegetal, leucina aminopeptidasa de la patata, nitrato reductasa, mannopina sintasa, nopalina sintasa, ubicuitina, proteína ceína y promotores de antocianina (útiles para la expresión en células vegetales); los promotores animales y mamíferos conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, la región promotora temprana SV40 (SV40e), el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR) 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV), los genes de adenovirus (ad) de promotores del EIA o promotor tardío mayor (MLP), el promotor temprano del citomegalovirus (CMV), el promotor de la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simplex (HSV), un promotor IE1 de baculovirus, un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1), un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), un promotor de ubicuitina (Ubc), un promotor de la albúmina, las secuencias reguladoras del promotor de metalotioneína-L de ratón y las regiones de control transcripcional, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina, α -actina, tubulina y similares), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP y similares), los promotores de los genes terapéuticos (del tipo MDR, CFTR o factor VIII, y similares), promotores relacionados con patogenicidad o enfermedad y promotores que muestran especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos, tales como la región de control génica de elastasa I que está activa en células acinares pancreáticas; región de control del gen de la insulina en células beta pancreáticas, región de control del gen de la inmunoglobulina en células linfoides, región de control del virus del tumor mamario de ratón activo en células testiculares, de la mama, linfoides y mastocitos; gen de la albúmina, regiones control Apo AI y Apo AII activas en el hígado, región de control del gen de la alfa-fetoproteína activa en el hígado, región de control del gen de la alfa 1-antitripsina activa en el hígado, región de control del gen de la beta-globina activa en las células mieloides, región de control del gen de la proteína básica mielina activa en los oligodendrocitos en el cerebro, región de control del gen de la cadena ligera 2 de la miosina activa en el músculo

esquelético y la región de control del gen de la hormona liberadora de la gonadotropina activa en el hipotálamo, promotor de la piruvato quinasa, promotor de la vilina, promotor de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos, promotor de la α -actina del músculo liso y similares. Además, estas secuencias de expresión pueden modificarse por la adición de secuencias potenciadoras o reguladoras y similares.

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

Las regiones de control de la terminación, es decir, las secuencias terminadoras o de poliadenilación, pueden derivar también de diversos genes nativos de los hospedadores preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario, sin embargo, se prefiere más si se incluye. En una realización preferida de la descripción, la región de control de la terminación puede comprender o puede derivar de una secuencia sintética, una señal de poliadenilación sintética, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH), secuencias terminadoras víricas o similares.

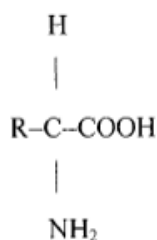
Las frases "secuencias no codificantes 3'" o "región sin traducir (UTR) 3'" se refieren a secuencias de ADN localizadas aguas abajo (3') de una secuencia codificante y pueden comprender secuencias de reconocimiento de poliadenilación [poli(A)] y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico 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 naturalmente responsables de expresar un ácido nucleico particular (una región homóloga) o puede incluir secuencias de un origen diferente que son responsables de expresar diferentes proteínas o incluso proteínas sintéticas (una región heteróloga). En particular, las secuencias pueden ser secuencias de genes procarióticos, eucarióticos o víricos o secuencias derivadas que estimulan o reprimen la transcripción de un gen de forma específica o no específica y de forma inducible o no inducible. Las regiones reguladoras incluyen orígenes de replicación, sitios de corte y empalme de ARN, promotores, potenciadores, secuencias de terminación transcripcional y secuencias señal que dirigen el polipéptido hacia las rutas secretoras de la célula diana.

Una región reguladora de una "fuente heteróloga" es una región reguladora que no se asocia de forma natural al ácido nucleico expresado. Entre las regiones reguladoras heterólogas están las regiones reguladoras de una especie diferente, regiones reguladoras de un gen diferente, secuencias reguladoras de un gen diferente, secuencias reguladoras híbridas y secuencias reguladoras que no se dan en la naturaleza, pero que se diseñan por un experto en la materia.

"Transcrito de ARN" se refiere al producto que resulta de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia perfectamente complementaria de la secuencia de ADN, se denomina el transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada de un 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 ADN de doble cadena que es complementario a y derivado de ARNm. ARN "sentido" se refiere al transcrito de ARN que incluye el ARNm y de tal manera puede traducirse en una proteína por la célula. "ARN antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o una parte de un transcrito primario diana o un ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana. La complementariedad de un ARN antisentido puede estar en cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia 5' no codificante, en la secuencia 3' no codificante o la secuencia codificante. "ARN funcional" se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima u otro ARN que no se traduce hasta que tenga un efecto en procesos celulares.

Un "polipéptido" es un compuesto polimérico que comprende restos de aminoácidos unidos covalentemente. Los aminoácidos tienen la siguiente estructura general:



Los aminoácidos se clasifican en siete grupos en base a la cadena R lateral: (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 se fusiona al grupo amino. Un polipéptido de la descripción comprende preferentemente al menos 14 aminoácidos.

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

Un "polipéptido aislado" o una "proteína aislada" es un polipéptido o una proteína que está sustancialmente libre de aquellos compuestos que normalmente se asocian a los mismos en su estado natural (por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos). "Aislado" no significa que excluya mezclas artificiales o
10 sintéticas con otros compuestos, o la presencia de impurezas que no interfieran con la actividad biológica y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta, a la adición de estabilizantes o de hacerlo una composición en 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 tipo silvestre o de origen natural con un aminoácido diferente con respecto al polipéptido tipo silvestre o de origen natural. Un polipéptido mutante de sustitución puede comprender solamente una (1) sustitución de aminoácido tipo silvestre o de origen natural y puede denominarse un polipéptido "mutante puntual" o un "mutante de punto único". De forma alternativa, un polipéptido mutante de sustitución puede comprender una sustitución de dos (2) o más aminoácidos tipo silvestre o de origen
20 natural con 2 o más aminoácidos con respecto al polipéptido tipo silvestre o de origen natural. De acuerdo con la descripción, un polipéptido de un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que comprende una mutación de sustitución comprende una sustitución de al menos un (1) aminoácido tipo silvestre o de origen natural con un aminoácido diferente con respecto al polipéptido de un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H tipo silvestre o de origen natural.

En el que el polipéptido mutante de sustitución comprende una sustitución de dos (2) o más aminoácidos tipo silvestre o de origen natural, esta sustitución puede comprender o un número equivalente de aminoácidos tipo silvestre o de origen natural eliminado para la sustitución, es decir, 2 aminoácidos tipo silvestre o de origen natural reemplazados por 2 aminoácidos distintos al tipo silvestre o no de origen natural o bien un número no equivalente de aminoácidos tipo silvestre eliminados para la sustitución, es decir, 2 aminoácidos tipo silvestre reemplazados con 1 aminoácido distinto al tipo silvestre (una sustitución + mutación de delección) o 2 aminoácidos tipo silvestre reemplazados por 3 aminoácidos distintos al tipo silvestre (una sustitución + mutación de inserción).
30

Los mutantes de sustitución pueden describirse usando un sistema de nomenclatura abreviado para indicar el resto de aminoácido y el número reemplazado dentro de la secuencia del polipéptido de referencia y el nuevo resto de aminoácido sustituido. Por ejemplo, un mutante de sustitución en el que se sustituye el veintavo (20º) resto de aminoácido de un polipéptido puede abreviarse como "x20z", en el que "x" es el aminoácido a reemplazarse, "20" es la posición del resto de aminoácido o el número dentro del polipéptido y "z" es el nuevo aminoácido sustituido. Por lo tanto, un mutante de sustitución abreviado intercambiamente como "E20A" o "Glu20Ala" indica que el mutante
40 comprende un resto de alanina (comúnmente abreviado en la técnica como "A" o "Ala") en lugar del ácido glutámico (comúnmente abreviado en la técnica como "E" o "Glu") en la posición 20 del polipéptido.

Una mutación de sustitución puede realizarse por cualquier técnica para la mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo pero no limitado a, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson, C., y col., 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. EE.UU. 83: 710), uso de conectores TAB® (Pharmacia), digestión con endonucleasa de restricción/delección y sustitución de fragmentos, mutagénesis mediada por PCR/dirigida al oligonucleótido y similares. Las técnicas basadas en PCR se prefieren para la mutagénesis dirigida al sitio (véase Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Elrich, Ed. Stockton Press, Capítulo 6, pp. 61-70).
50

"Fragmento" de un polipéptido de acuerdo con la descripción se entenderá que significa un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es más corta que la del polipéptido de referencia y que comprende, sobre la porción entera con estos polipéptidos de referencia, una secuencia de aminoácidos idéntica. Tales fragmentos pueden, donde sea apropiado, incluirse en un polipéptido más grande del que son una parte. Tales fragmentos de un polipéptido de acuerdo con la descripción 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, 50, 100, 200, 240 o 300 aminoácidos.
55

Una "variante" de un polipéptido o una proteína es cualquier análogo, fragmento, derivado o mutante que deriva de un polipéptido o una proteína y que retiene al menos una propiedad biológica del polipéptido o la proteína. Pueden existir diferentes variantes del polipéptido o la proteína en la naturaleza. Estas variantes pueden ser variaciones alélicas caracterizadas por diferencias en las secuencias de nucleótidos de la estructura génica que codifica para la proteína o pueden implicar corte y empalme diferencial o modificación post-traducciona. El experto en la materia puede producir variantes que tengan sustituciones, delecciones, adiciones o reemplazamientos de aminoácidos sencillos o múltiples. Estas variantes pueden incluir, entre otros: (a) variantes en las que uno o más restos de aminoácidos se sustituyen con aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en las que uno o más
60
65

aminoácidos se añaden al polipéptido o a la proteína, (c) variantes en las que uno o más de los aminoácidos incluyen un grupo sustituyente y (d) variantes en las que el polipéptido o la proteína se fusiona con otro polipéptido tal como albúmina serosa. Las técnicas para obtener estas variantes, incluyendo técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, se conocen por los expertos en la materia. Un polipéptido variante preferentemente comprende al menos aproximadamente 14 aminoácidos.

Una "proteína heteróloga" se refiere a una proteína no producida de forma natural en la célula.

Una "proteína madura" se refiere a un polipéptido procesado post-traduccionamente; es decir, una de la que se ha retirado cualquier pre- o propéptido presente en el producto de traducción primario. Proteína "precursora" se refiere al producto primario de la traducción del ARNm; es decir, con pre- y propéptidos todavía presentes. Los pre- y los propéptidos pueden ser pero no se limitan a señales de localización intracelular.

La frase "péptido señal" se refiere a un polipéptido amino terminal que precede a la proteína madura secretada. El péptido señal se escinde de y por lo tanto no está presente en la proteína madura. Los péptidos señal tienen la función de dirigir y translocar proteínas secretadas a través de las membranas celulares. El péptido señal también se denomina proteína señal.

Una "secuencia señal" se incluye en el principio de la secuencia codificante de una proteína a expresarse en la superficie de una célula. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal al polipéptido maduro, que dirige la célula hospedadora para translocar el polipéptido. La frase "secuencia señal de translocación" se usa en el presente documento para referirse a esta clase de secuencia señal. Las secuencias señal de translocación pueden encontrarse asociadas a una diversidad de proteínas nativas de eucariotas y de procariotas y normalmente son funcionales en ambos tipos de organismos.

El término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos restos polipeptídicos. La correspondencia entre la secuencia de un resto a otro puede determinarse por técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse por una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas polipeptídicas alineando la información de secuencia y usando programas de ordenador disponibles actualmente. De forma alternativa, la homología puede determinarse por la hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex entre regiones homólogas, seguido de la digestión con nucleasa o nucleasas específicas de cadena sencilla y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

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

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

En una realización específica, dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente el 50 % (preferentemente al menos aproximadamente el 75 % y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 o el 95 %) de los nucleótidos coinciden sobre 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 Southern en condiciones, por ejemplo, rigurosas como se define para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación apropiadas está en la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente similar" se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos en los que los cambios en una o más bases nucleotídicas da como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. "Sustancialmente similar" también se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos en los que los cambios en una o más bases de nucleótidos no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la alteración de la expresión génica mediante tecnología antisentido o co-supresora. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de los fragmentos de ácidos nucleicos de la presente descripción tales como la delección o la inserción de una o más bases nucleotídicas que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito resultante. Se entiende por lo tanto que la descripción abarca más de las secuencias ejemplares específicas. Cada una de las modificaciones propuestas está dentro de la experiencia rutinaria de la técnica, como lo está la determinación de la retención de la actividad biológica de los productos codificados.

Además, el experto en la materia reconoce que las secuencias sustancialmente similares abarcadas por la presente descripción también se definen por su capacidad de hibridarse, en condiciones rigurosas (0,1X SSC, SDS al 0,1%, 65 °C y lavados con 2X SSC, SDS al 0,1 % seguido de ,1X SSC, SDS al 0,1%), con las secuencias ejemplificadas en el presente documento. Los fragmentos de ácidos nucleicos sustancialmente similares de la presente descripción son aquellos cuyas secuencias de ADN son al menos un 70 % idénticas a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácidos nucleicos indicados en el presente documento. Los fragmentos de ácidos nucleicos sustancialmente preferidos de la presente descripción son aquellos fragmentos de ácidos nucleicos cuyas secuencias de ADN son al menos un 80 % idénticas a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácidos nucleicos indicados en el presente documento. Los fragmentos de ácidos nucleicos más preferidos son al menos un 90 % idénticas a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácidos nucleicos indicados en el presente documento. Se prefieren incluso más los fragmentos de ácidos nucleicos que son al menos un 95 % idénticos a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácidos nucleicos indicados en el presente documento.

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de aproximadamente un 40 % de los aminoácidos son idénticos o más del 60 % son similares (funcionalmente idénticos). Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican al alinear usando, por ejemplo, el programa GCG (Genetics Computer Group, Manual del Programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin) pileup.

La frase "que corresponde a" se usa en el presente documento para referirse a secuencias similares u homólogas, si la posición exacta es idéntica o diferente a la de la molécula de la que se mide la similitud o la homología. Un alineamiento de una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos puede incluir espacios. De esta manera, la frase "que corresponde a" se refiere a la similitud de secuencias y no al número de los restos de aminoácidos o las bases de nucleótidos.

Una "porción sustancial" de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos comprende suficiente de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o de la secuencia de nucleótidos de un gen para identificar putativamente ese polipéptido o gen, bien por evaluación manual de la secuencia por un experto en la materia o bien por comparación de secuencias automatizada por ordenador e identificación usando algoritmos tales como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., (1993) *J. Mol. Biol.* 215: 40-410; véase también www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). En general, es necesaria una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos para identificar putativamente una secuencia polipeptídica o de ácidos nucleicos como homóloga a una proteína o un gen conocidos. Además, con respecto a las secuencias nucleotídicas, pueden usarse sondas de oligonucleótidos específicas de genes que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos en métodos de identificación génica dependientes de secuencia (por ejemplo, hibridación Southern) y aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o de placas de bacteriófagos). Además, pueden usarse oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en la PCR para obtener un fragmento particular de ácidos nucleicos que comprende los cebadores. En consecuencia, una "porción sustancial" de una secuencia de nucleótidos comprende suficiente de la secuencia para identificar específicamente y/o aislar un fragmento de ácidos nucleicos que comprende la secuencia.

El término "porcentaje de identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, como se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencias entre las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, como puede ser el caso, como se determina por la coincidencia entre las cadenas de tales secuencias. "Identidad" y "similitud" pueden calcularse fácilmente por métodos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a aquellos 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); *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 ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas de ordenador públicamente disponibles. Las alineaciones de secuencias y los cálculos del porcentaje de identidad pueden realizarse usando el programa Megalign del conjunto de computación bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Pueden realizarse múltiples alineamientos de las secuencias usando el método Clustal de alineamiento (Higgins y Sharp (1989) *CABIOS*. 5: 151-153) con los parámetros por defecto (GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 10). Los parámetros por defecto para los alineamientos par a par usando el método Clustal pueden seleccionarse: KTUPLE 1, GAP PENALTY = 3, WINDOW = 5 y DIAGONALS SAVED = 5.

La frase "software de análisis de secuencias" se refiere a cualquier algoritmo de ordenador o programa de software que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. El "software de análisis de secuencias" puede estar disponible en el mercado o estar desarrollado independientemente. El software de análisis de secuencias típico incluirá pero no se limita al conjunto de programas de GCG (Versión de Paquete Wisconsin 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 la

presente solicitud se entenderá que cuando se usa un software de análisis de secuencias para los análisis, esos resultados del análisis se basarán en los “valores por defecto” del programa al que se hace referencia, salvo que se indique de otra manera. Como se usa en el presente documento “valores por defecto” significarán cualquier conjunto de valores o parámetros que se cargan originalmente con el software cuando se inicia por primera vez.

Los “genes sintéticos” pueden ensamblarse a partir de bloques de construcción de oligonucleótidos que se sintetizan químicamente usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos bloques de construcción se ligan y se alinean para formar segmentos génicos que después se ensamblan enzimáticamente para construir el gen entero. “Sintetizado químicamente”, cuando se refiere a una secuencia de ADN, significa que los nucleótidos componentes se ensamblaron *in vitro*. La síntesis química manual del ADN puede realizarse usando procedimientos bien establecidos o la síntesis química automatizada puede realizarse usando una de un número de máquinas disponibles en el mercado. En consecuencia, los genes pueden adaptarse para la expresión génica óptima basándose en la optimización de la secuencia de nucleótidos para reflejar el sesgo de codones de la célula hospedadora. El experto en la materia aprecia la probabilidad de una expresión génica exitosa si el uso de codones se sesga hacia aquellos codones favorecidos por el hospedador. La determinación de los codones preferidos puede basarse en un estudio de los genes derivados de la célula hospedadora donde esté disponible la información de las secuencias.

Como se usa en el presente documento, dos o más sistemas de regulación génica individualmente funcionales se dice que 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 estadísticamente es significativamente diferente al cambio en la expresión de todos los demás sistemas simultáneamente funcionales en la célula, el tejido o el organismo, independientemente de la simultaneidad o la secuencialidad de la modulación actual. Preferentemente, la modulación de cada gen individualmente funcional efectúa un cambio en la expresión génica al menos 2 veces mayor que todos los demás sistemas funcionales en la célula, el tejido o el organismo. Más preferentemente, el cambio es al menos 5 veces mayor. Incluso más preferentemente, el cambio es al menos 10 veces mayor. Todavía más preferentemente, el cambio es al menos 100 veces mayor. Incluso todavía más preferentemente, el cambio es al menos 500 veces mayor. Idealmente, 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 un cambio no medible en la expresión de todos los demás sistemas funcionales en la célula, el tejido o el organismo. En tales casos el sistema de regulación génica inducible múltiple se dice que es “completamente ortogonal”. La presente descripción es útil para buscar ligandos ortogonales y sistemas de expresión génica basados en receptores ortogonales tales como aquellos descritos en la solicitud de EE.UU. co-pendiente n.º 09/965.697.

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

La frase “gen exógeno” significa un gen extraño al sujeto, esto es, un gen que se introduce dentro del sujeto a través de un proceso de transformación, una versión sin mutar de un gen mutado endógeno o una versión mutada de un gen sin mutar endógeno. El método de transformación no es crítico para la presente descripción y puede ser cualquier método adecuado para el sujeto conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, las plantas transgénicas se obtienen por la regeneración de las células transformadas. Se conocen a partir de las referencias bibliográficas numerosos procedimientos de transformación tales como agroinfección usando *Agrobacterium tumefaciens* o su plásmido T_i, electroporación, microinyección de células vegetales y protoplastos y transformación por microproyectiles. Las técnicas complementarias se conocen para la transformación de células animales y la regeneración de tales células transformadas en animales transgénicos. Los genes exógenos pueden ser genes naturales o bien sintéticos y los genes terapéuticos que se introducen en el sujeto en forma de ADN o de ARN que puede funcionar a través de un intermedio de ADN tal como por la transcriptasa reversa. Tales genes pueden introducirse en células diana, introducirse directamente en el sujeto o introducirse indirectamente por la transferencia de las células transformadas en el sujeto. El término “gen terapéutico” significa un gen que confiere una función beneficiosa a la célula hospedadora en la que tal gen se expresa. Los genes terapéuticos no se encuentran de forma natural en las células hospedadoras.

La frase “complejo receptor de ecdisona” se refiere generalmente a un complejo proteico heterodimérico que consiste en dos miembros de la familia de receptores esteroideos, las proteínas receptor de ecdisona (“EcR”) y ultraespiráculo (“USP”) (véase Yao, T.P., et al. (1993) *Nature* 366, 476-479; Yao, T.-P., et al., (1992) *Cell* 71, 63-72). El complejo receptor ecdisteroideo funcional puede incluir también proteína o proteínas adicionales tales como inmunofilinas. Los miembros adicionales de la familia de proteínas de receptores esteroideos, conocidos como factores transcripcionales (tales como DHR38, *betaFTZ-1* u otros homólogos de insectos), también pueden ser compañeros dependientes o independientes de ligando para EcR y/o USP. El complejo receptor de ecdisona también puede ser un heterodímero de la proteína receptora de ecdisona y el homólogo vertebrado de la proteína ultraespiráculo, la proteína receptora de ácido X retinoico (“RXR”). Los complejos homodiméricos de la proteína receptora de ecdisona o del USP también pueden ser funcionales en algunas circunstancias.

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

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

Las secuencias de ADN que constituyen el gen exógeno, el elemento de respuesta y el complejo receptor de ecdisona pueden incorporarse en arqueobacterias, células procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* u 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 receptor pueden incorporarse también como moléculas de ARN, preferentemente en forma de ARN víricos funcionales tales como el virus del mosaico del tabaco. De las células eucariotas, se prefieren las células de vertebrados debido a que carecen de forma natural de las moléculas que confieren respuestas a los ligandos de la presente invención para el receptor de ecdisona. Como resultado, son insensibles a los ligandos de la presente invención. De esta manera, los ligandos de la presente invención tendrán efectos fisiológicos u otros efectos insignificantes en las células transformadas o en el organismo completo. Por lo tanto, las células pueden crecer y expresar el producto deseado, sustancialmente no afectado por la presencia del ligando por sí mismo.

El término "sujeto" significa una planta o un animal intactos o una célula de una planta o de un animal. Se anticipa también que los ligandos trabajarán igualmente bien cuando el sujeto es un hongo o una levadura. Cuando el sujeto es un animal intacto, el animal preferentemente es un vertebrado, más preferentemente un mamífero.

Los ligandos de la presente invención, cuando se usan con el complejo receptor de ecdisona que a su vez se une 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, esto es, ligando a complejo receptor y complejo receptor a elemento de respuesta, no es crítico. Típicamente, la modulación de la expresión del gen exógeno es en respuesta a la unión del complejo receptor de ecdisona a un elemento de ADN de control específico o regulador. La proteína receptora de ecdisona, como otros miembros de la familia receptora de esteroides, posee al menos tres dominios, un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al ligando. Este receptor, como un subconjunto de la familia de receptores esteroideos, también posee regiones menos bien definidas responsables de las propiedades de heterodimerización. La unión del ligando al dominio de unión al ligando de la proteína receptora de ecdisona, después de la heterodimerización con la proteína USP o RXR, permite que los dominios de unión al ADN de las proteínas heterodiméricas que se unan al elemento de respuesta en una forma activada, de esta manera dando como resultado la expresión o la supresión del gen exógeno. Este mecanismo no excluye la posibilidad de que el ligando se una tanto al EcR como al USP y la formación resultante de los complejos homodiméricos activos (por ejemplo EcR+EcR o USP+USP). Preferentemente, uno o más de los dominios receptores pueden variarse produciendo un interruptor génico quimérico. Típicamente, uno o más de los tres dominios pueden elegirse de una fuente diferente a la fuente de los otros dominios de tal manera que el receptor quimérico se optimice en la célula o en el organismo hospedadores elegidos para la actividad de transactivación, la unión complementaria del ligando y el reconocimiento de un elemento de respuesta específico. Además, el elemento de respuesta por sí mismo puede modificarse o sustituirse con elementos de respuesta para otros dominios de proteínas de unión al ADN tales como la proteína GAL-4 de levaduras (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 los complejos receptores de ecdisona quiméricos. Otra ventaja de los sistemas quiméricos es que permiten elegir un promotor usado para dirigir el gen exógeno de acuerdo con un resultado final deseado. Tal control doble puede ser particularmente importante en áreas de la terapia génica, especialmente cuando se producen proteínas citotóxicas, debido a que pueden controlarse tanto el momento de la expresión así como las células en las que la expresión. El término "promotor" significa una secuencia de nucleótidos específica reconocida por la ARN polimerasa. La secuencia es el sitio en el que la transcripción puede iniciarse específicamente en condiciones apropiadas. Cuando los genes exógenos, unidos funcionalmente a un promotor adecuado, se introducen en las células del sujeto, la expresión de los genes exógenos se controla por la presencia del ligando de la presente invención. Los promotores pueden regularse constitutivamente o de forma inducida o pueden ser específicos de tejidos (esto es, se expresan solamente en un tipo de célula particular) o específicos de ciertas etapas del desarrollo del organismo.

Otro aspecto de la presente descripción es un método para modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz, esto es, la cantidad requerida para provocar la

expresión o la 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 receptor de ecdisona que comprende:

- 1) un dominio de unión al ADN;
- 2) un dominio de unión para el ligando; y
- 3) un dominio de transactivación; y

b) una construcción de ADN que comprende:

- 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 al ADN al elemento de respuesta en presencia del ligando da como resultado la activación o la supresión del gen.

Un aspecto relacionado con la presente 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 al ADN para el receptor de ecdisona y en el que la formación de un complejo receptor de ecdisona-ligando-secuencia de unión al ADN induce la expresión del gen.

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

- a) seleccionar una célula que sea sustancialmente insensible a la exposición a un ligando que comprende un compuesto de la presente invención;
- b) introducir en la célula:

1) una construcción de ADN que comprende:

- i) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y
- ii) un elemento de respuesta;

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

2) un complejo receptor de ecdisona que comprende:

- i) un dominio de unión al ADN
- ii) un dominio de unión para el ligando, y
- iii) un dominio de transactivación; y

c) exponer la célula al ligando.

Así como la ventaja de controlar temporalmente la producción de polipéptido por la célula, el presente aspecto de la invención proporciona una ventaja adicional, en aquellos casos cuando la acumulación de un polipéptido tal puede dañar a la célula, en que la expresión del polipéptido puede limitarse a periodos cortos. Tal control es particularmente importante cuando el gen exógeno es un gen terapéutico. Los genes terapéuticos pueden llamarse 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 aquellas letales para las células cancerígenas. Tal control puede ser importante también cuando los niveles de las proteínas producidas pueden constituir un drenaje metabólico en el crecimiento o la reproducción, tal como en las plantas transgénicas.

Se conocen bien en la técnica numerosas secuencias genómicas y de ácidos nucleicos de ADNc que codifican para una diversidad de polipéptidos. El material genético exógeno útil con los ligandos de la presente invención incluye genes que codifican proteínas de interés biológicamente activas, tales como, por ejemplo, proteínas secretoras que pueden liberarse de una célula; enzimas que pueden metabolizar un sustrato a partir de una sustancia tóxica hacia una sustancia no tóxica o desde una sustancia inactiva hacia una sustancia activa; proteínas reguladoras; receptores de la superficie celular; y similares. Los genes útiles también incluyen genes que codifican factores de coagulación de la sangre, hormonas tales como insulina, hormona paratiroidea, factor de liberación de la hormona luteinizante, inhibinas alfa y beta seminales y hormona del crecimiento humana; genes que codifican proteínas tales como enzimas, la ausencia de las cuales da lugar a que se dé un estado anormal; genes que codifican citocinas o linfocinas tales como interferones, factor de estimulación de la colonia de macrófagos granulocíticos, factor estimulador de colonias 1, factor de necrosis tumoral y eritropoyetina; genes que codifican sustancias inhibitoras tales como alfa₁-antitripsina, genes que codifican sustancias que funcionan como fármacos tales como toxinas de la

difteria y del cólera; y similares. Los genes útiles también incluyen aquellos útiles para terapias de cáncer y para tratar trastornos genéticos. Aquellos expertos en la materia tienen acceso a la información de las secuencias de ácidos nucleicos para conocer prácticamente todos los genes conocidos y pueden obtener la molécula de ácido nucleico directamente de un depósito público, de la institución que publicó la secuencia o bien emplear métodos rutinarios para preparar la molécula.

Para el uso de la terapia génica, los ligandos descritos en el presente documento pueden tomarse en vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, ungüentos, elixires y composiciones inyectables. Las preparaciones farmacéuticas pueden contener del 0,01 % al 99 % en peso del ligando. Las preparaciones pueden estar en formas de dosis únicas o bien múltiples. La cantidad del ligando en cualquier preparación farmacéutica particular dependerá de la dosis eficaz, esto es, la dosis requerida para provocar la expresión o la supresión génica deseada.

Las rutas 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 por tubo nasogástrico. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que la ruta de administración preferida dependerá de la afección a tratarse y puede variar con factores tales como la condición del receptor.

Los ligandos descritos en el presente documento también pueden administrarse junto con otros compuestos farmacéuticamente activos. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que los compuestos farmacéuticamente activos a usar en combinación con los ligandos descritos en el presente documento se seleccionarán para 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 quimioterapéuticos contra el SIDA, derivados de aminoácidos, analgésicos, anestésicos, productos anorectales, antiácidos y antiflatulentos, antibióticos, anticoagulantes, antidotos, agentes antifibrinolíticos, antihistamínicos, agentes anti-inflamatorios, antineoplásicos, antiparasitarios, antiprotozooides, antipiréticos, antisépticos, antiespasmódicos y anticolinérgicos, antivirales, supresores del apetito, medicaciones para la artritis, modificadores de la respuesta biológica, reguladores del metabolismo óseo, evacuantes intestinales, agentes cardiovasculares, estimulantes del sistema nervioso central, potenciadores metabólicos cerebrales, cerumenolíticos, inhibidores de la colinesterasa, preparaciones para el resfriado y la tos, factores estimulantes de colonias, anticonceptivos, agentes citoprotectores, preparaciones dentales, desodorantes, productos dermatológicos, agentes detoxificantes, agentes para la diabetes, diagnósticos, medicaciones para la diarrea, agonistas del receptor de dopamina, electrolitos, enzimas y digestivos, preparaciones para el cornezuelo, agentes de fertilidad, suplementos de fibra, agentes antifúngicos, inhibidores de la galactorrea, inhibidores de la secreción de ácidos gástricos, agentes procinéticos gastrointestinales, inhibidores de la gonadotropina, estimulantes del crecimiento capilar, antianémicos, agentes hemorreológicos, hemostáticos, antagonistas del receptor H_2 de histamina, hormonas, agentes hiperglucémicos, hipolipidémicos, inmunosupresores, laxantes, leprostáticos, adjuntos para la leucoféresis, tensioactivos del pulmón, preparaciones para la migraña, mucolíticos, antagonistas de relajantes musculares, relajantes musculares, antagonistas de narcóticos, pulverizadores nasales, análogos de nucleósidos para medicaciones de náuseas, suplementos nutricionales, preparaciones para la osteoporosis, oxitócicos, parasimpatolíticos, parasimpatomiméticos, fármacos para el Parkinson, adyuvantes para la Penicilina, fosfolípidos, inhibidores de plaquetas, agentes para la porfiria, análogos de prostaglandinas, prostaglandinas, inhibidores de las bombas de protones, psicotrópicos para medicaciones de purito, quinolonas, estimulantes respiratorios, estimulantes de la saliva, sustitutos de la sal, agentes esclerosantes, preparaciones para heridas de la piel, ayudas para dejar de fumar, sulfonamidas, simpatolíticos, trombolíticos, agentes para el síndrome de Tourette, preparaciones para el temblor, preparaciones para la tuberculosis, agentes uricosúricos, agentes para el tracto urinario, contractores uterinos, relajantes uterinos, preparaciones vaginales, agentes para el vértigo, análogos de la vitamina D, vitaminas y medios de contraste de imagen médicos. En algunos casos los ligandos pueden ser útiles como un complemento de la terapia farmacológica, por ejemplo, para "apagar" un gen que produce una enzima que metaboliza un fármaco particular.

Para aplicaciones agrícolas, además de las aplicaciones descritas anteriormente, los ligandos de la presente invención pueden usarse también para controlar la expresión de proteínas plaguicidas tales como la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tal expresión puede ser específica de tejido o de planta. Además, particularmente cuando también se necesita el control de las plagas vegetales, pueden combinarse uno o más plaguicidas con los ligandos descritos en el presente documento, proporcionando de esta manera ventajas adicionales y eficacia, incluyendo aplicaciones totales menores, que si los plaguicidas se aplican separadamente. Cuando se emplean mezclas con plaguicidas, las proporciones relativas de cada componente en la composición dependerán de la eficiencia relativa y de la velocidad de aplicación deseada de cada plaguicida con respecto a los cultivos, las plagas y/o las malas hierbas a tratarse. Los expertos en la materia reconocerán que las mezclas de plaguicidas pueden proporcionar ventajas tales como un espectro más amplio de actividad que un pesticida usado solo. Los ejemplos de plaguicidas que pueden combinarse en las composiciones con los ligandos descritos en el presente documento incluyen fungicidas, herbicidas, insecticidas, miticidas y microbicidas.

Los ligandos descritos en el presente documento pueden aplicarse al follaje vegetal como pulverizadores acuosos por métodos comúnmente empleados, tales como pulverizadores convencionales hidráulicos de altos litros, pulverizadores de bajos litros, aire comprimido y pulverizadores aéreos. La dilución y la velocidad de aplicación dependerán del tipo de equipo empleado, el método y la frecuencia de aplicación deseados y la velocidad de aplicación del ligando. Puede ser deseable incluir adyuvantes adicionales en el tanque de pulverizado. Tales adyuvantes incluyen tensioactivos, dispersantes, esparciadores, 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 pueden mezclarse en equipo de mezcla o de combinación o pueden incorporarse con fertilizantes en formulaciones granulares. Puede usarse cualquier proporción relativa de fertilizante que sea adecuada para los cultivos y las malas hierbas a tratarse. Los ligandos descritos en el presente documento comprenderán comúnmente del 5 % al 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 HOSPEDADORAS Y ORGANISMOS NO HUMANOS DE LA INVENCION

Como se describe anteriormente, los ligandos para modular el sistema de expresión génica de la presente invención pueden usarse para modular la expresión génica en una célula hospedadora. La expresión en las células hospedadoras transgénicas puede ser útil para la expresión de diversos genes de interés. La presente invención proporciona ligandos para modular la expresión génica en células hospedadoras procariontes y eucariotas. La expresión en células hospedadoras transgénicas es útil para la expresión de diversos polipéptidos de interés incluyendo pero no limitado a antígenos producidos en plantas como vacunas, enzimas como alfa-amilasa, fitasa, glucanasa y xilanasas, genes para la resistencia contra insectos, nematodos, hongos, bacterias, virus y estreses abióticos, antígenos, productos nutracéuticos, productos farmacéuticos, vitaminas, genes para modificar el contenido de aminoácidos, resistencia a herbicidas, tolerancia al frío, a la sequía y al calor, productos industriales, aceites, proteínas, carbohidratos, antioxidantes, plantas macho estériles, flores, combustibles, otros rasgos de salida, polipéptidos terapéuticos, intermedios de rutas; para la modulación de rutas que ya existen en el hospedador para la síntesis de nuevos productos hasta ahora de no posible uso en el hospedador; ensayos basados en células; ensayos genómicos funcionales, producción de proteínas bioterapéuticas, ensayos de proteómica y similares. Adicionalmente los productos génicos pueden ser útiles para conferir mayores producciones de crecimiento del hospedador o para posibilitar un modo de crecimiento alternativo a utilizarse.

De esta manera, la presente invención proporciona ligandos para modular la expresión génica en una célula hospedadora aislada de acuerdo con la descripción. La célula hospedadora 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 hospedadora, en los que el método comprende cultivar la célula hospedadora como se describe anteriormente en un medio de cultivo en las condiciones que permitan la expresión de un polinucleótido que codifica el dominio de unión al ligando del receptor nuclear que comprende una mutación de sustitución y aislar el dominio de unión al ligando del receptor nuclear que comprende una mutación de sustitución a partir del cultivo.

En una realización específica, la célula hospedadora aislada es una célula hospedadora procarionte o una célula hospedadora eucariota. En otra realización específica, la célula hospedadora aislada es una célula hospedadora de invertebrado o una célula hospedadora de vertebrado. Preferentemente, la célula hospedadora 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 preferentemente, la célula hospedadora 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 bovina, 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 humana. Los ejemplos de las células hospedadoras preferidas incluyen, pero no se limitan a, especies de hongos o de levaduras tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* o especies bacterianas tales como aquellas de los géneros *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Alcaligenes*, *Anabaena*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium* y *Klebsiella*; especies vegetales seleccionadas del grupo que consiste en una manzana, *Arabidopsis*, mijo perla, plátano, cebada, judías, remolacha, frijol negro, garbanzo, chili, pepino, berenjena, haba, maíz, melón, mijo, frijol mungo, avena, oca, *Panicum*, papaya, cacahuete, guisante, pimienta, guandul, piña, *Phaseolus*, patata, calabaza, arroz, sorgo, soja, chayote, caña de azúcar, remolacha de azúcar, girasol, batata, té, tomate, tabaco, sandía y trigo; animales; y células hospedadoras de mamíferos.

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

En otra realización específica, la célula hospedadora es una célula del nematodo *Caenorhabditis elegans*.

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

En otra realización específica, la célula hospedadora es una célula vegetal seleccionada del grupo que consiste en una célula de manzana, de *Arabidopsis*, de mijo perla, de plátano, de cebada, de judía, de remolacha, de frijol negro, de garbanzo, de chili, de pepino, de berenjena, de haba, de maíz, de melón, de mijo, de frijol mungo, de avena, de oca, de *Panicum*, de papaya, de cacahuete, de guisante, de pimienta, de guandul, de piña, de *Phaseolus*, de patata, de calabaza, de arroz, de sorgo, de soja, de chayote, de caña de azúcar, de remolacha de azúcar, de girasol, de batata, de té, de tomate, de tabaco, de sandía y de trigo.

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

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

En otra realización específica, la célula hospedadora 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 bovina, 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 o una célula humana.

La transformación de la célula hospedadora se conoce bien en la técnica y puede lograrse mediante una diversidad de métodos que incluyen pero no se limitan a electroporación, infección vírica, transfección del plásmido/vector, transfección mediada por un vector no vírico, transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo de partículas y similares. La expresión de los productos génicos deseados implica cultivar las células hospedadoras transformadas en condiciones adecuadas e inducir la expresión del gen transformado. Las condiciones de cultivo y los protocolos de expresión génica en células procariotas y eucariotas se conocen bien en la técnica (véase la sección Métodos Generales de los Ejemplos). Las células pueden cultivarse y los productos génicos aislarse de acuerdo a protocolos específicos para el producto génico.

Además, una célula hospedadora puede seleccionarse que module la expresión del polinucleótido insertado o que modifique y procese el producto polipeptídico de la forma específica deseada. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación traduccional y post-traduccional [por ejemplo, glicosilación, escisión (por ejemplo, de la secuencia señal)] de las proteínas. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano puede usarse para producir un producto proteico nuclear no glicosilado. Sin embargo, un polipéptido expresado en bacterias puede no plegarse correctamente. La expresión en levaduras puede producir un producto glucosilado. La expresión en células eucariotas puede aumentar la probabilidad de la glicosilación y el plegamiento "nativos" de una proteína heteróloga. Además, la expresión en células de mamíferos puede proporcionar una herramienta para reconstituir o constituir la actividad del polipéptido. Además, diferentes sistemas de expresión vector/hospedador pueden afectar a las reacciones de procesamiento, tales como cortes y empalmes proteolíticos, en un grado diferente. La presente descripción también se refiere a un organismo no humano que comprende una célula hospedadora aislada de acuerdo con la descripción. En una realización específica, el organismo no humano es un organismo procariota o un organismo eucariota. En otra realización específica, el organismo no humano es un organismo invertebrado o un organismo vertebrado.

Preferentemente, 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 pájaro, un animal y un mamífero. Más preferentemente, 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 bovino, una cabra, una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja, un simio, un mono o un chimpancé.

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 *Caenorhabditis elegans*.

En otra realización específica, el organismo no humano es una planta seleccionada del grupo que consiste en una célula de manzana, *Arabidopsis*, mijo perla, plátano, cebada, judías, remolacha, frijol negro, garbanzo, chili, pepino, berenjena, haba, maíz, melón, mijo, frijol mungo, avena, oca, *Panicum*, papaya, cacahuete, guisante, pimienta, guandul, piña, *Phaseolus*, patata, calabaza, arroz, sorgo, soja, chayote, caña de azúcar, remolacha de azúcar, girasol, batata, 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

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. Como se presenta en el siguiente documento, un nuevo grupo de ligandos proporciona un sistema de expresión génica inducible mejorado tanto en células hospedadoras procariotas como eucariotas. De esta manera, la presente invención se refiere a ligandos que son útiles para modular la expresión de los genes. 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 una casete de expresión génica que es capaz de expresarse en una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende el dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H. Preferentemente, el dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H es de un receptor de ecdisona, de un receptor ubicuo, de un receptor huérfano 1, de un NER-1, de un receptor nuclear de hormonas esteroideas 1, de una proteína 15 de interacción con el receptor X del retinoide, de un receptor X de hígado β , de una proteína parecida al receptor de hormonas esteroideas, de un receptor X de hígado, de un receptor X de hígado α , de un receptor X de farnesoide, de una proteína 14 de interacción con receptor y de un receptor del farnesol. Más preferentemente, el dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H es de un receptor de ecdisona.

En una realización específica, el sistema de modulación de la expresión génica comprende una casete de expresión génica que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que consiste en una mutación de sustitución. El sistema de modulación de la expresión génica puede comprender adicionalmente una segunda casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión al ADN del polipéptido codificado de la primera casete de expresión génica; ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación del polipéptido codificado de la primera casete de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión ha de modularse.

En otra realización específica, el sistema de modulación de la expresión génica comprende una casete de expresión génica que comprende a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que comprende una mutación de sustitución y b) un segundo dominio de unión al ligando del receptor nuclear seleccionado del grupo que consiste en un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide de vertebrados, un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide de invertebrados, un dominio de unión al ligando de la proteína ultraespiráculo y un dominio de unión al ligando quimérico que comprende dos fragmentos polipeptídicos, en el que el primer fragmento polipeptídico es de un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide de vertebrados, un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide de invertebrados o un dominio de unión al ligando de la proteína ultraespiráculo y el segundo fragmento polipeptídico es de un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide de vertebrados, un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide de invertebrados o un dominio de unión al ligando de la proteína ultraespiráculo diferentes. El sistema de modulación de la expresión génica puede comprender adicionalmente una segunda casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión al ADN del polipéptido codificado de la primera casete de expresión génica; ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación del polipéptido codificado de la primera casete de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión ha de modularse.

En otra realización específica, el sistema de modulación de la expresión génica comprende una primera casete de expresión génica que comprende un polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse y un dominio de unión al ligando del receptor nuclear y una segunda casete de expresión génica que comprende un polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende un dominio de transactivación y un dominio de unión al ligando del receptor nuclear, en el que uno de los dominios de unión al ligando del receptor nuclear es un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del 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 al ADN. Para los fines de la invención, "sustancialmente libre" significa que la proteína en cuestión no contiene una secuencia suficiente del dominio en cuestión para proporcionar la activación o la actividad de unión. El sistema de modulación de la expresión génica puede comprender adicionalmente una tercera casete de expresión génica que comprende: i) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión al ADN del primer polipéptido de la primera casete de expresión génica; ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación del segundo polipéptido de la segunda casete de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión ha de modularse.

En el que cuando solamente un dominio de unión al ligando del receptor nuclear es un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que comprende una mutación de sustitución, el otro dominio de unión al ligando del receptor nuclear puede ser de cualquier otro receptor nuclear que forme un dímero con el dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que comprende la mutación de sustitución. Por ejemplo, cuando el dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que comprende una mutación de sustitución es un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona que comprende una mutación de sustitución, el otro dominio de unión al ligando del receptor nuclear ("compañero") puede ser de un receptor de ecdisona, de un receptor X del retinoide

(RXR) de vertebrados, de un RXR de invertebrados, de una proteína ultraespiráculo (USP) o de un receptor nuclear quimérico que comprende al menos dos fragmentos polipeptídicos dominios de unión al ligando del receptor nuclear distintos seleccionados del grupo que consiste en un RXR de vertebrados, un RXR de invertebrados y un USP (véase solicitudes co-pendientes n.º PCT/IS01/09050, n.º PCT/US02/05235 y n.º PCT/US02/05706). El dominio de unión al ligando del receptor nuclear "compañero" puede comprender adicionalmente una mutación truncada, una mutación de delección, una mutación de sustitución u otra modificación.

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

Preferentemente, el dominio de unión al ligando del RXR de invertebrados es de un polipéptido de ultraespiráculo de langosta *Locusta migratoria* ("LmUSP"), de un homólogo 1 de RXR de garrapata ixódida *Amblyomma americanum* ("AmaRXR1"), de un homólogo 2 de RXR de garrapata ixódida *Amblyomma americanum* ("AmaRXR2"), de un homólogo de RXR de cangrejo violinista *Celaca pugilator* ("CpRXR"), de un homólogo de RXR de escarabajo *Tenebrio molitor* ("TmRXR"), de un homólogo de RXR de abeja melífera *Apis mellifera* ("AmRXR"), de un homólogo de RXR de áfido *Myzus persicae* ("MpRXR") o de un homólogo de RXR distinto de Dípteros o distinto de Lepidópteros.

Preferentemente, el dominio de unión al ligando de RXR quimérico comprende al menos dos fragmentos polipeptídicos seleccionados del grupo que consiste en un fragmento de polipéptido de RXR de una especie vertebrada, un fragmento de polipéptido de RXR de una especie invertebrada y un fragmento de polipéptido homólogo de RXR de una especie de invertebrado distinta de Dípteros/distinta de Lepidópteros. Un dominio de unión al ligando de RXR quimérico para usar en la presente invención puede comprender al menos dos fragmentos polipeptídicos de RXR de especies diferentes o cuando la especie es la misma, los dos o más fragmentos polipeptídicos pueden ser de dos o más isoformas diferentes del fragmento polipeptídico de RXR de la especie.

En una realización preferida, el dominio de unión al ligando RXR quimérico comprende al menos un fragmento polipeptídico de RXR de especie vertebradas y un fragmento polipeptídico de RXR de especie invertebrada.

En una realización más preferida, el dominio de unión al ligando RXR quimérico comprende al menos un fragmento polipeptídico de RXR de especie vertebradas y un fragmento polipeptídico homólogo de RXR de especie invertebrada distinta de Dípteros/distinta de Lepidópteros.

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

Los ligandos para usar en la presente invención como se describen a continuación, cuando se combinan con el dominio de unión al ligando del receptor o los receptores nucleares, que a su vez se unen al elemento de respuesta unido a un gen, proporcionan los medios para la regulación temporal externa de la expresión del gen. El mecanismo de unión en el orden en el que los diversos componentes de la presente invención se unen entre sí, esto es, por ejemplo, ligando al dominio de unión al ligando, dominio de unión al ADN al elemento de respuesta, dominio de transactivación al promotor, etc., no es crítico.

En un ejemplo específico, la unión del ligando al dominio de unión del ligando de un receptor nuclear del Grupo H y su compañero de dominio de unión al ligando del receptor nuclear permite la expresión o la supresión del gen. Este mecanismo no excluye la posibilidad de que el ligando se una al receptor nuclear del Grupo H (GHNR) o su compañero y la formación resultante de complejos homodiméricos activos (por ejemplo GHNR + GHNR o compañero + compañero). Preferentemente, uno o más de los dominios receptores se varía produciendo un interruptor génico híbrido. Típicamente, uno o más de los tres dominios DBD, LBD y dominio de transactivación, pueden elegirse de una fuente diferente a la fuente de los otros dominios de tal manera que los genes híbridos y las proteínas híbridas resultantes se optimizan en la célula o en el organismo hospedadores elegidos para la actividad de transactivación, la unión complementaria del ligando y el reconocimiento de un elemento de respuesta específico. Además, el elemento de respuesta por sí mismo puede modificarse o sustituirse con elementos de respuesta de otros dominios de proteínas de unión al ADN tales como la proteína GAL-4 de levaduras (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 para las interacciones diana con proteínas diseñadas, modificadas y seleccionadas para tales interacciones específicas (véase, por ejemplo, Kim, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 94: 3616-3620) para acomodar los receptores híbridos. Otra ventaja de los sistemas de doble híbrido es que permiten la elección de un promotor usado para dirigir la expresión de acuerdo con un resultado final deseado. Tal control doble puede ser particularmente importante en áreas de terapia génica, especialmente cuando se producen proteínas citotóxicas, debido a que puede controlarse el tiempo de la expresión así como las células en las que se da la expresión. Cuando los genes, unidos funcionalmente a un promotor adecuado, se introducen en las células del sujeto, la expresión de los genes exógenos se controla por la presencia del sistema de la presente

descripción. Los promotores pueden inducirse constitutivamente o de forma inducible o pueden ser específicos de tejido (esto es, se expresan solamente en un tipo particular de células) o específicos de ciertas etapas del desarrollo del organismo.

El receptor de ecdisona es un miembro de la superfamilia del receptor nuclear y se clasifica en subfamilia 1, grupo H (denominada en el presente documento como "receptores nucleares del 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 (OR-1), receptor nuclear de hormonas esteroideas 1 (NER-1), proteína 15 de interacción con el receptor X del retinoide (RIP-15), receptor X de hígado β (LXR β), proteína parecida al receptor de hormonas esteroideas (RLD-1), receptor X de hígado (LXR), receptor X de hígado α (LXR α), receptor X del farnesoide (FXR), proteína 14 de interacción con receptor (RIP-14) y receptor del farnesol (HRR-1).

En particular, en el presente documento se describen nuevos ligandos útiles en un sistema de modulación de la expresión génica que comprende un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H que comprende una mutación de sustitución. Este sistema de expresión génica puede ser un sistema de expresión génica basada en "interruptor único" en el que el dominio de transactivación, el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando están en un polipéptido codificado. De forma alternativa, el sistema de modulación de la expresión génica puede ser un sistema de modulación de la expresión génica basado en "interruptor dual" o "doble híbrido" en el que el dominio de transactivación y el dominio de unión al ADN se localizan 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 heterodimérico o bien homodimérico. Un complejo EcR funcional se refiere generalmente a un complejo proteico heterodimérico que consiste en dos miembros de la familia del receptor esteroideo, una proteína receptora de ecdisona obtenida de diversos insectos y una proteína ultraespiráculo (USP) o el homólogo vertebrado del USP, la proteína receptora X del retinoide (véase Yao et al. (1993) Nature 366, 476-479; Yao et al., (1992) Cell 71, 63-72). Sin embargo, el complejo puede ser también un homodímero como se detalla a continuación. El complejo receptor ecdisteroideo funcional puede incluir también proteína o proteínas adicionales tales como inmunofilinas. Los miembros adicionales de la familia de proteínas del receptor esteroideo, conocidos como factores transcripcionales (tales como DHR38 o *betaFTZ-1*), pueden ser también compañeros dependientes o independientes de ligando para el EcR, el USP y/o el RXR. Adicionalmente, pueden requerirse otros cofactores tales como proteínas conocidos generalmente como coactivadores (también denominados adaptadores o mediadores). Estas proteínas no se unen específicamente por secuencia al ADN y no están implicados en la transcripción basal. Pueden ejercer su efecto en la activación de la transcripción a través de diversos mecanismos, incluyendo la estimulación de la unión al ADN de activadores, afectando a la estructura de la cromatina o mediante interacciones complejas activador-iniciación. Los ejemplos de tales coactivadores incluyen RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA3/pCIP así como la proteína promiscua de unión al elemento B de respuesta del coactivador C, CBP/p300 (para revisión véase Glass et al., Curr Opin. Cell Biol. 9: 222-232, 1997). Además, los cofactores proteicos conocidos generalmente como correpresores (también conocidos como represores, silenciadores o mediadores silenciadores) pueden requerirse para inhibir eficazmente la activación transcripcional en ausencia de ligando. Estos correpresores pueden interactuar con el receptor de ecdisona sin ligando para silenciar la actividad en el elemento de respuesta. Las pruebas actuales sugieren que la unión del ligando cambia la conformación del receptor, que da como resultado la liberación del correpresor y el reclutamiento de los coactivadores anteriormente descritos, de esta manera aboliendo su actividad silenciadora. Los ejemplos de correpresores incluyen N-CoR y SMRT (para revisión, véase Horwitz et al. Mol Endocrinol. 10:1167-1177, 1996). Estos cofactores pueden ser endógenos dentro de la célula o del organismo o bien pueden añadirse exógenamente como transgenes para expresarse de forma regulada o bien sin regular. Los complejos homodiméricos de la proteína receptora de ecdisona, USP o RXR pueden ser también funcionales en algunas circunstancias.

El complejo receptor de ecdisona incluye típicamente proteínas que son miembros de la superfamilia del receptor nuclear en el que todos los miembros se caracterizan generalmente por la presencia de un dominio de transactivación amino terminal, un dominio de unión al ADN ("DBD") y un dominio de unión al ligando ("LBD") separado del DBD por una región bisagra. Como se usa en el presente documento, la frase "dominio de unión al ADN" comprende una secuencia polipeptídica mínima de una proteína de unión al ADN, hasta la longitud completa de una proteína de unión al ADN, tan larga como para que el dominio de unión al ADN funcione para asociarse a un elemento de respuesta particular. Los miembros de la superfamilia del receptor nuclear también se caracterizan por la presencia de cuatro o cinco dominios: A/B, C, D, E y en algunos miembros F (véase la patente de EE.UU. n.º 4.981.784 y Evans, Science 240: 889-892 (1988)). El dominio "A/B" corresponde al dominio de transactivación, "C" corresponde al dominio de unión al ADN, "D" corresponde a la región bisagra y "E" corresponde al dominio de unión al ligando. Algunos miembros de la familia pueden tener también otro dominio de transactivación en el lado carboxi-terminal del LBD que corresponde a "F".

El DBD se caracteriza por la presencia de dos dedos de cisteína cinc entre los que hay dos motivos de aminoácidos, la caja P y la caja D, que confieren especificidad para los elementos de respuesta a ecdisona. Estos dominios pueden ser nativos, modificados o bien quimeras de dominios diferentes de proteínas receptoras heterólogas. El

receptor EcR, como un subconjunto de la familia del receptor esteroideo, también posee regiones menos bien definidas responsables de las propiedades de heterodimerización. Debido a que los dominios de los receptores nucleares son modulares por naturaleza, los LBD, los DBD y los dominios de transactivación pueden intercambiarse.

Se sabe que los sistemas interruptores génicos incorporan componentes del complejo receptor de ecdisona. Sin embargo, en estos sistemas conocidos, cuando se usa el EcR se asocia a dominios de unión al ADN nativos o modificados y a dominios de transactivación en la misma molécula. El USP o el RXR se usan típicamente como compañeros silenciosos. Se ha demostrado previamente que cuando los dominios de unión al ADN y los dominios de transactivación están en la misma molécula la actividad de fondo en ausencia de ligando es mayor y que tal actividad se reduce dramáticamente cuando los dominios de unión al ADN y los dominios de transactivación están en diferentes moléculas, esto es, en cada uno de los dos compañeros de un complejo heterodimérico u homodimérico (véase el documento PCT/US01/09050).

MÉTODO PARA MODULAR LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA INVENCION

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

La descripción también proporciona un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora que comprende las etapas de: a) introducir en la célula hospedadora un sistema de modulación de la expresión génica de acuerdo con la descripción; b) introducir en la célula hospedadora una casete de expresión génica de acuerdo con la descripción, en el que la casete de expresión génica comprende: i) un elemento de respuesta que comprende un dominio reconocido por el dominio de unión al ADN del sistema de expresión génica; ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación del sistema de expresión génica; y iii) un gen cuya expresión ha de modularse; y c) introducir en la célula hospedadora un ligando; con lo que tras la introducción del ligando en la célula hospedadora, la expresión del gen se modula.

La presente descripción también proporciona un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora que comprende una casete de expresión génica que comprende un elemento de respuesta que comprende un dominio al que se une el dominio de unión al ADN del primer polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; un promotor que se activa por el dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido del sistema de modulación de la expresión génica; y un gen cuya expresión ha de modularse; en el que el método comprende las etapas de: a) introducir en la célula hospedadora un sistema de modulación de la expresión génica de acuerdo con la descripción; y b) introducir en la célula hospedadora un ligando; con lo que tras la introducción del ligando en la célula hospedadora, la expresión del gen se modula.

Los genes de interés para la expresión en una célula hospedadora que usan los métodos descritos en el presente documento pueden ser genes endógenos o genes heterólogos. La información de la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos para un gen o una proteína deseada puede localizarse en una de muchas bases de datos de acceso público, por ejemplo, GENBANK, EMBL, Swiss-Prot y PIR o en muchas publicaciones en revistas relacionadas con la biología. De esta manera, los expertos en la materia tendrán acceso a la información de la secuencia de ácidos nucleicos para conocer prácticamente todos los genes. Tal información puede usarse después para construir las construcciones deseadas para la inserción del gen de interés dentro de las casetes de expresión usadas en los métodos descritos en el presente documento.

Los ejemplos de los genes de interés para la expresión en una célula hospedadora usando los 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 xilanas, genes para la resistencia contra insectos, nematodos, hongos, bacterias, virus y estreses abióticos, productos nutracéuticos, productos farmacéuticos, vitaminas, genes para modificar el contenido de aminoácidos, resistencia a herbicidas, tolerancia al frío, a la sequía y al calor, productos industriales, aceites, proteínas, carbohidratos, antioxidantes, plantas macho estériles, flores, combustibles, otros rasgos de salida, genes que codifican polipéptidos terapéuticamente deseables o productos que pueden usarse para tratar una afección, 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 víricos para terapia génica, virus para vacunas, dianas para el descubrimiento de fármacos, genómica funcional y análisis y aplicaciones proteómicos y similares.

MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN/TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

Una medición útil de los métodos de la invención es aquella del estado transcripcional de la célula incluyendo las identidades y las abundancias del ARN, preferentemente las especies de ARNm. Tales mediciones se realizan convenientemente midiendo las abundancias de ADNc por cualquiera de las muchas tecnologías de expresión génica existentes.

La tecnología de matrices de ácidos nucleicos es una técnica útil para determinar la expresión de ARNm diferencial. Tal tecnología incluye, por ejemplo, chips de oligonucleótidos y micromatrices de ADN. Estas técnicas dependen de fragmentos de ADN u oligonucleótidos que corresponden a genes o ADNc diferentes que se inmovilizan en un soporte sólido y se hibridan en sondas preparadas a partir de conjuntos de ARNm totales extraídos de células, tejidos u organismos completos y convertidos 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, típicamente productos de PCR, que se imprimen robóticamente en un portaobjetos de microscopio. Cada gen se analiza por una secuencia de ADN diana completa o de longitud parcial. Las micromatrices con hasta 10.000 genes se están preparando ahora de forma rutinaria comercialmente. La diferencia principal entre estas dos técnicas es que los chips de oligonucleótidos utilizan típicamente oligonucleótidos 25méros que permiten el fraccionamiento de moléculas de ADN cortas mientras que las dianas de ADN más grandes de micromatrices, aproximadamente 1000 pares de bases, pueden proporcionar más sensibilidad en mezclas de ADN de fraccionamiento complejo.

Otra medición útil de los métodos de la invención es aquella de determinar el estado de traducción de la célula midiendo las abundancias de las especies proteicas constituyentes presentes en la célula usando procesos bien conocidos en la técnica.

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

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

Otros métodos para detectar los productos de la expresión génica se conocen bien en la técnica e incluyen transferencias Southern (detección de ADN), transferencias de puntos o ranuras (ADN, ARN), transferencias Northern (ARN), RT-PCR (ARN), transferencias Western (detección de polipéptidos) y análisis ELISA (polipéptidos). Aunque se prefiere menos, las proteínas marcadas pueden usarse para detectar una secuencia de ácidos nucleicos particular a la que se hibridan.

En algunos casos es necesario amplificar la cantidad de una secuencia de ácidos nucleicos. Esto puede llevarse a cabo usando uno o más de un número de métodos adecuados que incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), la amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"), la 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 secuencia de ácidos nucleicos en presencia de una ADN polimerasa termoestable, en condiciones de hibridación, con un par de cebadores de oligonucleótidos, con un cebador que se hibrida a una hebra (modelo) de la secuencia específica a detectarse. Los cebadores son lo suficientemente complementarios para que cada hebra modelo de la secuencia específica se hibride a los mismos. Se sintetiza un producto de extensión de cada cebador y es complementario a la hebra modelo de ácidos nucleicos a la que se hibridan. El producto de extensión sintetizado a partir de cada cebador puede servir también como un modelo para la síntesis adicional de los productos de extensión usando los mismos cebadores. Después de un número suficiente de rondas de síntesis de productos de extensión, la muestra puede analizarse como se describe anteriormente para evaluar si la secuencia o las secuencias a detectarse están presentes.

La presente invención puede entenderse mejor por referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplares de la invención.

Ejemplos

MÉTODOS GENERALES

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales que se usan 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. Bennis 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. y Wiley-Interscience (1987).

Los materiales y los métodos adecuados para el mantenimiento y el crecimiento de los cultivos bacterianos se conocen bien en la técnica. Las técnicas adecuadas para usar en los siguientes ejemplos pueden encontrarse 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 Philips, 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, las enzimas de restricción y los materiales usados para el crecimiento y el mantenimiento de las células hospedadoras se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) o Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) salvo que se especifique de otra manera.

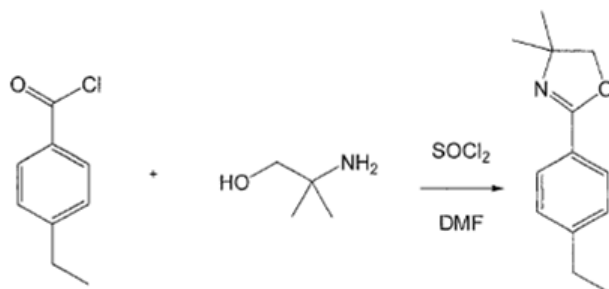
Las manipulaciones de las secuencias genéticas pueden lograrse usando el paquete de programas disponible del Genetics Computer Group Inc. (Versión de Paquete de Wisconsin 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). Donde se usa el programa GCG "Pileup" pueden usarse el valor por defecto de creación de huecos de 12 y el valor por defecto de extensión de huecos de 4. Donde se usa el programa GCG "Gap" o "Bestfit" pueden usarse la penalización de creación de huecos por defecto de 50 y la penalización de extensión de huecos por defecto de 3. En el caso donde los parámetros del programa GCG no se soliciten, en estos u otros programas GCG, pueden usarse los valores por defecto.

El significado de las abreviaturas es como sigue: "h" significa hora u horas, "min" significa minuto o minutos, "s" significa segundo o segundos, "d" significa día o días, "μl" significa microlitro o microlitros, "ml" significa mililitro o mililitros, "l" significa litro o litros, "μm" significa micromolar, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mol" significa moles, "mmol" significa milimoles, "μg" significa microgramo o microgramos, "mg" significa miligramo o miligramos, "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 o nucleótidos, "aa" significa aminoácido o aminoácidos, "pb" significa par de bases o pares de bases, "kb" significa kilobase o kilobases, "k" significa kilo, "μ" significa micro, "C" significa grados Celsius, "C" en el contexto de una ecuación química significa Celsius, "THF" significa tetrahidrofurano, "DME" significa dimetoxietano, "DMF" significa dimetilformamida, "RMN" significa resonancia magnética nuclear, "psi" se refiere a libras por pulgada cuadrada y "TLC" significa cromatografía en capa fina.

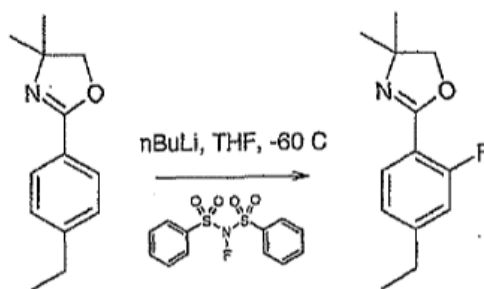
EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los compuestos de la presente descripción pueden fabricarse de acuerdo con las siguientes rutas de síntesis.

1.1 Preparación de N-terc-butil-N'-(4-etil-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-101523)



A un matraz de 3 bocas de 2 l de fondo redondo se añadieron 173,71 g (1,0 mol, 97 %) de 2-amino-2-metil-1-propanol en 300 ml de cloruro de metileno seco. El matraz se equipó con una barra de agitación magnética y un termómetro y se colocó en un baño de hielo seco/acetona y se enfrió a 0 °C. A partir de un embudo separador, se añadió lentamente una solución de cloruro de 4-etilbenzoilo (168,5 g, 1,0 mol), disuelto en aproximadamente 300 ml de cloruro de metileno, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 5 °C. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. Se filtró propanolamina-HCl sólida y la torta de filtrado se lavó con cloruro de metileno. Los extractos de cloruro de metileno combinados se concentraron parcialmente en un evaporador rotatorio y se usaron directamente en la siguiente etapa. La solución de amida intermedia generada en la primera etapa se enfrió en un baño de hielo y se añadió DMF (0,5 ml). Se añadieron gota a gota 125 g (1,04 mol) de SOCl₂ en 50 ml de cloruro de metileno a partir de un embudo separador a una velocidad controlada, manteniendo la temperatura de reacción a 0-5 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante unas 2-3 horas adicionales. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió NaOH al 25 % para hacer básica la capa acuosa (pH = 11-12). La mezcla se transfirió a un embudo separador grande, se separó la capa de cloruro de metileno y la capa acuosa se extrajo dos veces con cloroformo. Las fases orgánicas combinadas se secaron y se evaporaron para producir 201 g de 2-(4-etil-fenil)-4,4-dimetil-4,5-dihidro-oxazol como un aceite viscoso amarillo. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,8 (d, 2H), 7,2 (d, 2H), 4,088 (s, 2H), 2,68 (q, 2H), 1,375 (s, 6H), 1,24 (t, 3H).



La 4-etilfeniloxazolina (2,03 g, 10 mmol) se secó en un horno de vacío a 60 °C durante 2-3 horas, se disolvió en 50 ml de THF seco y se cargó en un matraz de fondo redondo de 300 ml equipado con un termómetro, una entrada de nitrógeno y una barra de agitación magnética. La mezcla se enfrió en nitrógeno a -70 °C en un baño de hielo seco/acetona. Se añadió butil litio en hexano (7,5 ml, 0,012 mmol) en dos porciones y se calentó a -25 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió de nuevo a -65 °C y se añadió N-fluorobencensulfonimida (3,79 g, 0,012 mmol) en tres porciones. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción se interrumpió con 100 ml de NH₄Cl saturado y se transfirió a un embudo separador con lavados de éter etílico. Se añadió NaOH al 25 % lentamente y se mezcló hasta que se logró una fase acuosa con pH = 10. La fase acuosa se extrajo con éter y el éter se lavó con un pequeño volumen de agua. Los extractos de éter se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para dar 2,51 g de 2-(2-fluoro-4-etil-fenil)-4,4-dimetil-4,5-dihidro-oxazol como un aceite marrón. En un segundo experimento, se logró una tasa de fluoración del 70 % (la mayor) con una relación de reactivos de 1:1,5:1,5 oxazolina: BuLi: N-fluorobenzensulfonimida. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,0 (d, 2H), 7,78 (t, 1H), 4,1 (s, 2H), 2,7 (q, 2H), 1,39 (s, 6H), 1,2 (t, 3H).

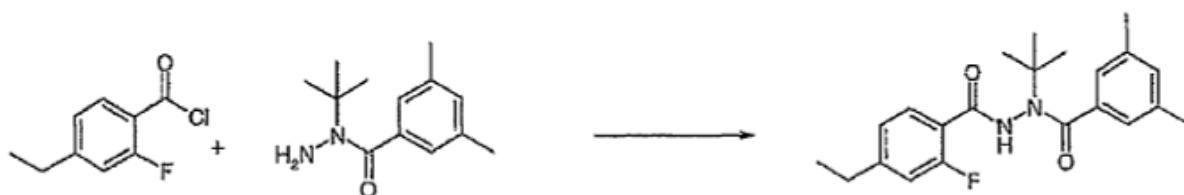


Se añadieron DMSO (4 ml) y CH₃I (2 ml) a 2,31 g de oxazolina en un matraz de fondo redondo y la mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se retiró el yoduro de metilo al vacío en un evaporador rotatorio. Se añadió KOH acuoso (4,4 g en 35 ml de agua) y la mezcla se dejó a reflujo durante 8 horas. La mezcla de reacción y los lavados de agua se transfirieron a un embudo separador; los componentes neutros se retiraron con una extracción de cloroformo. La mezcla acuosa se acidificó con HCl 6 N hasta pH 1-2 y se extrajo con éter. Los extractos de éter se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para producir 1,2 g de un sólido blanco, comprendido tanto de ácido 2-fluoro-4-etilbenzoico como de ácido 4-etilbenzoico. La mezcla producto se disolvió en KOH y el pH se ajustó con HCl 2 N hasta pH = 7. Con agitación vigorosa y monitorización cuidadosa con un pHmetro, la mezcla se acidificó hasta pH = 5 con HCl 0,1 N. El ácido 4-etilbenzoico precipitó primero, que se filtró a través de papel Whatman n.º 541, la acidificación continuó con HCl 0,1 N hasta pH = 4,9 y a incrementos de 0,1 unidades hasta pH = 4,3, cada momento filtrando los sólidos a través de papel Whatman n.º 541. Finalmente, la mezcla se acidificó a pH = 2,5 y se filtró. Los precipitados de pH decreciente contenían raciones en aumento de ácido 2-fluoro-4-etilbenzoico, las dos últimas fracciones contenían un 98-100 % del producto deseado. La extracción de la fase acuosa que queda con éter recupera más ácido 2-fluoro-4-etilbenzoico. El producto se secó al aire ya que secando en un horno de vacío da como resultado pérdidas de producto sustanciales debido a la volatilidad. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ = 7,95 (t, 1H), 7,1 (d, 1H), 7,0 (d, 1H), 2,71 (q, 2H), 1,27 (t, 3H). Ácido 4-etilbenzoico: RMN ¹H CDCl₃, δ (ppm): 8,1 (d, 2H), 7,3 (t, 2H), 2,71 (q, 2H), 1,27 (t, 3H).



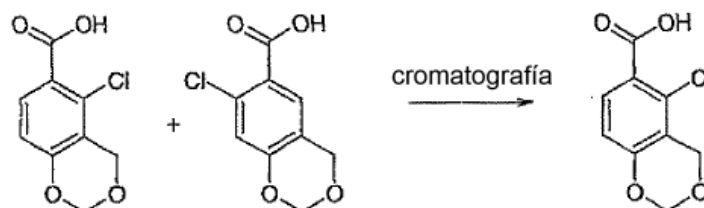
Se añadieron 1,31 g (1,3 mmol) de cloruro de tionilo, 1 gota de DMF y 1,0 g (5,95 mmol) de ácido a 30 ml de tolueno con agitación. La mezcla se dejó a reflujo durante 4 horas. Después de este periodo, el tolueno y el cloruro de tionilo

sin reaccionar se retiraron por destilación. El cloruro de 2-fluoro-4-etilbenzoilo resultante se usó sin purificación adicional.



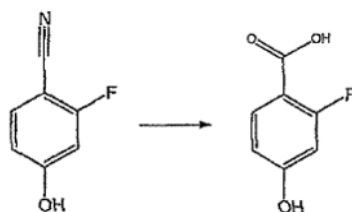
Se pesaron 0,150 g de N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (1 eq, 0,68 mmol) y 0,110 ml (1,2 eq, 0,77 mmol) de cloruro de 2-fluoro-4-etilbenzoilo en un vial de 28,35 g (1 onza). Se añadió una barra de agitación pequeña seguido por 2 ml de cloruro de metileno. La mezcla se agitó hasta que se disolvió la hidrazona. La agitación se paró y se añadieron 2 ml de una solución de carbonato potásico (K_2CO_3) 1 M. La mezcla se dejó agitar durante toda la noche. Al final de este periodo, se añadieron 1 ml de agua y 1 ml de cloruro de metileno. La fase acuosa se retiró y la fase orgánica se lavó dos veces con una solución de carbonato potásico 1 M. La fase orgánica se retiró y se secó sobre sulfato magnésico. La fase orgánica se filtró a través de una almohadilla de alúmina básica y el disolvente se retiró. El producto, N-terc-butil-N'-(2-fluoro-4-etilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetilbenzoico, se purificó por trituración con éter:hexano 1:1. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,7 (m, 2H), 7,6 (t, 1H), 7,0 (m, 3H), 2,6 (q, 2H), 2,3 (s, 3H), 2,1 (s, 6H), 1,5 (s, 9H), 1,1 (t, 3H).

1.2 Preparación de ácido 5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico



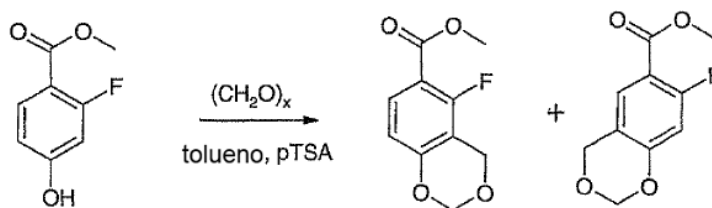
Se separaron los isómeros 5-cloro y 7-cloro por cromatografía en cartucho de gel de sílice. La mezcla se disolvió en $CHCl_3/CH_3OH$ y se añadió en la parte de arriba de un cartucho grande. El isómero 5-cloro eluyó con éter: hexano 2:3 y el 7-cloroisómero comenzó a eluir con éter: hexano 3:2 y la elución se completó con éter puro. RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 7,75 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 5,3 (s, 2H), 4,9 (s, 2H).

1.3 Preparación de ácido 2-fluoro-4-hidroxi-benzoico



A una solución agitada de 2-fluoro-4-hidroxibenzonitrilo (20,00 g, 145,9 mmol) en 160 ml de agua, se añadió hidróxido sódico acuoso al 50 % (40,00 g, 500,0 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en ácido clorhídrico concentrado en hielo y se extrajo con éter. El producto se extrajo en bicarbonato sódico acuoso saturado y la capa acuosa se descartó. Este extracto acuoso se acidificó con ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con éter. El extracto orgánico se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó para dar un sólido blanco (22,90 g) de ácido 2-fluoro-4-hidroxibenzoico con un rendimiento del 100 %. RMN 1H (300 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): 9,80 (b, 1H), 7,87 (t, 1H), 6,77 (dd, 1H), 6,66 (dd, 1H). RMN ^{19}F (300 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): -108,13 (s, desacoplado). 2-Fluoro-4-hidroxibenzonitrilo: RMN 1H (300 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): -108,82 (s, desacoplado).

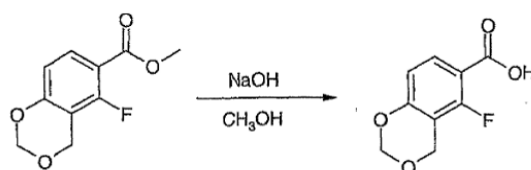
1.4 Preparación de éster metílico de ácido 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico y éster metílico de ácido 6-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carboxílico



Se combinaron 1,6 g de 2-fluoro-4-hidroxi-benzoato de metilo (7,54 mmol), 0,157 g de ácido p-toluensulfónico (0,9 mmol), 50 ml de tolueno y 1,2 g de paraformaldehído (40 mmol) y se dejaron a reflujo durante 3 h después de cuyo tiempo la TLC (acetato de etilo: CH₂Cl₂ 1:1) mostró la ausencia del material de partida. Ocasionalmente se hizo necesario enfriar la reacción y quitar rascando el paraformaldehído sin reaccionar de las paredes del matraz de reacción. El matraz de reacción se ventiló en la campana de escape. Después de que la mezcla se filtrara para retirar el paraformaldehído sólido, el sólido se lavó dos veces con 100 ml de tolueno. Los lavados de tolueno se combinaron con el líquido filtrado. La capa orgánica se lavó tres veces con 75 ml de NaOH acuoso al 5 %. Se añadieron 50 ml de metanol a la fase orgánica y el disolvente se retiró en el evaporador rotatorio para producir un jarabe espeso que formó gradualmente un sólido blanco algo pegajoso. La RMN de protón y ¹⁹F mostraron la presencia de dos isómeros en una relación de aproximadamente 7:3. Estos isómeros podían separarse con cuidado por cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de hexano a hexano al 85 %-éter al 15 %. El éster metílico de ácido 3,4-metilendioxi-2-fluoro-benzoico eluyó primero como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 3,85 (s, 3H), 4,85 (s, 2H), 5,20 (s, 2H), 6,60 (d, 1H), 7,80 (t, 1H). RMN ¹⁹F (ppm, CDCl₃) -115 (s); R_f = 0,4 (CH₂Cl₂: EtOAc 1:1).

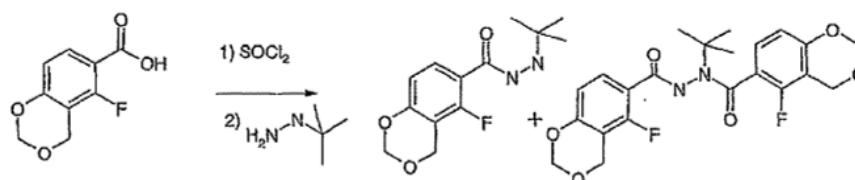
El isómero 4,5-metilendioxi eluyó poco después, también como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 3,90 (s, 3H), 4,85 (s, 2H), 5,25 (s, 2H), 6,65 (d, 1H), 7,60 (d, 1H). RMN ¹⁹F (ppm, CDCl₃) -108 (s); R_f = 0,32 (CH₂Cl₂: EtOAc 1:1).

1.5 Preparación de ácido 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico y ácido 6-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carboxílico



Se añadieron éster metílico de ácido 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico (2,02 g), agua (1 ml), metanol (20 ml) e hidróxido sódico (1 ml de una solución de NaOH al 50 %) se añadieron a un matraz equipado con un condensador y una barra de agitación magnética. La agitación comenzó y la mezcla se dejó a reflujo durante 2 horas. En este punto, la TLC (CH₂Cl₂/acetato de etilo 1:1) mostró que no estaba presente el éster de partida. El disolvente se retiró, dejando un sólido blanco. El sólido se tomó en agua y la capa acuosa se lavó tres veces con 50 ml de éter. La capa acuosa se acidificó después con ácido clorhídrico diluido provocando la formación de un precipitado blanco. Este sólido blanco se recogió en un embudo de filtro de vidrio y se lavó bien con agua desionizada. El sólido se secó al vacío a 60 °C durante toda la noche y se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

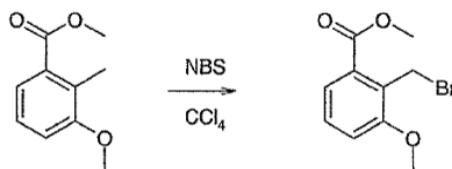
1.6 Preparación de N'-terc-butil-hidrazida del ácido 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico y N-terc-butil-N'-(5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida



Se combinaron 1,6 g de ácido 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico (8,1 mmol), 30 ml de tolueno y 1 gota de DMF en un matraz de 100 ml equipado con una barra de agitación magnética, una torre de lavado y un condensador. Se añadieron 0,59 ml de cloruro de tionilo (0,96 g, 9,7 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo a reflujo durante 4 horas. Después de este periodo, la mezcla se enfrió ligeramente y el condensador se reemplazó por una cabeza de destilación. El exceso de cloruro de tionilo se destiló. La mezcla se enfrió a 20 °C y el tolueno se retiró usando un evaporador rotatorio. NOTA: es recomendable tener cuidado durante la retirada del tolueno. El cloruro de 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonilo empieza a destilarse al vacío si la temperatura

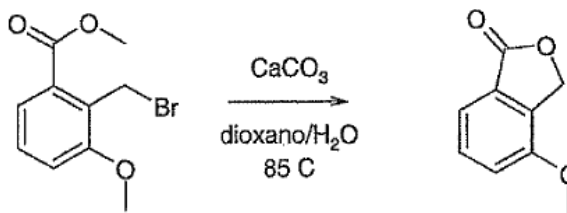
excede 27 °C. Se disolvió NaOH al 50 % (0,648 g, 8,1 mmol) en 3 ml de agua y se añadió a un matraz de reacción que contiene una barra de agitación magnética y un tabique de goma para la adición de reactivo. Se añadieron 1,00 g (8,1 mmol) de clorhidrato de terc-butil-hidrazina. La mezcla se agitó durante 5 min a temperatura ambiente y después se enfrió a -5 °C. Se disolvió cloruro de 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonilo (8,1 mmol) en 25 ml de diclorometano y se añadió simultáneamente con una segunda porción de 0,648 g (8,1 mmol) de NaOH al 50 % en 3 ml de agua. La temperatura de reacción se mantuvo por debajo de -2 °C durante la adición. La mezcla se agitó de -5 °C a -2 °C durante 30 min. Después de este tiempo, la mezcla se dejó calentarse a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. Se añadieron 50 ml de diclorometano y 50 ml de agua a la mezcla de reacción. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó tres veces con 50 ml de agua. La capa orgánica se secó después sobre MgSO₄ y se filtró. La retirada del disolvente produjo 2,4 g de un jarabe amarillo, que parecía ser aproximadamente el 85 % del producto deseado por análisis de RMN. El producto puro, *N*'-terc-butil-hidrazida del ácido 5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico, se aisló como un sólido amarillo pálido con cuidado por cromatografía en columna en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano a diclorometano/acetato de etilo 4:1. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 0,85 (s, 9H), 4,58 (s, 2H), 4,90 (s, 2H), 6,40 (d, 1H), 7,50 (t, 1H) y 7,70 (br s, 1H). RMN ¹⁹F (CDCl₃), δ ppm: (s, -190, s). R_f = 0,35 (CH₂Cl₂: acetato de etilo 1:1).

1.7 Preparación de éster metílico de ácido 2-bromometil-3-metoxi-benzoico



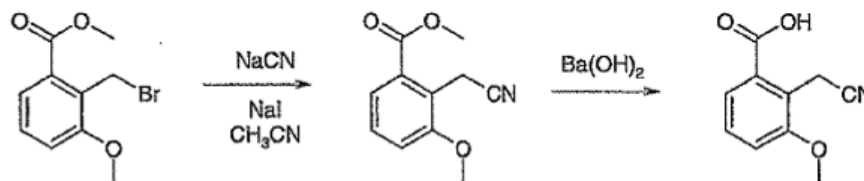
Se añadieron en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 l 75 g (0,42 mol) de benzoato de 2-metil-3-metoximetilo, 500 ml de CCl₄, 80,1 g (0,45 mol) de NBS y 1 g de AIBN. La mezcla se agitó y se dejó a reflujo suavemente durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se añadieron aproximadamente 600 ml de CH₂Cl₂ y 500 ml de agua. La mezcla se agitó para disolver los sólidos flotantes, se transfirió a un embudo separador de 2 l y después se agitó. La capa orgánica se separó y el agua se extrajo con CH₂Cl₂. Las fracciones acuosas se descartaron y la fase orgánica se extrajo con 400-500 ml de agua para retirar el NBS (nota: la solubilidad de la succinimida es 1 g/3 g de agua, la solubilidad del NBS es 1,47 g / 100 ml de agua). Las extracciones de agua se repitieron, la fase orgánica se secó con MgSO₄ y carbón y el disolvente se evaporó en 2 porciones, para producir metil-3-metoxi-2-bromometilbenzoato. TLC: R_f = 0,58, mancha única (acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 7,5 (d, 1H), 7,3 (t, 1H), 7,05 (d, 1H), 5,06 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,93 (s, 3H).

1.8 Preparación de 4-metoxi-3H-isobenzofuran-1-ona



En un matraz de fondo redondo de 500 ml se añadieron 15,15 g (0,0585 mol) de 3-metoxi metil benzoato de 2-bromometilo, 296,3 g (0,293 mol) de CaCO₃ 150 ml de dioxano y 150 ml de agua. El matraz se colocó en un baño de aceite y la mezcla se calentó con agitación a 85 °C durante 3,5 a 4 horas. El CaCO₃ se filtró y se lavó con acetato de etilo y agua. Al filtrado se añadió acetato de etilo (200 ml) y agua (50 ml) y la mezcla se agitó después en un embudo separador. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (50 ml). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se extrajeron una vez con agua, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron. Esto produjo 9,2 g de cristales blancos de 7-metoxibenzolactona (rendimiento del 95 %). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 7,5 (m, 2H), 7,1 (m, 1H), 5,26 (s, 2H), 3,93 (s, 3H). TLC: R_f = 0,46 (EtOAc: hexano 1:1).

1.9 Preparación de ácido 2-cianometil-3-metoxibenzoico

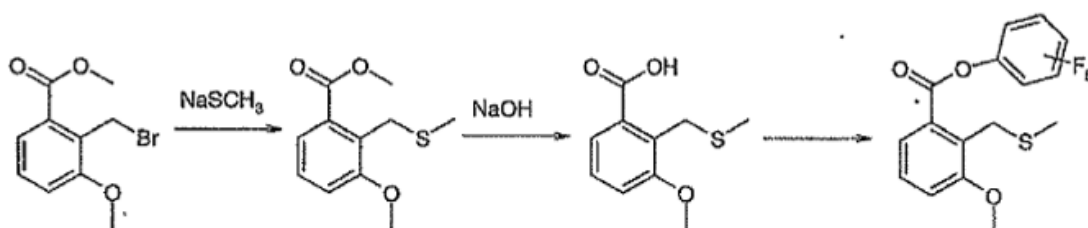


En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 500 ml se añadieron 10 g (61,75 mmol) de 3-metoxi metil benzoato de 2-bromometilo, 4,0 g (81,6 mmol) de NaNC, 0,30 g (2 mmol) de NaI, 100 ml de CH₃CN y 50 ml de DMF. La mezcla de reacción se calentó y se dejó a reflujo durante 10 horas. El precipitado (NaBr) se filtró y la solución se concentró en un evaporador. Se añadieron 300 ml de agua y 200 ml de éter y después se agitó en un embudo separador. El agua se extrajo dos veces con 100 ml de éter. Las fracciones de éter se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron para producir 3-metoxi-2-cianometilbenzoato de metilo (rendimiento del 95-100 %). Este éster (0,053 mmol, 10,51 g) se agitó vigorosamente en 100 ml de CH₃OH. Se añadió Ba(OH)₂ · H₂O (0,079 mmol, 14,97 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El CH₃OH se retiró en un evaporador rotatorio. Se añadieron 150 ml de agua, 200 ml de CH₂Cl₂ y 50 ml de HCl 6 N y después se agitó en un matraz para disolver todos los residuos. La mezcla se transfirió a un embudo separador, acidificado con HCl 6 N hasta pH 1-2. La fase de CH₂Cl₂ se separó y la fase acuosa se extrajo dos veces con 50 ml de CH₂Cl₂. Los extractos de CH₂Cl₂ se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ y carbón, se filtraron y se evaporaron para producir 8,8 g de un sólido blanco, ácido 2-cianometil-3-metoxibenzoico (87 %).

3-Metoxi-2-cianometilbenzoato de metilo: RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,6 (d, 1H), 7,4 (t, 1H), 7,1 (d, 1H), 4,18 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,926 (s, 3H). TLC (acetato de etilo: hexano 1:1) 0,55.

Ácido 2-cianometil-3-metoxibenzoico: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,55 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,3 (d, 1H), 4,121 (d, 2H), 3,91, (s, 3H). TLC (acetato de etilo: hexano 1:1), R_f racha 0,36.

1.10 Preparación de ácido 3-metoxi-2-metilsulfanilmetil-benzoico y 2-(metiltiometil)3-metoxibenzoato de pentafluorofenilo

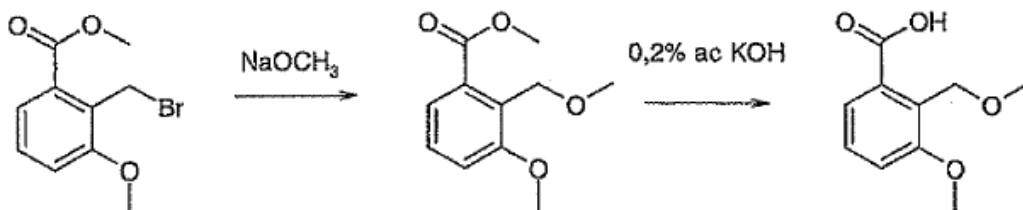


Se agitó 2-bromometil-3-metoxi benzoato de metilo en metanol a temperatura ambiente con 1,02 eq de metilmercáptido sódico. Después de 30 min la reacción se completó basándose en el análisis de GC. La mezcla se vertió en agua y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se quitaron al vacío dejando 2-(metiltiometil)-3-metoxibenzoato de metilo como un aceite amarillo pálido con un rendimiento de aproximadamente el 86 %. GC: DB-5, 30 m, película: 0,25 um, t_{nic} = 1,00 T = 120-280 °C@20 °C/min; Rt = 6:30 % de área = 98. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,46 (d, 1H), 7,26 (t, 1H), 7,03 (d, 1H), 4,18 (s, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,89 (s, 3H), 2,04 (s, 3H).

Se calentó a reflujo 2-(metiltiometil)-3-metoxibenzoato de metilo con 1,5 eq de NaOH en metanol acuoso al 10 % durante 1,5 h. La solución se añadió gota a gota a un exceso de ácido sulfúrico al 10 %. El precipitado se filtró y se secó al aire dando aproximadamente un 92 % de rendimiento de ácido 2-(metiltiometil)-3-metoxibenzoico. La TLC (acetato de etilo: hexano 2:1) indicó una mancha, R_f 0,50.

Se disolvió ácido 2-(metiltiometil)-3-metoxibenzoico en acetato de etilo y se añadió a una solución de 1,1 eq de pentafluorofenol y 1,1 eq de dicitlohexicarbodiimida en acetato de etilo. Después de 1 h la mezcla se filtró y los licores madre se retiraron al vacío. El residuo oleaginoso amarillo se cristalizó a partir de hexano para dar el producto, 2-(metiltiometil)-3-metoxibenzoato de pentafluorofenilo, con un rendimiento del 100 %. La TLC (acetato de etilo: hexano 1:2) indicó una mancha, R_f 0,58.

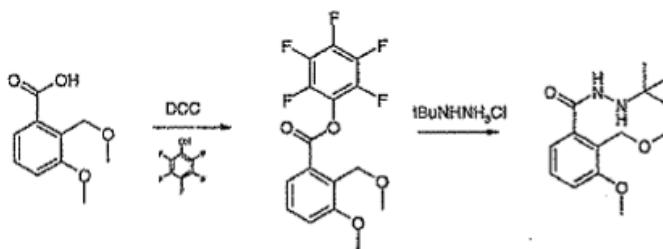
1.11 Preparación de ácido 3-metoxi-2-metoximetil-benzoico



A un matraz de 100 ml que contiene 10,1 g (0,039 mol) de 2-bromometil-3-metoxibenzoato de metilo en 50 ml de CH₃OH, se añadieron 19 g de una solución al 25 % en peso de NaOMe (4,74 g, 0,087 mol). La reacción se agitó a

temperatura ambiente durante 2 horas y después se evaporó en un evaporador rotatorio para retirar el CH_3OH . Se añadieron aproximadamente 200 ml de agua al residuo y la solución resultante se extrajo con CHCl_3 . El extracto de CHCl_3 se secó y se evaporó para producir 6,27 g de 3-metoxi-2-metoximetilbenzoato de metilo bruto (rendimiento del 77 %). RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7-7,4 (múltiple, 3H), 4,783 (s, 2H), 3,897 (s, 3H), 3,864 (s, 3H), 3,37 (s, 3H). Se agitaron 6,27 g de 3-metoxi-2-metoximetilbenzoato de metilo con una solución acuosa de KOH al 20 % (6,7 g, 0,12 mol en 34 g de solución) a 50 °C en un baño de aceite durante 4-5 horas y después a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 3 N hasta pH 2 y se extrajo con CH_2Cl_2 . El extracto de CH_2Cl_2 se secó y se evaporó para producir 5,35 g de ácido 3-metoxi-2-metoximetilbenzoico (rendimiento del 92 %). RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,65 (1H, d), 7,40 (t, 1H), 7,10 (d, 1H), 4,83 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,46 (s, 3H).

1.12 Preparación de N'-t-butil-3-metoxi-2-metoximetilfenilhidrazida

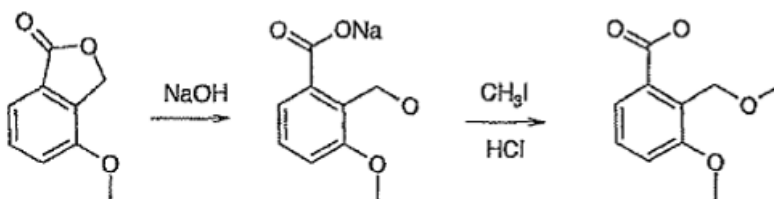


A 4,30 g (0,0219 mol) de ácido 3-metoxi-2-metoximetilbenzoico en 50 ml de acetato de etilo en un matraz de fondo redondo se añadieron 8,88 g de una solución de fenol de pentafluorofenilo al 50 % en peso, seguido de 21,91 ml de solución de DCC (0,0219 mol). Después de agitar durante 2 h a temperatura ambiente, la TLC mostró una mancha para el producto deseado éster de pentafluorofenilo a $R_f = 0,64$ (acetato de etilo: hexanos 1:1), mientras que el ácido de partida era $R_f = 0,39$.

Un pequeño volumen de acetato de etilo (30 ml) y una cucharilla de MgSO_4 anhidro se añadieron y después se filtraron para retirar la DCC y la DCU. El filtrado se evaporó para producir 9,4 g de producto. RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 3,39 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 4,81 (s, 2H). El análisis de RMN del material de partida indicó el siguiente espectro: RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 4,83 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,4 (s, 3H).

Las DCC y DCU restantes se retiraron por cromatografía en columna en gel de sílice. Los productos eluyeron en las fracciones de acetato de etilo/hexano del 6 y del 8 %. El producto de 7,08 g contenía algo de DCC y DCU. Se agitaron 7,08 g (0,02 mol) del éster de pentafluorofenilo en 60 ml de CH_2Cl_2 con 3,67 g (0,029 mol) de t-butilhidrazina HCl y 12 g de K_2CO_3 en 60 ml de agua a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadieron 60 ml de CH_2Cl_2 y 50 ml de agua y después se agitaron en un embudo separador. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y después se evaporó para producir 5,6 g de hidrazida de t-butilo. RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,4 (d, 2H), 7,0 (t, 1H), 4,627 (s, 2H), 3,874 (s, 3H), 3,465 (s, 3H), 1,184 (s, 9H). TLC: (acetato de etilo: hexanos 1:1), $R_f = 0,16$. El producto puede purificarse adicionalmente por trituración con hexanos.

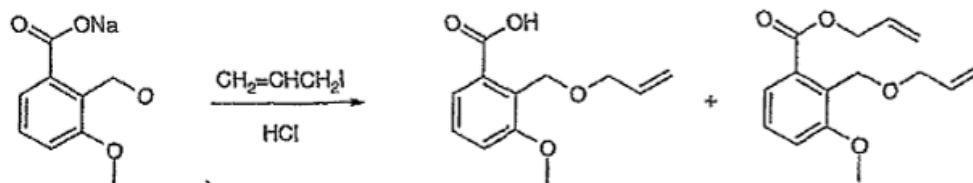
1.13 Preparación de ácido 3-metoxi-2-metoximetilbenzoico



Se dejó a reflujo 1,0 g (0,0061 mol) de lactona con 20 ml de NaOH al 7,5 % y 20 ml de CH_3OH durante 7 horas. El metanol se retiró en un evaporador rotatorio, se estableció un Dean Stark, se dejó a reflujo en tolueno hasta retirar azeotrópicamente el agua, el tolueno se retiró al vacío y el residuo se secó en un horno de vacío. RMN^1H (DMSO , 300 MHz) δ (ppm): 3,74 (s, 3H), 4,47 (s, 2H), 6,9 (d, 1H), 7,1 (t, 1H), 7,2 (d, 1H).

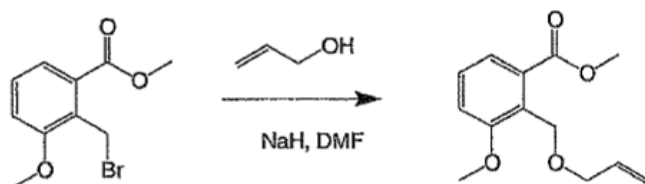
El carboxilato sódico se disolvió en 15 ml de DMF y después se añadió CH_3I (0,87 g, 0,0061 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadieron 50 ml de NH_4Cl saturado para interrumpir la reacción. Se añadieron 250 ml de agua (la solución es básica en este punto) y se extrajo con éter para retirar las sustancias neutras y básicas. La solución acuosa que quedaba se acidificó con HCl 3 N hasta pH = 2 y el ácido carboxílico deseado se extrajo con éter. Los extractos de éter se secaron y se evaporaron para producir 0,55 g de sal de 3-metoxi-2-hidroximetilbenzoato sódico y ácido 3-metoxi-2-metoximetilbenzoico. RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 3,456 (s, 3H), 3,884 (s, 3H), 4,832 (s, 2H), 7,1 (d, 1H), 7,4 (t, 1H), 7,6 (d, 1H).

1.14 Preparación de ácido 2-aliloximetil-3-metoxi-benzoico



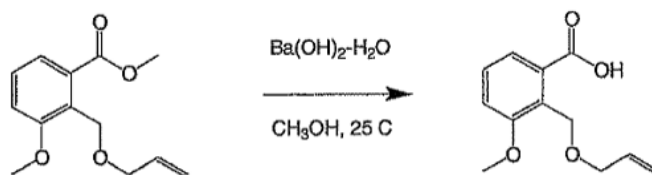
Se combinó 1,0 g (0,005 mol) de 3-metoxi-2-hidroximetilbenzoato sódico en un matraz de 200 ml con 1,68 g (0,01 mol) de yoduro de alilo y 50 ml de dioxano y se dejó a reflujo durante 2 h. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se concentró en un evaporador. Se añadieron agua y NaOH acuoso al 5 % hasta pH = 10-11 y la mezcla se extrajo con éter. El éter se evaporó para dar un producto dialilo (0,34 g). La RMN ^1H indicó señales alilo complejas además de los protones aromáticos. La solución acuosa se acidificó con HCl 3 N y se extrajo dos veces con 100 ml de éter para producir ácido 3-metoxi-2-aliloxibenzoico y 3-metoxi-2-aliloxibenzoato de alilo (0,34 g). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 3,879 (s, 3H), 4,11 (d, 2H), 5,3 (q, 2H), 5,9-6,0 (m, 1H). TLC: (acetato de etilo: hexano 1:1): dialilo, Rf 0,60, monoalilo, Rf 0,31, racha.

1.15 Preparación de benzoato de metil 13-metoxi-2-aliloximetilo



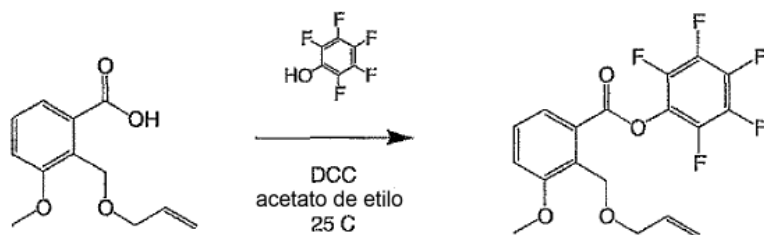
En un matraz de fondo redondo de 25 ml se añadieron 0,96 g (0,0165 mol) de alcohol alílico y 3 ml de DMF. Mientras se enfriaba el matraz en un baño de hielo, se añadieron 0,80 g de una dispersión al 60 % de NaH (0,020 mol, 0,48 g), con agitación magnética. La mezcla de reacción se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. El matraz se colocó en el baño de hielo y se añadieron 3,89 g (0,015 mol) de 2-bromometil-3-metoxi benzoato de metilo en pequeñas porciones. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 – 5 horas. La reacción se transfirió a un embudo separador con 150 ml de éter etílico y 50 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó, la fase éter se separó y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 50 ml de éter. La fase éter se extrajo con agua (20 ml), se secó con MgSO_4 y se concentró para producir 2,7 g de un aceite amarillo pálido (rendimiento del 76 %). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,3 - 7,0 (m, 3H), 5,9 - 6,0 (m, 1H), 5,1 - 5,3 (2d, 2H), 4,8 (d, 2H), 4,02 (d, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,88 (s, 3H). TLC (acetato de etilo: hexano 1:1), Rf 0,58.

1.16 Preparación de ácido 2-aliloximetil-3-metoxibenzoico



En un matraz de fondo redondo de 200 ml que contenía 5,40 g (0,0229 mol) de benzoato de 3-metoxi-2-aliloximetilo, se añadieron 40 ml de alcohol metílico. Con agitación magnética, se añadieron 6,50 g (0,034 mol) de monohidrato de hidróxido de bario. La reacción se agitó durante 4 horas en un baño de agua a 45 °C. El matraz de reacción se transfirió a un evaporador rotatorio y el metanol se retiró al vacío. Se añadió H_2O (150 ml) al residuo en el matraz y la mezcla se agitó hasta que la mayoría del residuo se disolvió. La mezcla de reacción se transfirió con agua (50 – 100 ml) a un vaso de precipitados grande. La mezcla se acidificó con 6 HCl (hasta pH = 1) y se transfirió a un embudo separador. La mezcla de reacción se extrajo tres veces con 100 ml de acetato de etilo con precipitación de sales. El extracto de acetato de etilo se secó y se evaporó para producir 4,38 (g) de producto viscoso, ácido 2-aliloximetil-3-metoxibenzoico (rendimiento del 98 %). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,55 (d, 1H), 7,40 (t, 1H), 7,1 (d, 1H), 6,0 - 5,9 (m, 1H), 5,4 - 5,2 (2d, 2H), 4,87 (d, 2H), 4,10 (d, 2H), 3,878 (s, 3H). TLC (acetato de etilo : hexano 1:1) Rf 0,38.

1.17 Preparación de 2-aliloximetil-3-metoxibenzoato de pentafluorofenilo



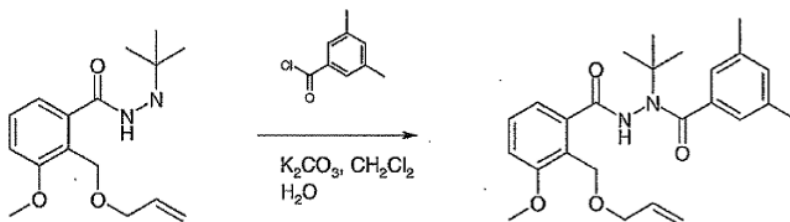
En un matraz de fondo redondo de 200 ml se añadieron 6,6 g (0,0297 mol) de ácido 2-aliloximetil-3-metoxi benzoico en 40 ml de acetato de etilo. Se añadieron 24,05 g de una solución de pentafluorofenol (6,01 g, 0,0327 mol) al 25 % mientras se agitaba. El matraz de reacción se colocó en un baño de agua y mientras se agitaba se añadieron pequeñas porciones de DCC (6,2 g, 0,030 mol). La agitación continuó durante toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se filtró a través de dos filtros Whatman n.º 541 para retirar el DCU precipitado. La solución de acetato de etilo se concentró para producir 12,8 g (110 % de rendimiento), indicando la presencia de DCC y DCU. Esto se confirmó por TLC (acetato de etilo: hexano 1:1), que indicó un R_f de 0,72 más otros compuestos menos polares (la tinción de I_2 indica aproximadamente un 85 % de pureza). RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 7,7 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,15 (d, 1H), 6,0 - 5,9 (m, 1H), 5,3 - 5,1 (2d, 2H), 4,88 - 4,83 (d, 2H), 4,06 (d, 2H), 3,90 (s, 3H).

1.18 Preparación de N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-aliloximetil-3-metoxi-benzoico



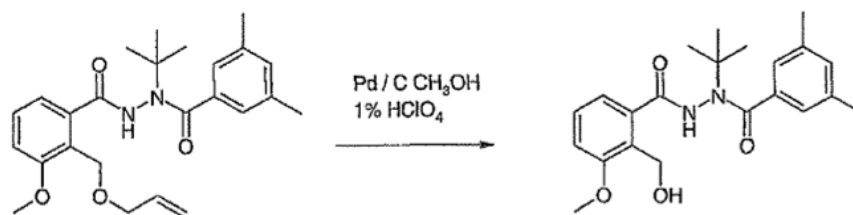
En un matraz de fondo redondo que contiene 18,9 g (0,048 mol) de éster de pentafluorofenilo en 50 ml de CH_2Cl_2 se añadieron 9,1 g (0,73 mol) de clorhidrato de t-butilhidrazina y después 20,16 g (0,146 mol) de K_2CO_3 en 50 ml de H_2O . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadieron 50 ml de H_2O , se separó la capa de CH_2Cl_2 y la fase H_2O se extrajo dos veces con 100 ml de CH_2Cl_2 . La fracción de CH_2Cl_2 se secó con $MgSO_4$ y se concentró para producir 9,75 g de N-2-aliloximetil-3-metoxifenil-N'-t-butilhidrazida. RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 1,151 (s, 9H), 3,87 (s, 3H), 4,12 (d, 2H), 4,68 (s, 2H), 5,15-5,35 (q, 2H), 5,19 (m, 1H), 7,0 (t, 1H), 7,4 (d, 2H). TLC: (1:1, acetato de etilo: hexano) R_f = 0,25.

1.19 Preparación de N'-(2-aliloximetil-3-metoxi-benzolil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115003)



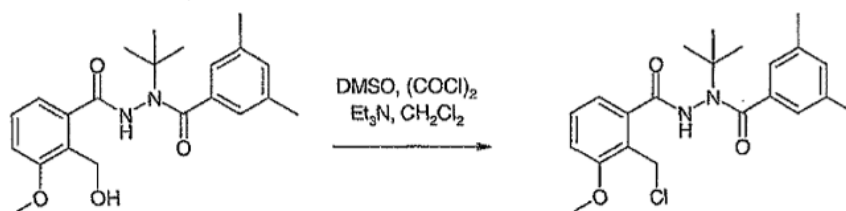
A un matraz que contiene 2,0 g (0,0068 mol) de N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-aliloximetil-3-metoxi-benzoico disueltos en 15 ml de CH_2Cl_2 y 2,48 g de K_2CO_3 (0,02 mol) en 30 ml de H_2O . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se diluyó y se hicieron particiones y la fase orgánica se secó y el disolvente se retiró al vacío. El producto se purificó por cromatografía en gel de sílice; se eluyó en fracciones de acetato de etilo:hexano al 25 % para producir 2,40 g de ácido N'-(2-aliloximetil-3-metoxi-benzoyl)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetilbenzoico. RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 7,2 (t, 1H), 7,1 (s, 1H), 7,05 (d, 2H), 6,95 (m, 2H), 5,9 (m, 1H), 5,2-5,3 (q, 2H), 4,5 (d, 2H), 3,9 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 2,245 (s, 6H), 1,547 (s, 9H).

1.20 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-hidroximetil-3-metoxibenzoyl)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115371)



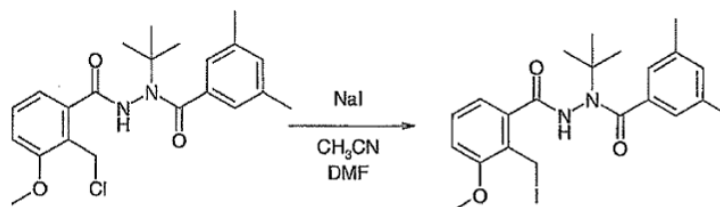
Se disolvieron 1,57 g de éter alílico en 50 ml de CH₃OH. Se añadieron 600 g de Pd/C y 20 gotas de HClO₄/H₂O al 1 % y se dejó a reflujo durante 4 horas. Se añadieron CH₂Cl₂ y una cucharilla de MgSO₄ anhidro y después se filtraron. El filtrado se evaporó hasta sequedad para producir 1,62 g de alcohol bencílico bruto. El producto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice y eluyó con acetato de etilo/hexanos al 50-60 % para producir 1,25 g de N-terc-butil-N'-(2-hidroximetil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,1 (t, 1H), 7,05 (s, 2H), 6,98 (s, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,5 (d, 1H), 4,2 (q, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,23 (s, 6H), 1,57 (s, 9H). TLC (acetato de etilo: hexano 1:1) R_f = 0,20.

1.21 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-clorometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115490)



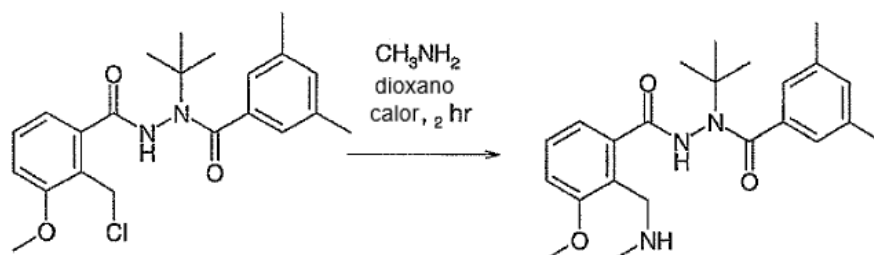
A un matraz de fondo redondo de 50 ml, se añadieron 400 mg (0,00315 mol) de cloruro de oxalilo y 5 ml de CH₂Cl₂. La mezcla se agitó y después se enfrió en un baño de acetona/hielo seco hasta -70 °C. Se añadieron 405 mg (0,00105 mol) de RG-115371 en 4 ml de CH₂Cl₂ y se agitó durante 30 min a -70 °C. El baño de hielo seco se retiró y la mezcla se dejó calentarse hasta temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se enfrió de nuevo a -70 °C y después se añadieron 1,60 g de trietilamina y la mezcla se dejó calentarse a temperatura ambiente. Se añadieron 6 ml de agua para interrumpir la reacción. Se añadió CH₂Cl₂ al matraz y se transfirió a un embudo separador con un total de 100 ml de CH₂Cl₂. Se añadieron 50 ml de agua y la capa acuosa se extrajo de nuevo con CH₂Cl₂. El extracto de CH₂Cl₂ se extrajo con HCl/H₂O diluido (0,05 - 0,1 N) para retirar el Et₃N y el DMSO. El extracto de CH₂Cl₂ se secó y se concentró para producir aproximadamente 0,44 g de producto. TLC: R_f = 0,47. El producto puede purificarse por cromatografía en columna en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 35-40 % en hexanos. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 8,0 (s, 1H), 6,9-7,2 (t, s, d, 5H), 6,35 (d, 1H), 4,5 (d, 1H), 4,1 (d, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,28 (s, 6H), 1,59 (s, 9H).

1.22 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-yodometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico



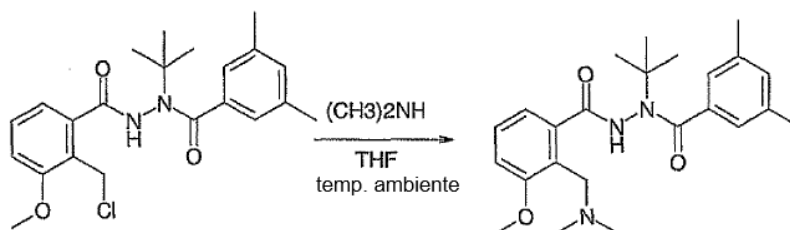
A un matraz de 50 ml que contiene 400 mg del RG-115490, se añadieron 10 ml de CH₃CN, 1 ml de DMF y 100 mg de NaI. La mezcla se dejó a reflujo durante 4 horas. La reacción se vertió en 250 ml de éter y 75 ml de agua en un embudo separador. La mezcla se agitó vigorosamente y la capa de éter se extrajo con aproximadamente 50 ml de agua. Los extractos de éter se secaron sobre MgSO₄ y carbono, se filtraron y el disolvente se retiró para producir 250 mg de un sólido amarillo. TLC R_f = 0,50 (acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 6,9-7,3 (m, 6H), 6,3 (d, 1H), 4,3 (d, 1H), 4,2 (d, 1H), 3,88 (s, 3H), 2,28 (s, 6H), 1,62 (s, 9H).

1.23 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-metilaminometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115079)



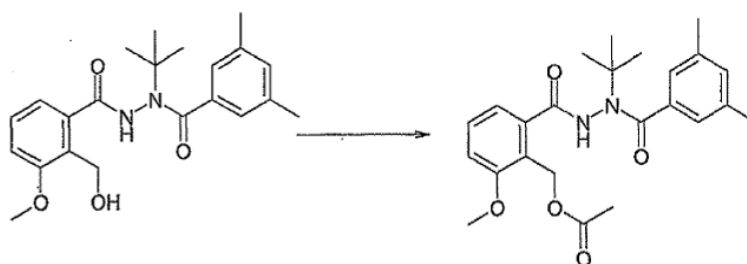
En un matraz pequeño, que contiene 300 mg del RG-115490 disueltos en 15 ml de dioxano (99,8 % anhidro, Aldrich), se añadió CH_3NH_2 en dioxano (4 eq). La reacción se dejó a reflujo durante 2 horas. El disolvente se retiró en un rotavapor, se redisolvió en CH_2Cl_2 , se filtró y los solubles del CH_2Cl_2 se concentraron. La metilamina se obtuvo después de la cromatografía en columna por elución con acetato de etilo, después acetato de etilo: metanol 9:1 con aproximadamente un 0,2 % de trietilamina, después de haber ejecutado la columna con acetato de etilo: hexano 4:1, trietilamina al 0,2 %. El rendimiento total del producto fue 183 mg. TLC: Rf 0,23 (acetato de etilo: hexano 1:1 + trietilamina). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 7,3-6,9 (m, 6H), 3,80 (s, 3H), 3,6 (d, 1H), 2,8 (d, 1H), 2,4 (s, 3H), 2,28 (s, 6H), 1,59 (s, 9H).

1.24 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoyl)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115079)



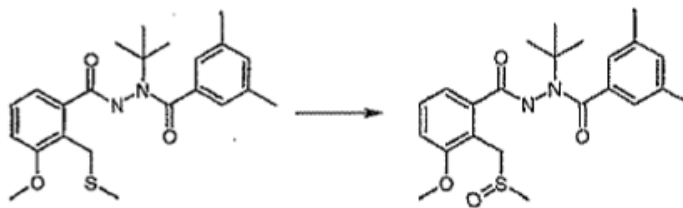
Se añadieron 250 g (0,0006 mol) del RG-115490 a un vial de 20 ml. Se añadieron después 3 ml de THF y 0,31 ml de una solución de dimetilamina/THF 2 M (Aldrich). La mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró en un rotavapor y el sólido se trituró con hexano mientras se agitaba a temperatura ambiente. N-terc-butil-N1-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoyl)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 7,1-6,9 (m, 6H), 3,93 (s, 3H), 2,68 (s, 3H), 2,54 (s, 3H), 2,24 (s, 6H), 1,61 (s, 9H).

1.25 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-acetoximetil-3-metoxi-benzoyl)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115225)



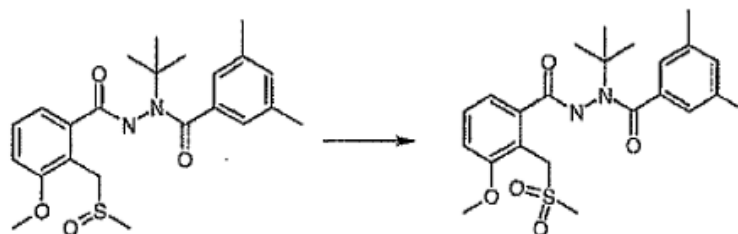
En un vial de 20 ml que contiene 200 mg de RG-115371 en 4 ml de CH_2Cl_2 anhidro se añadieron 200 mg de Et_3N y 10 mg de CH_3COCl . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadieron 100 mg de cloruro de acetilo y algo de piridina y se dejó a reflujo durante 1 hora. La mezcla de reacción se vertió en CH_2Cl_2 y se extrajo con K_2CO_3 diluido, después HCl acuoso diluido. El extracto de CH_2Cl_2 se secó y se concentró, para producir un acetato bruto. El material se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo: hexano 1:1. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 7,3-6,9 (m, 6H), 6,4 (d, 1H), 4,8 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 3,795 (s, 3H), 2,3 (s, 6H), 2,03 (s, 3H), 1,58 (s, 9H).

1.26 Preparación de N-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoyl)-hidrazida del ácido 2-metansulfonilmetil-3-benzoico (RG-115172)



N'-Terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metilsulfanilmetil-benzoico en CH_2Cl_2 se agitó a temperatura ambiente con 1,0 eq de ácido m-cloroperbenzoico. La reacción se completó en 5 min como se indicó por TLC. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO_3 saturado y la capa orgánica se retiró al vacío. El residuo se mezcló con 1-2 ml de éter: hexano 1:1 y la solución se retiró con una pipeta, dejando el producto que a su vez se secó al vacío.

1.27 Preparación de N-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metansulfonilmetil-3-benzoico (RG-115408)



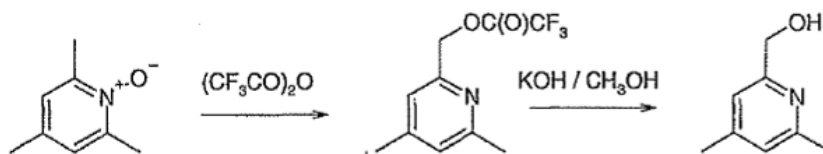
Se disolvió RG-115172 en dicloruro de etileno. Se añadieron 1,2 equivalentes de ácido m-cloroperbenzoico y la mezcla se calentó a reflujo. La reacción se completó en el momento en que la mezcla alcanzó el reflujo. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución se lavó con NaHCO_3 saturado. La capa orgánica se retiró al vacío. El residuo se mezcló con 1-2 ml de éter y la solución se retiró con una pipeta, dejando el producto que se secó al vacío.

1.28 Preparación de 1-óxido de 2,4,6-trimetil-piridina



En un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con un agitador magnético y un termómetro se añadieron 36,7 g (164 mmol) de ácido 3-cloroperbenzoico al 77 % (Aldrich) y 200 ml de cloruro de metileno. Esta suspensión se enfrió a 5 °C y se añadió una solución de 16,6 g (137 mmol) de colidina (Aldrich) en 50 ml de cloruro de etileno durante 30 min manteniendo la temperatura a 5-10 °C. La mezcla se dejó calentarse hasta temperatura ambiente durante 1 hora y después se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción bruta se transfirió lentamente a un vaso de precipitados que contenía 200 g de alúmina básica, que dio como resultado un calentamiento ligero de la mezcla. La mezcla se agitó y se filtró y la alúmina se mezcló con 300 ml de CHCl_3 : CH_3OH 2:1. El disolvente se retiró en un evaporador rotatorio a temperatura ambiente. La alúmina se lavó con éter y el disolvente se retiró para producir 24,7 g de un líquido transparente, que se solidificó para dar un sólido blanco ceroso. Este producto era ligeramente alto debido a la presencia de algo de sal. La TLC (gel de sílice desarrollado con metanol) mostró una mancha principal única ($R_f = 0,45$) junto con una mancha menor ($R_f = 0,55$). La mancha principal era el N-óxido deseado. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 6,96 (s), 2,519 (s) y 2,28 (s). La mancha menor correspondía a la colidina de partida. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 6,78 (s), 2,48 (s) y 2,26 (s).

1.29 Preparación de (4,6-dimetil-piridin-2-il)-metanol



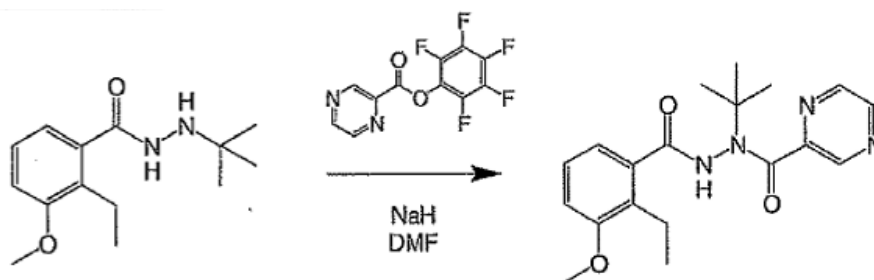
En una atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 18,1 g (137 mmol) del N-óxido de colidina en 200 ml de cloruro de metileno sobre tamices moleculares. La mezcla se enfrió a 5 °C. Se añadió anhídrido trifluoroacético (71,9 g, 49,8 ml, 343 mmol) gota a gota en porciones para mantener la mezcla de reacción a 5-10 °C. Después de la adición del anhídrido trifluoroacético, la mezcla se dejó calentarse a temperatura ambiente y después se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La posterior TLC (fase reversa, metanol/agua, 7:3) mostró la ausencia del N-óxido de partida. El disolvente se retiró para producir el producto de acetato como un sólido amarillo ceroso. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 2,5 (s, 3H), 2,8 (s, 3H), 5,65 (s, 2H), y 7,45 (m, 2H). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 100 ml de una solución de KOH al 10 % en metanol. Se comprobó el pH de la solución y si la solución no era básica, se añadió KOH adicional para hacer la solución básica. La solución se agitó después a 10-15 °C durante 30 min y después se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente se retiró para producir 7,4 g de un jarabe amarillo-marrón. Si se desea, el alcohol puede purificarse por cromatografía con cuidado, usando gel de sílice y eluyendo con acetato de etilo/cloroformo (4:1). El alcohol se aisló como un aceite amarillo pálido. TLC: R_f es 0,55 en gel de sílice, desarrollado con metanol/acetato de etilo, 1:1. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 6,67 (s, 2H), 4,67 (s, 2H), 2,50 (s, 3H) and 2,31 (s, 3H). En la mayoría de los casos, el alcohol bruto era lo suficientemente puro para usarse para la posterior reacción de oxidación.

1.30 Preparación de ácido 4,6-dimetil-2-piridincarboxílico



Se añadió 4,6-dimetil-2-piridinmetanol (7,5 g, 29,2 mmol) a 100 ml de agua y se agitó a 0-5 °C. Se añadió una solución de 5,3 g (32,1 mmol) de permanganato potásico en 100 ml de agua porción a porción durante 30 min manteniendo la temperatura a 5-10 °C. Esto dio como resultado la formación de un sólido negro. La mezcla se agitó a 5-10 °C durante unos 30 minutos adicionales y después se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se filtró y el dióxido de manganeso se lavó con metanol. Los lavados de metanol se combinaron con los extractos de agua y se retiró el disolvente. El sólido resultante se redisolvió en agua y se lavó con cloroformo. La capa de agua se separó y el agua se retiró para producir 5,4 g de ácido 4,6-dimetil-2-piridincarboxílico. El producto se caracterizó por HPLC/MS.

1.31 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico (RG-115550)

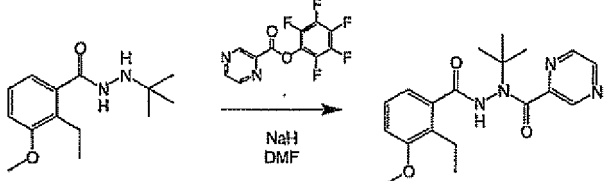


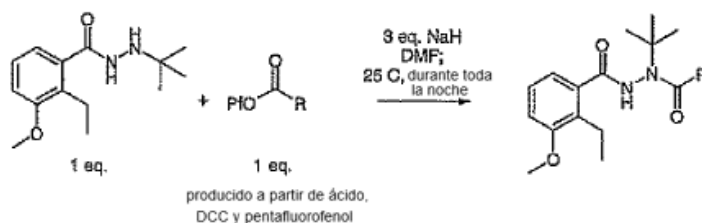
En un vial de 20 ml, que contiene una mezcla agitada de 0,120 g (0,003 mol) de NaH en 6 ml de DMF, se añadieron lentamente 0,238 g (0,001 mol) de N-terc-butil-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico. La reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron lentamente 0,278 g (0,001 mol) de éster pentafluorofenílico de ácido 2-pirazin-carboxílico de éster pentafluorofenílico en 2 ml de DMF. La reacción se agitó durante 24 horas. La reacción se lavó con acetato de etilo en un embudo separador que contiene 100 ml de agua y 100 ml de éter etílico. La mezcla de reacción se agitó y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró hasta sequedad para producir N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico: RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): (nota – una relación de reacción 1:3 de hidrazida a NaH dio el mayor rendimiento de producto (100 %), menores relaciones, tales como 1:2, solamente rindieron un 70 %; el DMF fue un mejor disolvente que el DMSO). El progreso de la reacción se monitorizó siguiendo la intensidad de las señales de –OCH₃ en la RMN ¹H. RMN ¹H (300

MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,05 (s, 1H), 8,6 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,4 (s, 1H), 7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,45 (d, 1H), 3,8 (s, 3H), 2,4 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 1,62 (s, 9H), 0,95 (t, 3H). Éster pentafluorofenílico de ácido pirazin-2-carboxílico: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,49 (s, 1H), 8,95 (d, 1H), 8,87 (d, 1H).

5

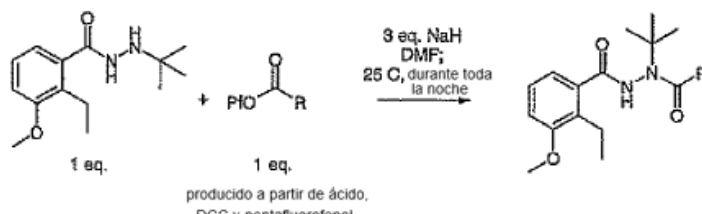
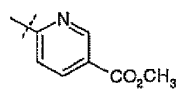
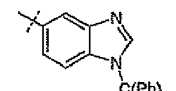
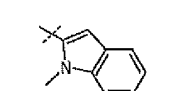
Tabla 1: Optimización de la preparación de RG-115550

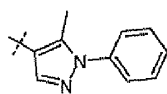
				
base/disolvente	Temperatura	Tiempo	rendimiento	comentario
NaH (1 eq) DMF	20	16	40	
NaH (2 eq) DMF	20	16	65-70	
NaH (3 eq) DMF	20	16	100	Éster pentafluorofenílico libre de urea derivada de DCC
NaH (2 eq) DMSO	20	16	45	



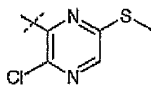
10

Tabla 2: Preparación de diacilhidrazinas heterocíclicas mediante el método de éster de pentafluorofenilo

		
R	Rendimiento de RMN	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃)
	Aproximadamente el 30 %	Diacilhidrazina: 9,1 (s, 1H), 8,4 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,3 (d, 1H), 4,0 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 2,4 (m, 1H), 2,1 (m, 1H), 1,7 (s, 9H), 0,95 (t, 3H) Éster de R-pentafluorofenilo: 9,45 (s, 1H), 8,6 (d, 1H), 8,4 (d, 1H), 4,04 (s, 3H)
	Aproximadamente el 20 %	Diacilhidrazina: Isómero 1: 9,4 (br, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,7 (s, 1H), 7,3 (m, 10H), 7,1 (m, 5H), 6,85 (t, 1H), 6,75 (d, 1H), 6,5 (d, 1H), 6,05 (d, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,1 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 1,57 (s, 9H), 0,8 (t, 3H). Isómero 2: 8,6 (br, 1H), 7,9 (s, 1H), 7,8 (s, 1H), 7,3 (m, 10H), 7,1 (m, 5H), 6,9 (t, 1H), 6,75 (d, 1H), 6,5 (d, 1H), 6,05 (d, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,1 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 1,57 (s, 9H), 0,85 (t, 3H) Éster de R-pentafluorofenilo: 8,15 (s, 1H), 8,05 (d, 1H), 7,9 (d, 1H), 7,1-7,5 (m, 15H)
	100 %	Diacilhidrazina: 7,75 (s, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 7,3 (m, 1H), 7,15 (t, 1H), 7,0 (t, 1H), 6,8 (d, 1H), 6,6 (s, 1H), 6,4 (d, 1H), 3,9 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 2,2 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 1,62 (s, 9H), 0,85 (t, 3H) Éster de R-pentafluorofenilo: 7,75 (d, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,5 (br s, 2H), 7,2 (m, 1H), 4,09 (s, 3H)



100 %



100 %

Diacilhidrazina: 7,85 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,5 (m, 3H), 7,4 (m, 2H), 7,15 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,6 (m, 1H), 2,5 (s, 3H), 2,2 (m, 1H), 1,6 (s, 9H), 1,1 (t, 3H)

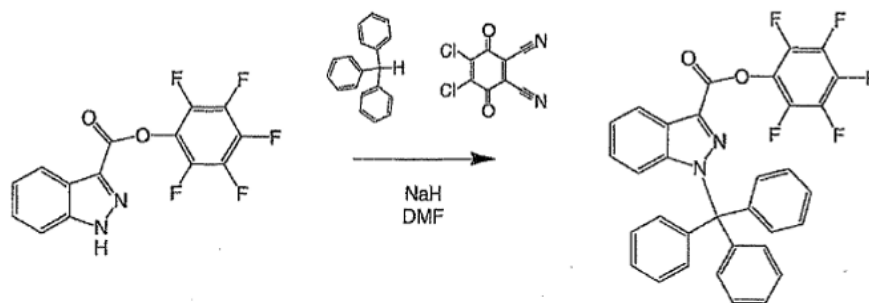
Éster de R-pentafluorofenilo: 8,25 (s, 1H), 7,6 (m, 3H), 7,5 (m, 2H), 2,62 (s, 3H)

Diacilhidrazina: 8,5 (s, 1H), 7,95 (s, 1H [NH]), 7,1 (t, 1H), 6,87 (d, 1H), 6,3 (d, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,55 (s, 3H), 2,5 (m, 1H), 2,3 (m, 1H), 1,64 (s, 9H), 1,05 (t, 3H),

Éster de R-pentafluorofenilo: 8,8 (s, 1H), 2,62 (s, 3H)

Procedimiento para la formación del éster de pentafluorofenilo: Se disuelven ácido heterocíclico carboxílico y pentafluorofenol en dioxano anhidro, acetato de etilo, dimetoxietano o THF en una atmósfera de N₂. Se añade un equivalente de dicitclohexilcarbodiimida (DCC). La reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añade después una traza de agua para interrumpir cualquier DCC restante. La urea derivada de DCC (DCU) se retira por filtración en Celite, el filtrado se lava con NaHCO₃ diluido para retirar el pentafluorofenol que queda y el filtrado se evapora hasta sequedad. El producto se purifica por trituración o cromatografía en gel de sílice. Se piensa que el nivel de DCC o urea traza en el éster de pentafluorofenilo puede ser críticamente perjudicial para el éxito de la reacción de acoplamiento de NaH amida.

1.32 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazol-3-carboxílico (RG-115723)

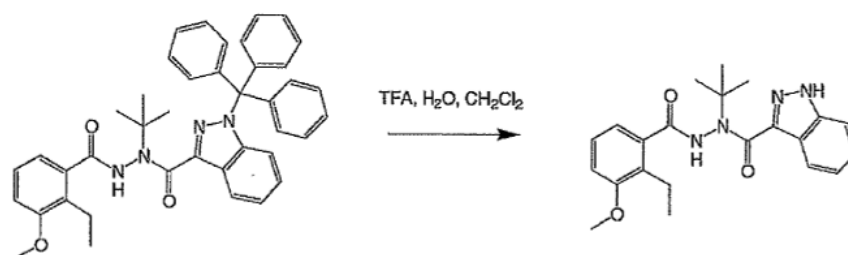


5

En un matraz de fondo redondo de 10 ml, se añadieron 0,328 g (0,001 mol) de éster pentafluorofenílico de ácido indazol-3-carboxílico, 0,244 g (0,001 mol) de trifenilmetano, 0,227 g (0,001 mol) de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona y 4 ml de tolueno seco. La mezcla de reacción se dejó a reflujo durante 7-8 horas. La mezcla de reacción se lavó con acetato de etilo (60 ml) en un embudo separador y se extrajo con agua (20 ml). La fase orgánica se secó y se concentró para producir 0,45 g de éster pentafluorofenílico de ácido 1-tritil-1H-indazol-3-carboxílico. La RMN indicó la presencia del producto, pero la TLC también mostró la presencia del éster de pentafluorofenilo de partida (R_f 57) y el producto (R_f 70). El producto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice, se eluyó con acetato de etilo/hexano al 5 % para producir 0,30 g de producto puro. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 8,2 (d, 1H), 7,4-7,0 (m, 17H), 6,52 (d, 1H).

10

15

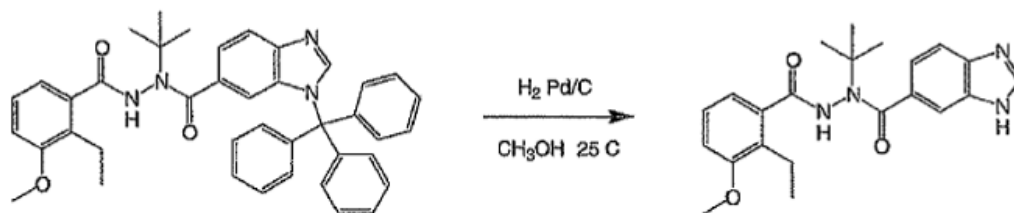


Se añadieron 0,17 g (0,16 mmol) de éster pentafluorofenílico de ácido 1-tritil-1H-indazol-3-carboxílico en 3 ml de CH₂Cl₂ a un matraz de 100 ml con 20 ml de CH₂Cl₂, que contiene TFA al 2 % y H₂O al 1 %. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 min. La TLC indicó una reacción al 50 %. Se añadieron 15 ml adicionales de TFA - H₂O - CH₂Cl₂ y la agitación continuó durante 1 h. La reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con K₂CO₃/H₂O aproximadamente 0,5 M. La fase CH₂Cl₂ se secó y se concentró para dar N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazol-3-carboxílico (0,15 g). TLC: producto, R_f 0,33; material de partida, R_f = 0,68. El producto se purificó por cromatografía en columna, eluyendo con acetato de etilo/hexano al 45 %. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 8,6 (s, 1H), 8,2 (s, 1H), 7,4-7,2 (m, 3H), 7,1 (t, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,7 (d, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,4 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 1,652 (s, 9H), 0,85 (t, 3H).

20

25

1.33 Preparación de N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3H-benzoimidazol-5-carboxílico (RG-115718)

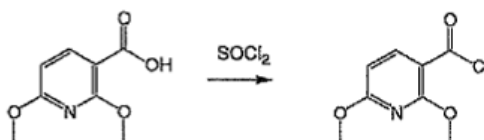


Se disolvieron aproximadamente 120 mg de N-terc-buti-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-tritil-3H-benzoimidazol-5-carboxílico en 35 ml de CH₃OH y se añadieron a una botella de hidrogenación, junto con 2 gotas de ácido glacial y 0,20 g de Pd/C. La hidrogenación se realizó agitando la botella durante 6 horas y después manteniéndola en presión de H₂ durante 16 horas. El Pd/C se retiró por filtración y el metanol se retiró por un evaporador. El residuo se agitó con CH₂Cl₂ y el CH₂Cl₂ se decantó. La evaporación del CH₂Cl₂ produjo un producto sólido identificado por RMN como trifenilmetano. El residuo se agitó con KOH diluido/H₂O y se extrajo con acetato de etilo. El acetato de etilo se secó y se concentró en un evaporador rotatorio para producir el producto N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3H-benzoimidazol-5-carboxílico. El análisis de RMN del producto indicó que las absorbancias de los grupos metoxi y t-butilo se dieron en 3,69 y 1,61 frente a 3,77 y 1,59 para el material de partida.

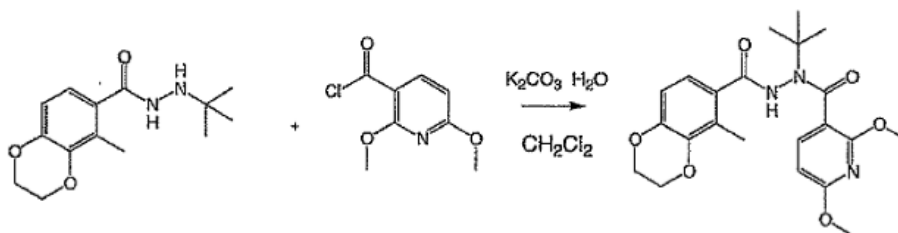
1.34 Preparación de N'-2-etil-3-metoxibenzoil-N-t-butil-N-(N-metilindol-2-carbonil) hidrazida

Se disolvió hidrazida de N'-2-etil-3-metoxibenzoil-N-t-butilo (150 mg, 0,6 mmol) en 2 ml de DMF. Se añadió t-butoxido potásico (80 mg, 0,7 mmol) y se agitó magnéticamente durante aproximadamente 5 min. Se añadió éster pentafluorofenílico de ácido N-metilindol-2-carboxílico y la mezcla se calentó a 100 °C. Después de 3 horas la reacción se completó como se indicó por TLC. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en 10 ml de agua. Se combinaron dos extracciones con cloruro de metileno y se evaporaron. El residuo se mezcló con aproximadamente 2 ml de éter etílico: hexano 1:1. Los licores madre se retiraron por pipeta y el residuo se secó al vacío. El producto era un sólido de color castaño que pesaba 140 mg. Los análisis de LC MS confirmaron la estructura y estimaron la pureza (detección UV) al 91 %. (Rendimiento = 52 %).

1.35 Preparación de N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-nicotínico (RG-115517)



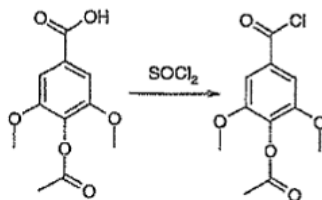
Se disolvieron 2,0 g (10,92 mmol) de ácido 2,6-dimetoxiisonicotínico en 100 ml de tolueno y después se añadió 1 gota de dimetilformamida. Se añadieron 1,55 g (13,1 mmol, 0,98 ml) de cloruro de tionilo y la solución se dejó a reflujo durante 4 horas. El tolueno y el cloruro de tionilo en exceso se retiraron al vacío y se usó cloruro de 2,6-dimetoxiisonicotinoilo sin purificación adicional.



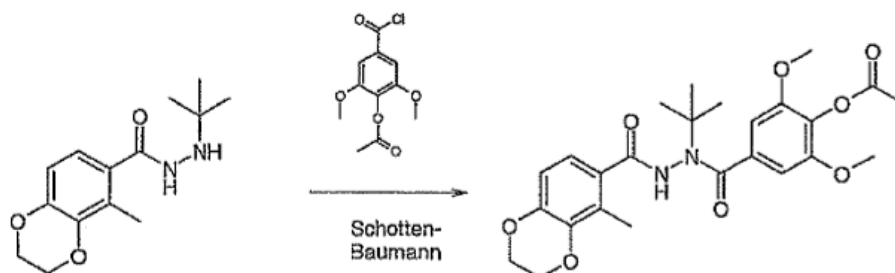
En un vial de 28,35 g (1 onza), con una barra de agitación, se añadió 1 ml de K₂CO₃ 1 M. Se disolvieron 0,250 g (1,2 mmol) de N-terc-butil-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico en 2 ml de cloruro de metileno y se añadieron a la solución acuosa. Se añadió después cloruro de 2,6-dimetil-isonicotinoilo y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. La capa acuosa se retiró y la capa orgánica se lavó dos veces con 2 ml de una solución de K₂CO₃ 1 M seguido de 2 ml de agua. La capa acuosa se retiró y la capa orgánica

se secó sobre MgSO_4 . La capa orgánica se filtró y después se retiró. El producto, N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-nicotínico, se purificó por trituración con éter: hexano 1:1 o por cromatografía. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 1,6 (s, 9H), 1,9 (s, 3H), 3,9 (s s, 6H), 4,2 (m, 4H), 6,2 (m, 1H), 6,7 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 8,3 (m, 1H).

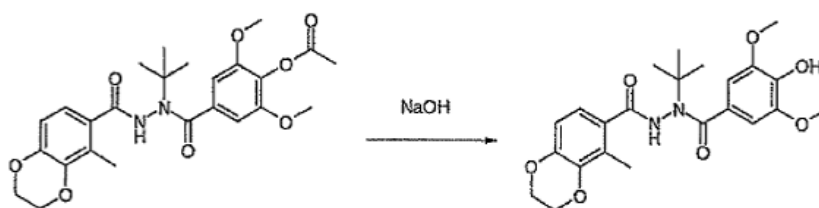
1.36 Preparación de N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico (RG-115009)



Se calentó ácido 4-acetoxy-3,5-dimetoxi-benzoico (1,45 g) con cloruro de tionilo (0,86 g) en 3 ml de dimetoxietano. Después de 1,5 horas la mezcla se extrajo al vacío dejando 1,60 g de cloruro de 4-acetoxy-3,5-dimetoxi-benzoilo como un aceite. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 2,26 (s, 3H), 3,89 (s, 9H), 7,34 (s, 2H).

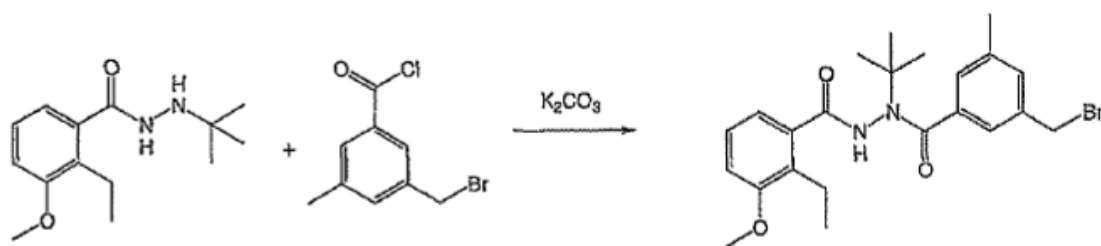


Se disolvieron cloruro de 4-acetoxy-3,5-dimetoxi-benzoilo (250 mg) y N'-terc-butil-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico (204 mg) en 3 ml de diclorometano y se agitaron a temperatura ambiente con 1,5 ml de una solución de carbonato sódico acuoso 1 M. Después de dos horas las fases se separaron y la fase orgánica se evaporó. El residuo sólido se lavó con éter: hexano 1:1 dejando 360 mg de éster de 4-[N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenilo de ácido acético. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 1,60 (m, 15H), 2,06 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 3,77 (s, 6H), 4,2 (m, 4H), 6,08 (d, 1H), 6,63 (d, 1H), 6,74 (s, 2H).

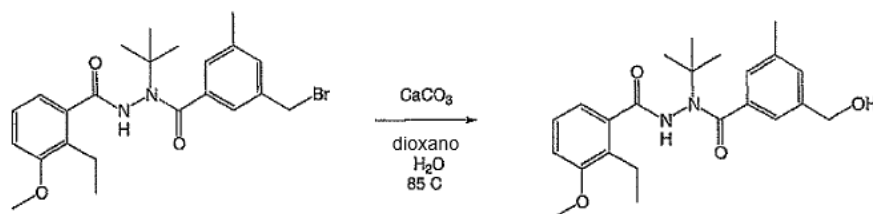


Se disolvió éster de 4-[N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenilo de ácido acético (300 mg) en metanol con amoníaco acuoso al 28 % (750 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. El precipitado se filtró para proporcionar 110 mg de sólido blanco de N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 1,59 (s, 15H), 2,02 (s, 3H), 3,85 (s, 6H), 4,21 (m, 4H), 5,6-5,7 (amplio s, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,58 (d, 1H), 6,81 (s, 2H).

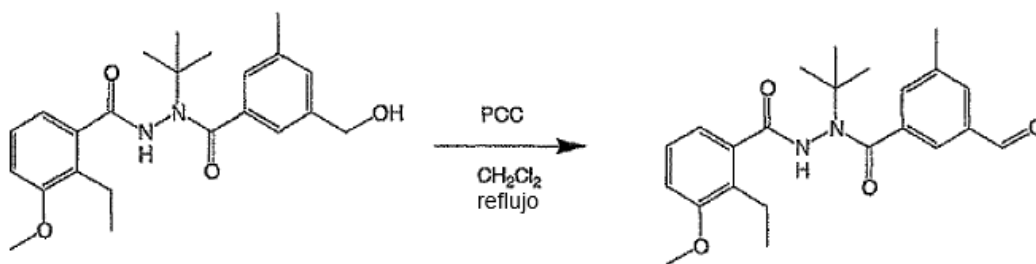
1.37 Preparación de los Compuestos RG-115613 y RG-115429



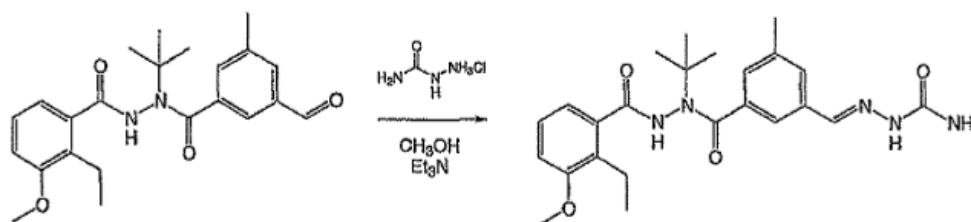
En un matraz de fondo redondo que contiene 2,50 g (10 mmol) de 2-etil-3-metoxi-benzoil-N'-terc-butil-hidrazida se añadieron 15 ml de cloruro de metileno, 2,60 g (10,5 mmol) de cloruro de 3-bromometil-5-metilbenzoilo en 5 ml de cloruro de metileno y una solución de 2,76 g (20 mmol) de carbonato potásico en 15 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente, después se diluyó con 20 ml de cloruro de metileno y se transfirió a un embudo separador. La capa de cloruro de metileno se separó y se secó y el disolvente se retiró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para producir 4,01 g de N-(3-bromometil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil) hidrazida (rendimiento del 87 %). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,41 (s, 1H), 7,1 (m, 3H), 7,02 (t, 1H), 6,082 (d, 1H), 6,08 (d, 1H), 4,41 (s, 2H), 3,78 (s, 3H), 2,4 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,25 (m, 1H), 1,60 (s, 9H), 1,01 (t, 3H).



A 4,00 g (8,68 mmol) de N-(3-bromometil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil) hidrazida, contenidos en un matraz de fondo redondo de 250 ml, se añadieron 40 ml de dioxano, 40 ml de agua y 4,34 g de carbonato cálcico. El matraz de reacción se colocó en un baño de aceite a 85 °C y la reacción se agitó y se calentó durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió, se transfirió a un matraz más grande con acetato de etilo y se evaporó la mayoría del acetato de etilo. La mezcla de reacción se agitó con aproximadamente 100 ml de acetato de etilo y se filtró. La capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se secó y se evaporó para producir 2,07 g de N-(3-hidroximetil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-bencil) hidrazida (rendimiento del 60 %). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,78 (s, 1H), 7,1-7,4 (3s, 3H), 6,96 (t, 1H), 6,8 (d, 1H), 6,08 (d, 1H), 4,53 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,35 (m, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,2 (m, 1H), 1,60 (s, 9H), 0,96 (t, 3H).

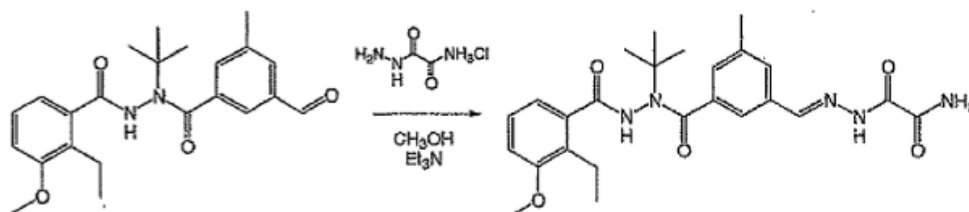


A 2,00 g (5,02 mmol) de N-(3-hidroximetil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-bencil) hidrazida colocados en un matraz de fondo redondo de 250 ml, se añadieron 100 ml de cloruro de metileno y 1,16 g de clorocromato de piridinio. La mezcla de reacción se dejó a reflujo durante aproximadamente 1 hora, en cuyo tiempo la TLC (acetato de etilo: hexano 1:1) indicó la formación del producto (R_f = 0,5). La mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 20 ml y después se cromatografió en gel de sílice. La elución con acetato de etilo al 30-35 % en hexano produjo 1,75 g (88 %) de N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-formil-5-metil-benzoico como un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9,93 (s, 1H), 7,6-7,8 (3s, 3H), 7,0 (t, 1H), 6,82 (d, 1H), 6,19 (d, 1H), 3,77 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,3 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 1,62 (s, 9H), 0,90 (t, 3H).



RG-115429

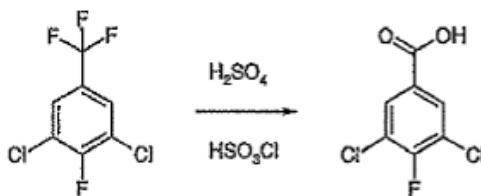
A 100 mg (0,25 mmol) de N-(3-formil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)hidrazida colocados en un vial de 20 ml se añadieron 2 ml de metanol, 112 mg de clorhidrato de semicarbazida, 0,2 g de trietilamina y una gota de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se agitó magnéticamente en una placa caliente ajustada a 50 °C durante aproximadamente 3 horas, después a temperatura ambiente durante 48 horas. El disolvente se evaporó con una corriente de nitrógeno y el residuo resultante se disolvió en 20 ml de cloroformo y se extrajo con HCl diluido. El extracto de cloroformo se secó, el disolvente se retiró al vacío y el residuo se secó en un horno de vacío a 60 °C. El residuo se enfrió y se trituró con hexano para producir 81 mg de semicarbazida de N-(3-formil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)hidrazida. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,9 (amplio s, 1H), 8,6 (amplio s, 1H), 7,3-7,5 (3s, 3H), 7,03 (t, 1H), 6,8 (d, 1H), 6,38 (d, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,26 (d, 1H), 2,4 (s, 3H), 1,95 (m, 1H), 1,57 (s, 9H), 0,95 (t, 3H).



A 100 mg (0,25 mmol) de N-(3-formil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)hidrazida colocados en un vial de 20 ml, se añadieron 2 ml de metanol, 103 mg de clorhidrato de hidrazida oxámica y una gota de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se agitó magnéticamente en una placa caliente ajustada a 50 °C durante aproximadamente 3 horas, después a temperatura ambiente durante 48 horas. El disolvente se evaporó con una corriente de nitrógeno y el residuo resultante se secó en un horno de vacío a 60 °C. El residuo se enfrió y se trituró con hexano para producir 70 mg de hidrazona oxámica de N-(3-formil-5-metil-benzoil)-N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil) hidrazida. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,5 (s, 1H), 8,6 (d, 1H), 7,9 (d, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,5 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 7,0 (t, 1H), 6,95 (d, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,2 (m, 1H), 2,35 (s, 3H), 1,95 (m, 1H), 1,51 (s, 9H), 0,80 (t, 3H).

1.38 Preparación de ácido 3,5-dicloro-4-fluorobenzoico

N-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-N'-(3,5-dicloro-4-fluorobenzoil)-N'-terc-butilhidrazina puede prepararse de acuerdo con la Patente de EE.UU. N.º 5.530.028. Brevemente, el producto del Ejemplo 8 y cloruro de 3,5-dicloro-4-fluorobenzoilo pueden prepararse de acuerdo con el Ejemplo 9 para producir N-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-N'-(3,5-dicloro-4-fluorobenzoil)-N'-terc-butilhidrazina

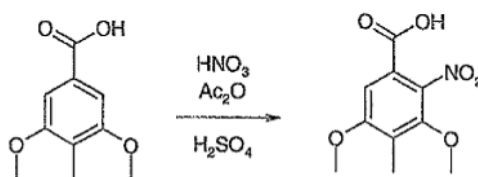


El cloruro de 3,5-dicloro-4-fluorobenzoilo puede prepararse como sigue: A un matraz de fondo redondo con purga de nitrógeno a través de una trampa de NaOH acuoso al 10 %, se añadió 3,5-dicloro-4-fluorobenzotrifluoruro (5,00 g, 21,46 mmol, Aldrich), ácido sulfúrico concentrado (4,30 g, 42,92 mmol) y finalmente ácido clorosulfónico (5,15 g, 43,78 mmol). La reacción comenzó a burbujear inmediatamente. Después de que disminuyera el burbujeo, la mezcla se calentó a 80 °C durante 1 h, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió cuidadosamente a un baño de hielo agitado. Esto se extrajo dos veces con cloruro de metileno. Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se evaporaron para dar un sólido blanco (2,19 g) de ácido 3,5-dicloro-4-fluorobenzoico con un rendimiento del 49 %. RMN ¹H (CD₃COCD₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,95 (d, 2H).

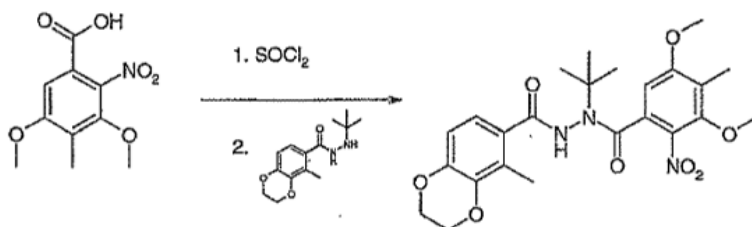


El ácido 3,5-dicloro-4-fluorobenzoico se dejó a reflujo con > 1 equivalente de cloruro de tionilo y una gota de DMF puro o como una solución en CHCl_3 . El disolvente y los productos secundarios volátiles se retiraron al vacío para proporcionar cloruro de 3,5-dicloro-4-fluorobenzoilo.

1.39 Preparación de N-t-butil-N'-(5-metil-benzo-1,4-dioxan-6-carboxil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-1,2-nitrobenzoico (RG-115609)

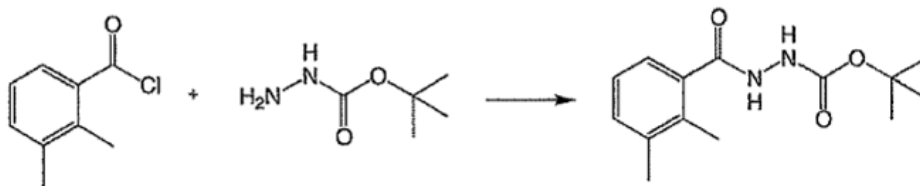


Se suspendió ácido 3,5-dimetoxi-4-metilbenzoico con 2.7 eq de anhídrido acético y 0,05 equivalentes molares de ácido sulfúrico concentrado en diclorometano. Después de enfriar a 10°C , se añadieron 1,05 eq de ácido nítrico al 70 % gota a gota manteniendo la temperatura por debajo de 15°C . Después de 30 min la mezcla se vertió en agua y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se concentraron hasta que estaba presente una suspensión espesa. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con diclorometano enfriado en hielo. La concentración adicional de los licores madre dio una segunda cosecha. El rendimiento total del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitrobenzoico fue aproximadamente el 80 %. RMN ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 7,34 (s, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 2,23 (s, 3H).

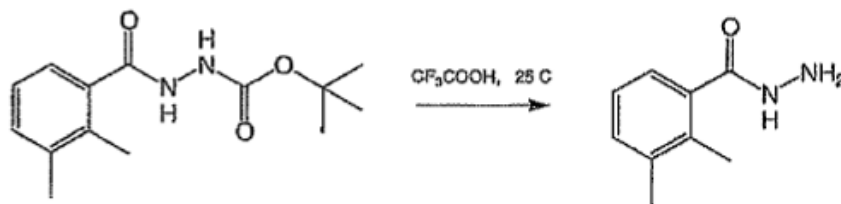


El ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitrobenzoico se agitó con 1,1 eq de cloruro de tionilo a temperatura ambiente en dimetoxietano hasta que se completó la reacción. El disolvente y el cloruro de tionilo en exceso se destilaron a presión atmosférica y el residuo se disolvió en diclorometano. Esta solución se añadió a una mezcla de carbonato potásico acuoso 1 M y N'-t-butil-hidrazida del ácido 5-metilbenzo-1,4-dioxan-6-benzoico en diclorometano. Después de 3 h, se añadieron agua y diclorometano. La fase orgánica se retiró y se extrajo al vacío. El residuo se trituró con éter: hexano 1:1 (peso: peso) para proporcionar N-t-butil-N'-(5-metil-benzo-1,4-dioxan-6-carboxil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitrobenzoico (rendimiento de aproximadamente el 94 %). La TLC (acetato de etilo: hexano 1:1) indicó una mancha, Rf 0,53. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,84 (s, 1H), 7,02 (t, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 3,90 (m, 4H), 3,79 (s, 6H), 2,16 (s, 3H), 1,60 (s, 9H).

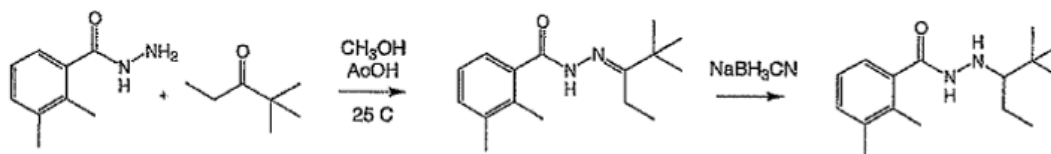
1.40 Preparación de N'-(2,3-dimetil-benzoil-N-(1-etil-2,2-dimetilpropil))-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-103309)



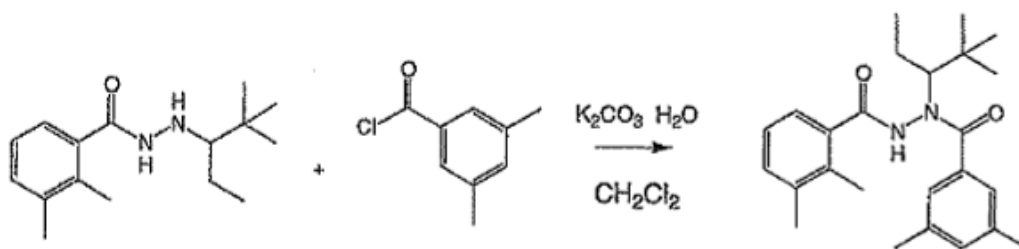
Se añadieron t-butilcarbazato (35,15 g, 266 mmol) y 200 ml de CH_2Cl_2 a un matraz de fondo redondo. Se añadió al matraz carbonato potásico (55,2 g, 0,4 moles) disuelto en 350 ml de agua y la mezcla se agitó durante 15 minutos con hielo frío. Se añadió cloruro de 2,3-dimetilbenzoilo (44,9 g, 266 mmol) en aproximadamente 200 ml de CH_2Cl_2 gota a gota desde un embudo separador de 500 ml durante 30 minutos. La reacción se dejó agitar durante toda la noche y después la mezcla de reacción se vertió en un embudo separador de 1 l y se separó la fase de CH_2Cl_2 . Después se añadieron aproximadamente 150 ml de agua y la mezcla se extrajo dos veces con 150 ml de CHCl_3 . La fase orgánica combinada se volvió a extraer con 100 ml de agua, después con HCl 1 N (250 ml), para retirar la hidrazida. La fase orgánica se secó, se agitó con carbón y el disolvente se retiró al vacío para producir un sólido color castaño claro (71,5 g) de éster terc-butílico de ácido N'-(2,3-dimetil-benzoil)-hidrazincarboxílico. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,7 (br, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,1 (t, 1H), 7,85 (br, 1H), 2,35 (s, 3H), 2,3 (s, 3H), 1,5 (s, 9H).



Se colocó éster terc-butílico de ácido N'-(2,3-dimetil-benzoil)-hidrazincarboxílico (70,3 g, 266 moles) en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Con agitación suave, se añadieron lentamente 200 ml de ácido trifluoroacético (296 g, 2,6 moles), dando como resultado un desprendimiento vigoroso del gas. La mezcla de reacción se agitó después a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua (aproximadamente 10 ml) lentamente a la mezcla. La mezcla se añadió lentamente a 1 l de una solución fría de K_2CO_3 2 M, contenida en un vaso de precipitados de 2 l, agitando lentamente (desprendimiento del gas). Se añadieron aproximadamente 200 ml de una solución de NaOH al 10 % y 250 ml de CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador grande y se agitó suavemente (desprendimiento del gas). La fase acuosa se extrajo con CHCl_3 y los extractos se secaron y se evaporaron para producir un sólido blanco, que se secó en un horno de vacío a 50°C para producir 31,72 g (rendimiento del 73 %) de hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7-7,3 (m, 4H), 4,00 (br s, 2H), 2,271 (s, 6H).

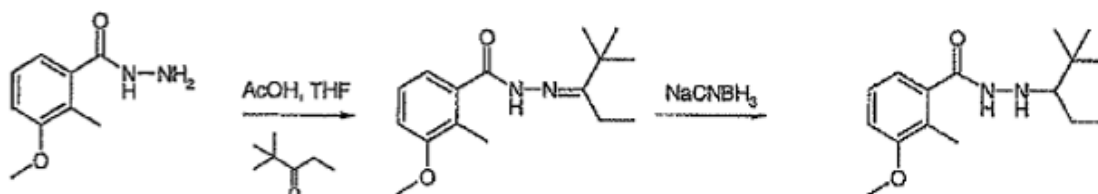


En un matraz de fondo redondo de 200 ml, se disolvieron 7,90 g (48 mmol) de hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico en 60 ml de metanol y se añadieron después 3 gotas de ácido acético glacial. A la mezcla de reacción se añadieron 6,00 g (52,6 mmol) de 2,2-dimetilpentan-3-ona y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La hidrazona producto no se aisló, sino que se sometió directamente a reducción. Se añadieron ácido acético glacial (10 ml) y cianoborohidruro sódico (3,2 g, 50,95 mmol) a la mezcla de reacción, que se agitó después a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadieron aproximadamente 50 ml de una solución de NaOH acuoso al 10 % y la mayoría del CH_3OH se retiró en un evaporador rotatorio. La reacción se diluyó con agua (100 ml) y el producto se extrajo con CH_2Cl_2 . El extracto orgánico se secó y se evaporó para producir 11,87 g (94 %) de N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,0-7,3 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,296 (s, 3H), 1,7 (m, 1H), 1,3 (m, 1H), 1,16 (t, 3H), 0,979 (s, 9H). TLC: R_f = 0,57 (acetato de etilo: hexano 1:1), indicó > 90 % de pureza. Puede lograrse una purificación adicional por cromatografía en gel de sílice y elución del producto con acetato de etilo al 20 % en hexanos.

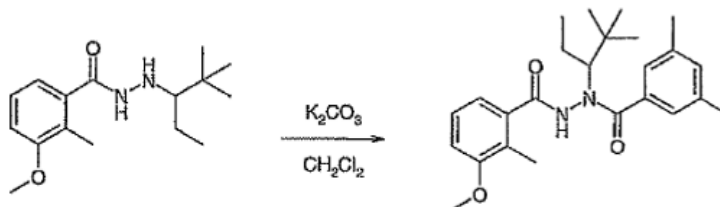


Se disolvió N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico (0,59 g, 2,25 mmol) en 15 ml de CH₂Cl₂ en un matraz de fondo redondo pequeño. Se añadió una solución acuosa de K₂CO₃ (0,70 g en 150 ml de H₂O). Se añadió cloruro de 3,5-dimetilbenzoilo (0,45 g, 2,7 mmol) disuelto en 10 ml de CH₂Cl₂ y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se extrajo con CH₂Cl₂. (En otro experimento, ésta se lavó con NaOH débil para deshacerse del ácido en exceso y del cloruro ácido). El extracto se secó y se evaporó para dar aproximadamente 1 g de un sólido blanco, que se purificó por cromatografía en gel de sílice. La elución con acetato de etilo al 15 % en hexano produjo producto puro de N'-(2,3-dimetil-benzoil)-N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetilbenzoico (0,62 g, 70 %). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,95-7,4 (m, 7H), 4,61 (m, 1H), 2,2,-2,4 (s múltiple, 9H), 1,81 (s, 3H), 1,6-1,8 (m, 2H), 1,3 (br t, 3H), 1,08 (br s múltiple, 9H).

1.41 Preparación de N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (RG-115819)

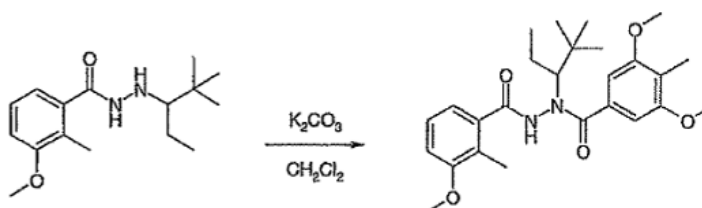


Se disolvieron 10,34 g (57,5 mmol) de hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico (lote CPO 10925) en 100 ml de metanol y se agitó. Se añadieron 9,80 g (86,3 mmol) de 2,2-dimetil-3-pentanona seguido de 3 gotas de ácido acético glacial. La mezcla se dejó agitar durante 48 horas. La mezcla bruta se llevó después a pH = 3. Se añadieron después 3,84 g (61,2 mmol) de NaCNBH₃. La suspensión se dejó agitar a temperatura ambiente durante toda la noche y después se retiró el metanol. Se añadieron 100 ml de NaOH al 10 % y 100 ml de cloruro de metileno. La mezcla se agitó y se retiró la capa de cloruro de metileno. La capa acuosa se lavó dos veces con 75 ml de cloruro de metileno. Las capas de cloruro de metileno se combinaron y se secaron. La retirada del disolvente produjo el producto deseado como un líquido amarillo pálido. El producto podía obtenerse también por reducción de la hidrazida con Pd al 10 % en carbono. La purificación se consiguió por cromatografía en columna en gel de sílice, eluyendo con hexano: éter 3:2. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 1,0 (s, 9 H), 1,1 (t, 3H), 1,2 (m, 1H), 1,5 (m 2H), 2,1 (s, 3H), 3,8, (s, 3H), 4,9 (br s, 1H), 6,6 (d, 1H), 7,0-7,2 (m, 2H). TLC: R_f = 0,45 (hexano: éter 1:1).



Se disolvieron 6,2 g (22,1 mmol) de (1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico en 35 ml de acetato de etilo y se enfrió a 0 °C. Se añadieron 74 ml de un K₂CO₃ acuoso 1 N y las mezclas se agitaron. Se disolvieron 5,6 g (33,6 mmol) de cloruro de 3,5-dimetilbenzoilo en 40 ml de acetato de etilo y esta solución se añadió a la mezcla hidrazida durante 15 min. La mezcla se dejó calentarse a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La capa acuosa se retiró después y la capa orgánica se lavó con 75 ml de una solución de K₂CO₃ acuosa 1 N y después con 100 ml de agua. La capa orgánica se secó y se retiró para producir un sólido blanquecino. Este material se trituró tres veces con 25 ml de hexano: éter 1:1 para producir el producto final con una pureza del 98,7 %. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0,7-1,5 (m, 15H), 2,1 (s, 9H), 3,7 (s, 3H), 6,8-7,1, (m, 6H). TLC: R_f = 0,62 (hexano: éter 1:1).

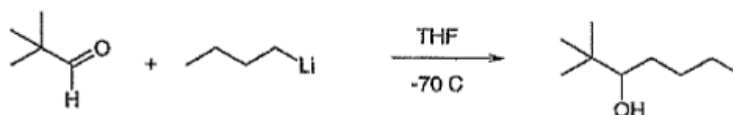
1.42 Preparación de N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico (RG-115820)



RG-115820

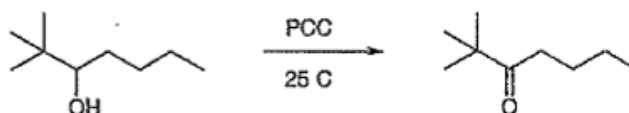
A un vial de 20 ml se añadieron 161 mg (0,75 mmol) de cloruro de 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoilo, una solución de N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico y 1,5 ml de K₂CO₃ acuoso al 25 %. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador con CH₂Cl₂ y se agitó con NaHCO₃ acuoso diluido. La fase orgánica se secó, se concentró y se cromatografió en sílice. Se eluyeron 100 mg de producto puro, N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico, con acetato de etilo al 25 %/hexano. TLC: R_f = 0,54 (acetato de etilo: hexano 1:1); RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 6,6-7,2 (m, 4H), 6,25 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 3,8-3,95 (br s, 9H), 2,1 (br s, 3H), 1,9 (s, 3H), 1,6 (br, 2H), 1,3 (m, 3H), 0,9-1,2 (br d, 9H).

1.43 Preparación de 2,2-dimetil-heptan-3-ol



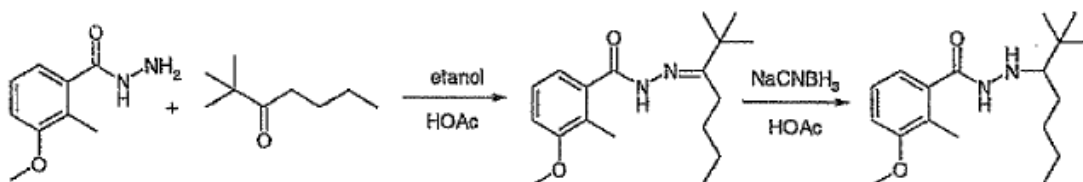
Se añadieron 20 g (0,232 mol) de pivaldehído disueltos en 600 ml de THF a un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 l equipado con una barra de agitación magnética, un termómetro y un tapón de goma. El recipiente se mantuvo en N₂. La mezcla de reacción se enfrió a -65 °C en un baño de hielo seco/acetona. Se añadieron lentamente 112 ml (0,279 mol) de una solución de BuLi 2,5 M en hexano en porciones de 5 ml con una jeringa de vidrio de 20 ml, manteniendo la temperatura por debajo de -55 °C. La reacción se agitó a -60 °C durante una hora, después se dejó calentar a -5 °C durante una hora. La reacción se enfrió de nuevo a -60 °C y se interrumpió lentamente con una solución de NH₄Cl/H₂O, manteniendo la temperatura por debajo de -50 °C. Se añadieron 100 ml de agua y la reacción se dejó calentarse a temperatura ambiente. El THF se retiró en un evaporador rotatorio con una temperatura de baño de 25 °C hasta que se observó un aceite. El producto se extrajo con éter etílico y el éter se secó y se evaporó cuidadosamente para producir 31,0 g de 2,2-dimetil-heptan-3-ol que se usó directamente en una reacción de oxidación posterior. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 3,2 (m, 1H), 1,2-1,7 (m, 3H), 0,93 (m, 3H), 0,89 (s, 9H).

1.44 Preparación de 2,2-dimetil-heptan-3-ona



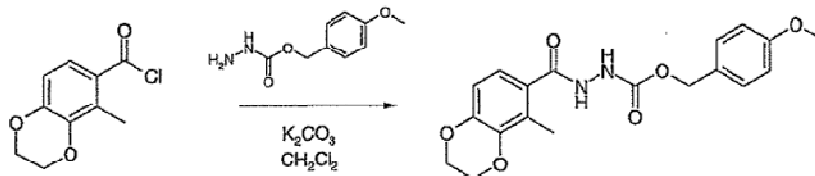
Se disolvió 2,2-dimetil-heptan-3-ol (0,23 mol) en 350 ml de CH₂Cl₂ en un matraz de fondo redondo de 500 ml con una barra de agitación magnética. El matraz se enfrió parcialmente con hielo. Se añadieron 76,6 g (0,355 mol) de clorocromato de piridinio, agitando vigorosamente. La reacción se volvió negra y se calentó ligeramente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución se decantó del lodo negro, que se aclaró con hexano. Los extractos orgánicos se combinaron y se cromatografiaron directamente en gel de sílice. (Nota: se ha descubierto que solamente la sílice atrapa y retira los compuestos de cromo reducidos sin reaccionar). El producto, 2,2-dimetil-heptan-3-ona, eluyó con CH₂Cl₂/hexano y en una fracción posterior de acetato de etilo al 10 %/hexano para producir 29,19 g de producto con un rendimiento del 88 %. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 2,48 (t, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), 1,13 (s, 9H), 0,90 (m, 3H).

1.45 Preparación de N'-(1-terc-butil-pentil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico

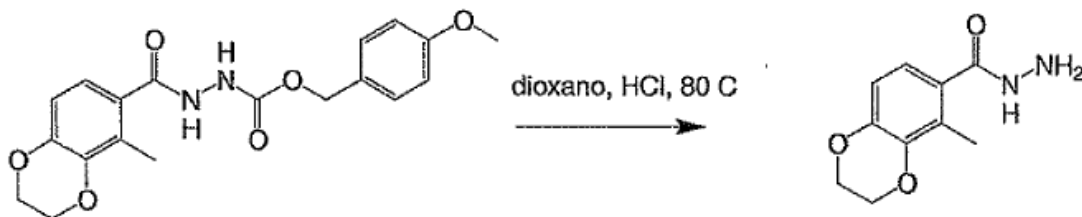


2,84 g (20 mmol) de 2,2-dimetil-heptan-3-ona, 3,60 g (20 mmol) de hidrazida del ácido 2-metil-3-metoxi-benzoico, 20 gotas de ácido acético glacial y 40 ml de alcohol etílico al 100 % se dejaron a reflujo durante 4 horas y después se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas. La TLC indicó solamente un 35 % de la reacción. En consecuencia, la mezcla de reacción se dejó a reflujo durante unas 6 horas adicionales. La TLC indicó aproximadamente un 80 % de la reacción (TLC R_f = 0,57, hidrazida de partida, R_f = 0,08, acetato de etilo : hexano 1:1). Se añadieron a la mezcla de reacción 3,5 ml de ácido acético glacial y 1,89 g (30 mmol) de NaCNBH₃. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se dejó a reflujo durante 1 hora. Se añadieron 50 ml de

agua y se añadió NaOH al 15 % hasta que la mezcla de reacción fuera básica. La mayoría del alcohol se retiró en un evaporador rotatorio y el producto se extrajo con CHCl_3 , para producir 4,28 g de material bruto. La TLC indicó la hidrazida producto en R_f 0,54 (acetato de etilo : hexano 1:1). La purificación por cromatografía en gradiente en sílice produjo 3,03 g de producto, que eluyó en una fracción de acetato de etilo al 25-40 %/hexano. El secado en un horno de vacío a 55 °C eliminó los materiales volátiles, produciendo 2,69 g de N'-(terc-butil-pentil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 7,2 (t, 1H), 7,05 (br, 1H[NH]), 6,9 (m, 2H), 4,9 (br, 1H), 3,84 (s, 3H), 2,5 (m, 1H), 2,3 (s, 3H), 1,2-1,8 (m, 6H), 0,97 (s, 9H), 0,92 (t, 3H).

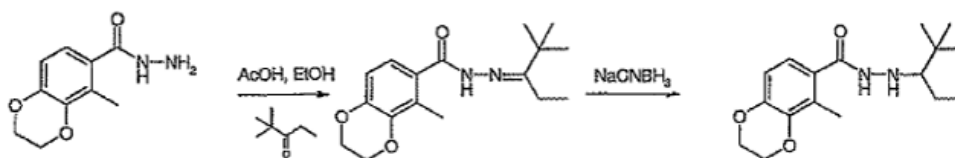


Se disolvieron 17,85 g (90,98 mmol) de carbazato de 4-metoxibencilo en 50 ml de CH_2Cl_2 en un matraz de 250 ml y después se enfrió en agua helada. Se añadieron 21,42 g (155 mmol) de carbonato potásico disueltos en 80 ml de agua. Mientras la mezcla de reacción se estaba agitando en el baño helado, se añadieron lentamente 17,0 g (79,95 mmol) de cloruro de 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carbonilo en 60 ml de CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y después se transfirió a un embudo separador con 200 ml de CH_2Cl_2 y 200 ml de H_2O . Después de agitar, se filtró un precipitado flotante blanco, se lavó con agua, se secó en un horno de vacío para dar 29,1 g de éster 4-metoxi-bencílico de ácido N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)hidrazincarboxílico. La solución de CH_2Cl_2 se secó y se concentró para dar 5,19 g de un residuo que consiste en el cloruro ácido original, carbazato de 4-metoxibencilo, y algo de producto. TLC R_f = 0,38 (racha de acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,4 - 6,7 (m, 6H), 5,139 (s 2H), 4,279 (s 4H), 3,81 (s, 3H), 2,303 (s, 3H).



En un matraz de 500 ml de volumen, se combinaron 18,6 g (0,0499 moles) de éster 4-metoxi-bencílico de ácido N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)hidrazincarboxílico, 72 ml de HCl concentrado y 108 ml de dioxano. El matraz se colocó en un baño de aceite de 80 °C y se agitó mecánicamente durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió con agua helada, después se vertió en agua helada y se transfirió a un embudo separador. La mezcla de reacción - solución de H_2O se extrajo después dos veces con 150 ml de CH_2Cl_2 para retirar los ácidos y los neutros (el material de partida). La fase acuosa se hizo básica (pH 12) con una solución de NaOH al 20 % y se extrajo 4 veces con 150 ml de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se secó sobre MgSO_4 y se concentró para producir 4,5 g de hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,0 (s, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,74 (d, 1H), 4,28 (m, 4H), 2,781 (s, 3H).

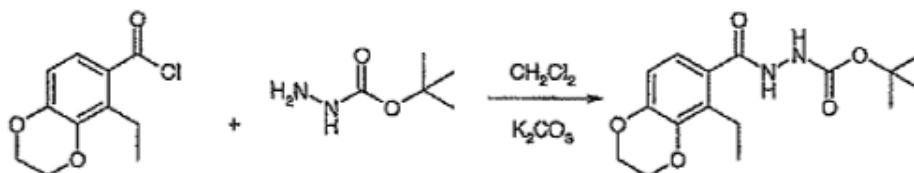
1.46 Preparación de N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico



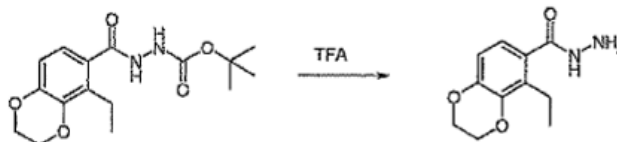
0,86 g (4,1 mmol) de hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico y 1,14 g (10 mmol) de 2,2-dimetil-pentan-3-ona, 30 ml de alcohol etílico y 20 gotas de ácido acético glacial se dejaron a reflujo durante 6 horas. La TLC indicó una conversión de aproximadamente el 60 % a (1-etil-2,2-dimetil-propiliden)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico (R_f = 0,40, acetato de etilo: hexano 1:1). La reacción se enfrió, se añadieron 3 ml de ácido acético glacial seguido de 0,63 g (10 mmol) de cianoborohidruro sódico y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mayoría del alcohol se retiró en un evaporador rotatorio. Se añadieron 30 ml de agua, seguido de la adición de NaOH/ H_2O al 10 % hasta que la mezcla de reacción fue básica.

La mezcla se extrajo extensivamente con acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se secó y se evaporó para dar 1,2 g de material bruto. El producto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 20-30 %/hexano. Se obtuvieron aproximadamente 0,46 g de N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico pura. TLC: R_f = 0,46 (acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 7,1 (br, 1H[NH]), 6,85 (d, 1H), 6,71 (d, 1H), 4,8 (br, 1H), 4,29 (m, 2H), 4,25 (m, 2H), 2,4 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,7 (m, 1H), 1,3 (m, 1H), 1,15 (t, 3H), 0,98 (s, 9H).

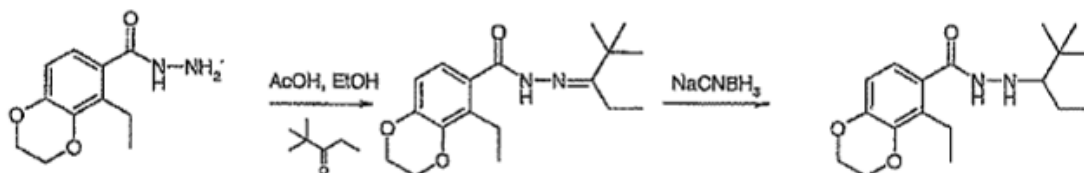
1.47 Preparación de RG-115858, N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carbonil)-N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico



Se disolvieron 2,38 g (18 mmol) de carbazato de t-butilo en 50 ml de CH_2Cl_2 en un matraz de fondo redondo de 250 ml y se enfrió a 0 °C. Se preparó una solución de K_2CO_3 acuoso (4,15 g K_2CO_3 / 35 ml H_2O) y se añadió a la mezcla de reacción que se enfrió de nuevo a 0 °C. Se disolvieron 3,63 g (16 mmol) de cloruro de 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carbonilo en 40 ml de CH_2Cl_2 y se añadieron desde un embudo separador, gota a gota durante 15 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador con CH_2Cl_2 y H_2O . La fase acuosa se extrajo exhaustivamente con CH_2Cl_2 . El extracto de CH_2Cl_2 se extrajo después con HCl 0,5 N, se secó y se evaporó. El residuo se secó adicionalmente en un horno de vacío para producir 5,15 g de un sólido color castaño de éster terc-butílico de ácido N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carbonil)-hidrazincarboxílico. La TLC (acetato de etilo: hexano 1:1) dio una mancha única en R_f = 0,43 y la RMN indicó un producto muy puro: RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 7,5 (br, 1H), 7,0 (br, 1H), 6,75 (d, 2H), 4,28 (br, 4H), 2,76 (m, 2H), 1,5 (s, 9H), 1,18 (t, 3H).

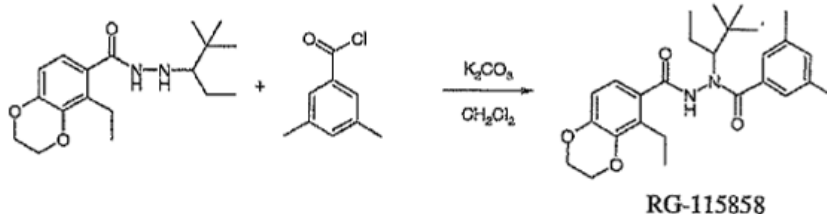


Se añadieron 5,15 g (16 mmol) de éster terc-butílico de ácido N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carbonil)-hidrazincarboxílico a un matraz de fondo redondo de 200 ml. Se añadieron aproximadamente 20 ml de ácido trifluoroacético y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se añadieron aproximadamente 40 ml de agua, seguido de la adición lenta de NaOH/ H_2O frío al 10 %, con agitación, hasta que se neutralizó el ácido (pH ~ 14). La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se extrajo con acetato de etilo agitando suavemente (precaución: desprendimiento de gas). El extracto de acetato de etilo se secó y se evaporó para producir 5,51 g de un semi-sólido viscoso amarillo pálido. El material se colocó después en un horno de vacío a 50 °C durante aproximadamente 1 hora para producir 4,62 g de hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico. La escisión t-Boc se realiza mejor con ácido trifluoroacético puro; el uso de disolventes adyuvantes siempre dio como resultado rendimientos mucho menores. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 7,0 (br, 1H), 6,83 (m, 1H), 6,71 (m, 1H), 4,28 (br s, 4H), 2,76 (m, 2H), 1,6 (br, 2H), 1,17 (t, 3H).



1,12 g (5,1 mmol) de 2,2-dimetilpentanona, 3,30 ml de etanol y 20 gotas de ácido acético glacial se dejaron a reflujo durante 6 horas para generar (1-etil-2,2-dimetil-propiliden)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico, que se usó *in situ*. Se añadieron a la mezcla de reacción enfriada 3 ml de ácido acético glacial y 0,63 g (10 mmol) de NaCNBH_3 . La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadieron 25 ml de agua y la mayoría del alcohol se retiró en un evaporador rotatorio. Después se añadió NaOH/ H_2O al 10 % hasta que la mezcla de reacción fue básica. El producto se extrajo con acetato de etilo, que se secó después y se evaporó

para dar 1,61 g de residuo. Se obtuvo N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico (aproximadamente 0,77 g) por cromatografía en columna en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 25 %/hexano. TLC: Rf = 0,53 (acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,1 (br s, 1H), 6,8 (d, 1H), 6,7 (d, 1H), 4,27 (m, 4H), 2,8 (m, 2H), 2,4 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,3 (m, 1H), 1,2 (t, 3H), 1,15 (t, 3H), 0,97 (s, 9H).



Se añadieron 0,214 g (0,70 mmol) de N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carboxílico, 151 mg (0,9 mmol) de cloruro de 3,5-dimetilbenzoilo, 7 ml de K₂CO₃/H₂O al 25 % y 7 ml de CH₂Cl₂ a un vial de 20 ml y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se añadieron NaHCO₃ diluido y CH₂Cl₂. La capa de CH₂Cl₂ se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces con CH₂Cl₂. Los extractos de CH₂Cl₂ se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para producir 0,59 g de un residuo blanco. La purificación por cromatografía en columna y la elución con 15 ml de acetato de etilo/hexano al 20 % produjeron aproximadamente 350 mg de N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-carbonil)-N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico (pura al 95 % por TLC: Rf = 0,56, acetato de etilo:hexano 1:1). RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,05 (s, 1H), 7,0 (s, 2H), 6,6 (d, 1H), 6,27 (d, 1H), 4,65 (d, 1H), 4,25 (s, 4H), 2,9 (m, 1H), 2,3 (s, 6H), 2,0 (m, 1H), 1,55-1,7 (m, 2H), 1,25 (m, 3H), 0,9-1,2 (3s, 9H), 0,9 (t, 3H).

Los siguientes compuestos se prepararon de forma similar:

N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico. TLC: Rf = 0,45, 3:2 (hexano: acetona).

RG-115851, N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,7 (s, 1H), 7,22,7,1 (2 br s, 1H), 7,08 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 6,87 (m, 1H), 6,28 (m, 1H), 4,7 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,28 (s, 6H), 1,8 (s, 3H), 1,3-1,6 (br m, 6H), 1,2, 1,1, 0,95 (3s, 9H), 0,95 (m, 3H); TLC: Rf = 0,56 (acetato de etilo : hexano 1:1).

RG-115852, N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,05 (t, 1H), 7,0 (s, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,65 (s, 2H), 6,25 (d, 1H), 4,7 (d, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,78 (s, 6H), 2,10 (s, 3H), 1,86 (s, 3H), 1,3-1,6 (br m, 6H), 1,06, 0,99 (2s, 9H), 0,94 (t, 3H); TLC: Rf = 0,55 (acetato de etilo : hexano 1:1).

N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,05 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 6,3 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,25 (m, 4H), 2,25 (s, 6H), 1,85 (s, 3H), 1,5-1,8 (br, 2H), 1,3 (t, 3H), 1,0-1,2 (2s, 9H); TLC: Rf = 0,52 (acetato de etilo : hexano 1:1).

N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 6,8 (br s, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 6,27 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,25 (m, 4H), 3,84, 3,78 (2s, 6H), 2,1 (s, 3H), 1,87 (s, 3H), 1,6 (br, 2H), 1,3 (t, 3H), 0,9-1,2 (m, 9H); TLC: Rf = 0,45 (acetato de etilo : hexano 1:1).

N-(1-terc-butil-butil)-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,05 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 6,3 (d, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,2 (m, 4H), 2,3 (s, 6H), 1,8 (s, 3H), 1,3-1,7 (br m, 4H), 1,1, 1,15 (2s, 9H), 0,95 (t, 3H).

N-(1-terc-butil-butil)-N'-(5-metil-2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 6,75 (br s, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 6,25 (d, 1H), 4,7 (t, 1H), 4,25 (m, 4H), 3,78, 3,84 (2s, 6H), 2,85 (br, 1H), 2,37 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,86 (s, 3H), 1,3-1,7 (br m, 4H).

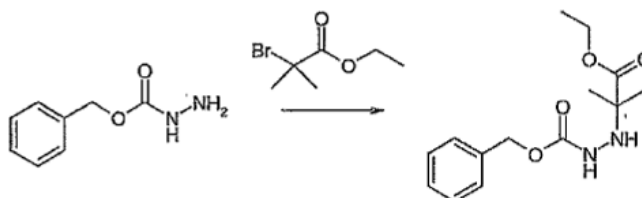
N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 6,8 (br s, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 6,25 (d, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,25 (2s, 4H), 3,79-3,84 (2s, 6H), 2,9 (br, 1H), 2,35 (br, 1H), 2,1 (s, 3H), 1,3-1,9 (br m, 2H), 1,3 (t, 3H), 1,1-1,3 (m, 9H), 0,94 (t, 3H); TLC: Rf = 0,48 (acetato de etilo : hexano 1:1).

N-(1-terc-butil-butil)-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 7,05 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 6,59 (d, 1H), 6,18 (d, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,27, 4,25 (s, 4H), 2,85

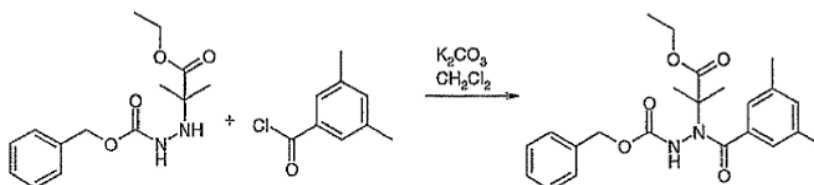
(m, 1H), 2,3 (s, 6H), 2,1 (m, 1H), 1,3-1,8 (br m, 4H), 1,1, 1,15 (2s, 9H), 0,95 (t, 6H); TLC: Rf = 0,53 (acetato de etilo : hexano 1:1).

N-(1-terc-butil-butil)-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 6,75 (br s, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,6 (d, 1H), 6,2 (d, 1H), 4,7 (m, 1H), 4,25 (br m, 4H), 3,84, 3,78 (2s, 6H), 2,4 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 2,1 (s, 3H), 1,2-1,8 (br m, 4H), 1,1-0,95 (m, 9H), 0,95 (m, 6H). TLC: 0,54 (acetato de etilo : hexano 1:1); TLC Rf = 0,54 (acetato de etilo : hexano 1:1).

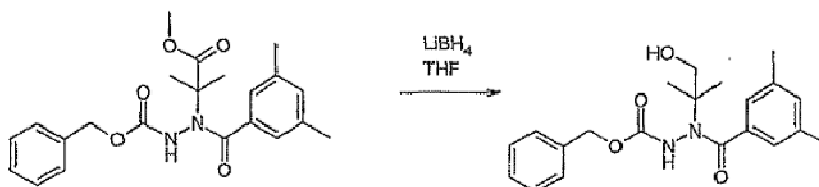
1.48 Preparación de RG-115665



Se disolvió carbazato de bencilo (25 g, 0,15 mol) en 50 ml de DMF en un matraz de fondo redondo. La solución se calentó a 95-100 °C. Desde dos embudos de adición separados, se añadieron 2-bromoisobutirato de etilo (58,5 g, 0,3 mol) y piridina (29,7 g, 0,375 mol, 30 ml) gota a gota separada y simultáneamente durante 30-120 minutos. Se continuó el calentamiento si era necesario impulsar la reacción hasta que se completara. La reacción se monitorizó por TLC (acetato de etilo al 30 % en hexanos, visualización por I₂). La mezcla se dejó enfriarse y después se vertió en agua helada. La mezcla acuosa se extrajo con éter etílico y el disolvente se retiró al vacío. Se aisló éster etílico de ácido 2-(N'-benciloxycarbonil-hidrazino)-2-metil-propiónico, opcionalmente después de la cromatografía en gel de sílice. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,36 (br s, 5H), 6,6 (br s, 1H), 5,15 (br s, 2H), 4,2 (q, 2H), 1,3 (s, 6H), 1,25 (t, 3H). El análisis de RMN ¹H solo es insuficiente para comprobar el grado de la reacción.

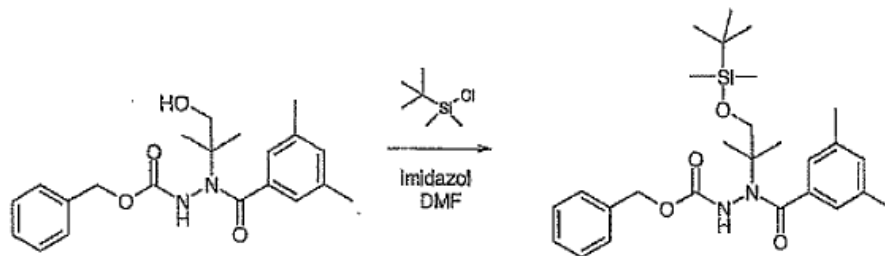


Se disolvió éster etílico de ácido 2-(N'-benciloxycarbonil-hidrazino)-2-metil-propiónico (28 g, 0,1 mol) en 50 ml de CH₂Cl₂ y se enfrió en hielo. Se añadió una solución de 20,7 g de K₂CO₃ en 30 ml de agua. Se añadió una solución de cloruro de 3,5-dimetilbenzoilo (17 g, 0,1 mol) en 50 ml de CH₂Cl₂ gota a gota durante un periodo de 1 hora, manteniendo la temperatura a 0-5 °C. La mezcla se agitó durante 1 hora en un baño de hielo y después a temperatura ambiente durante toda la noche. La TLC indicó que la reacción se completó. La capa acuosa se retiró en un embudo separador y la fase orgánica se lavó con agua y después con salmuera y después se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se retiró en un evaporador rotatorio. El residuo se suspendió en hexano, se filtró y después se secó al aire. Se obtuvo éster etílico de ácido 2-[N'-benciloxycarbonil-N-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico como un sólido blanco (35 g), dando una única mancha por TLC. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,4 (s, 1H), 7,3 (m, 3H), 7,15 (m, 2H), 7,1 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 5,2 (d, 1H), 5,0 (d, 1H), 4,2 (m, 2H), 2,25 (s, 6H), 1,78 (s, 3H), 1,64 (s, 3H), 1,28 (t, 3H).

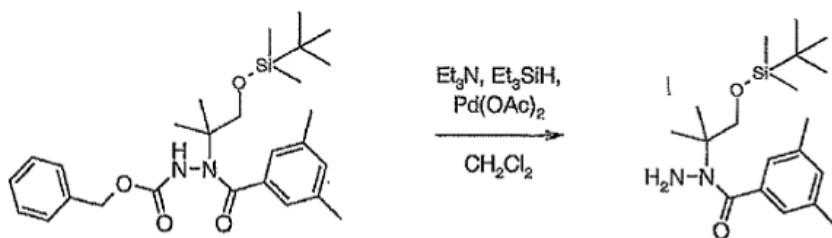


A un matraz de fondo redondo de 500 ml se añadieron 20,62 g (0,05 mol) de éster metílico de ácido 2-[N'-benciloxycarbonil-N-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico y 200 ml de THF seco. La mezcla se agitó y el matraz se enfrió en hielo seco y después se añadieron 0,87 g (0,04 mol) de LiBH₄ con agitación a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se refrigeró y se añadió más LiBH₄ (1,3 g) y la reacción se refrigeró durante 2 días. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de éter y la mezcla total se vertió lentamente en 150 ml de agua en un embudo separador. Después de que disminuyera el burbujeo, la mezcla se agitó y después se agitó suavemente. La capa de éter se separó y el agua se extrajo dos veces con 100 ml de

Et₂O. El extracto de éter total se extrajo con agua, se lavó con salmuera y se evaporó para producir 20,04 g del producto. El producto se purificó por cromatografía. El producto eluyó con acetato de etilo: hexano al 30-35 % para producir 11,6 g de éster bencílico de ácido N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazincarboxílico, RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,3-6,9 (3s, 8H), 5,1 (d, 1H), 4,9 (d, 1H), 4,1 (d, 1H), 4,1 (d, 1H), 3,6 (d, 1H), 2,25 (s, 6H), 1,48 (s, 3H), 1,41 (s, 3H), así como 4 g de material de partida sin reaccionar.

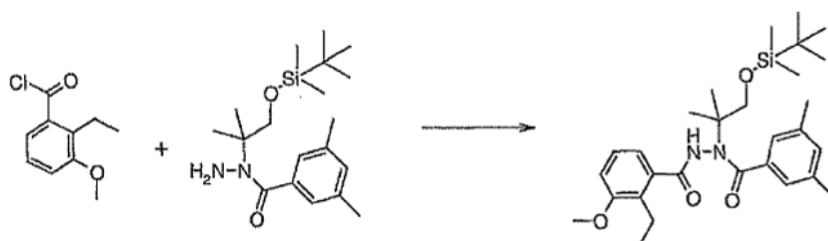


A un matraz de fondo redondo se añadieron 4,00 g (0,0108 mol) de éster bencílico de ácido N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazincarboxílico, 3,27 g (0,048 mol) de imidazol y 20 ml de DMF. El matraz se enfrió en un baño de hielo y después se añadieron 4,08 g (0,027 mol) de t-butilo, se añadió lentamente cloruro de dimetilsililo manteniendo la temperatura por debajo de 25 °C. El baño de hielo se retiró y la reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió después en 200 ml de agua y se extrajo tres veces con 100 ml de éter. El extracto de éter se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄ y se concentró para producir 7,12 g de producto. El producto se limpió por cromatografía en columna. El t-butilo y el cloruro de dimetilsililo sin reaccionar se eluyeron con hexano y CH₂Cl₂/hexano al 10 %. El producto eluyó con CH₂Cl₂/hexano al 20-100 % para producir 5,13 g de éster bencílico de ácido N'-[(2-terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazincarboxílico. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,3-6,7 (m, 8H), 5,0 (s, 2H), 4,1 (d, 1H), 3,4 (d, 1H), 2,15 (d, 6H), 1,54 (d, 3H), 1,25 (d, 3H), 0,82 (s, 9H), 0,01 (s, 6H).

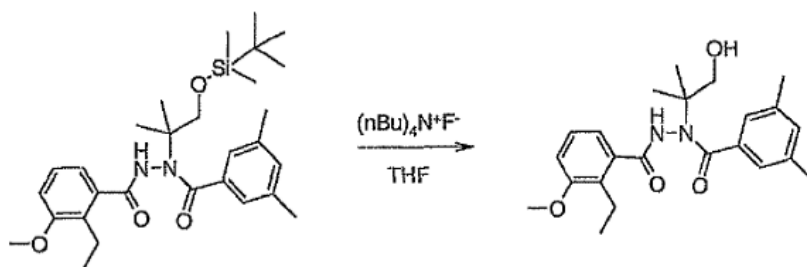


A un matraz de fondo redondo de 200 ml se añadieron 4,62 g (0,0095 mol) de éster bencílico de ácido N'-[(2-terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazincarboxílico, 100 ml de CH₂Cl₂ seco, 2,5 g de Et₃N y 1,66 g (0,0143 mol) de Et₃SiH. La mezcla de reacción se enfrió en un baño helado y después se añadieron 100 mg de acetato de paladio en 3 porciones durante 30 min. La reacción se dejó calentarse después a temperatura ambiente. Ya que la TLC no indicó producto, solamente el material de partida (acetato de etilo/hexano al 20 %, R_f 4,3), la reacción se calentó suavemente con una pistola de calor y después se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La TLC indicó el producto (acetato de etilo/hexano al 20 %, R_f 0,43).

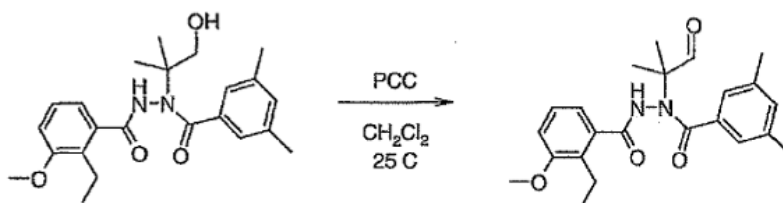
La mezcla de reacción se agitó con algo de MgSO₄ y después se filtró. La torta de filtrado se lavó después con CH₂Cl₂. La fracción de CH₂Cl₂ total se agitó con NH₄Cl saturado, después con H₂O. El CH₂Cl₂ se secó y se evaporó para producir 3,78 g de N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. El producto se purificó por cromatografía en columna, eluyó con acetato de etilo/hexano al 5-10 %. Las fracciones de producto se combinaron, se concentraron y se colocaron en un horno de vacío caliente (50 °C) para producir 2,96 g de N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico sólida. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,0 (s, 2H), 6,9 (s, 1H), 3,80 (s, 2H), 2,23 (s, 6H), 1,40 (s, 6H), 0,82 (s, 9H), 0,08 (s, 6H).



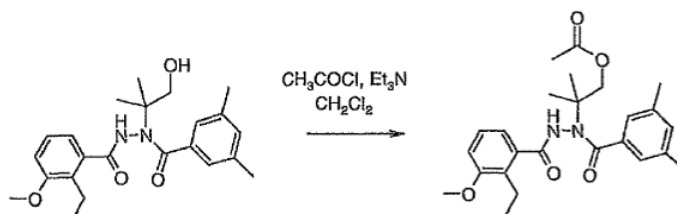
En un matraz de fondo redondo de 250 ml se añadieron 3,71 g (0,010 mol) de N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico y 50 ml de CH_2Cl_2 . Se añadieron 2,11 g (0,106 mol) de cloruro de 2-etil-3-metoxibenzoilo y una solución de K_2CO_3 (4,15 g en 20 ml de H_2O). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y la capa acuosa se extrajo dos veces con 50 ml de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó y se concentró para dar 5,52 g de un producto tipo jarabe. El producto se purificó por cromatografía en columna, eluyendo en acetato de etilo en hexano al 10 %. Se logró purificación adicional triturando el producto con heptano, colocando la mezcla en el congelador y después decantando la solución amarilla o bien el método más preferido para filtrar rápidamente a través de un filtro Büchner frío durante 1-2 horas para obtener un producto sólido blanco, N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(3,5-dimetil-benzoil)hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico (2,9 g). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,0-6,8 (m, 5H), 6,2 (d, 1H), 4,1 (d, 1H), 3,69 (s, 3H), 3,5 (d, 1H), 2,19 (s, 6H), 1,62 (s, 3H), 1,40 (s, 3H), 0,9 (t, 3H), 0,76 (s, 9H).



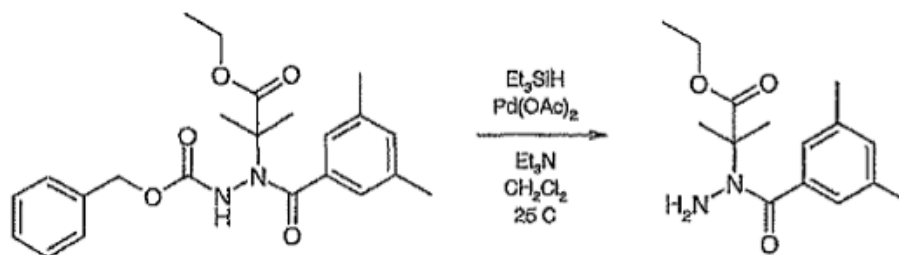
Se disolvieron 2,78 g (0,00526 mol) de N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(3,5-dimetil-benzoil)hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico en 24 ml de THF. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 6,0 ml (0,006 mol) de una solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5-6 horas y después se añadieron 100 ml de Et_2O y la mezcla de reacción se vertió en agua helada en un embudo separador. La capa acuosa se extrajo adicionalmente dos veces con 25 ml de Et_2O y la capa éter total se secó y se concentró. La TLC del producto mostró un nuevo producto (R_f 0,20) por debajo de algo del material de partida. El producto se purificó por cromatografía, eluyendo con acetato de etilo/hexano al 40-50 % para producir 1,42 g de N'-[1-(2-etil-3-metoxi-fenil)-vinil]-N-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. (Rendimiento del 67 %). TLC: R_f = 0,20. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,1 - 6,8 (m, 5H), 6,0 (d, 1H), 4,3 (d, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,5 (d, 1H), 2,4 (d, 1H), 2,29 (s, 6H), 2,2 (d, 1H), 1,56 (s, 3H), 1,45 (s, 3H), 1,00 (t, 3H).



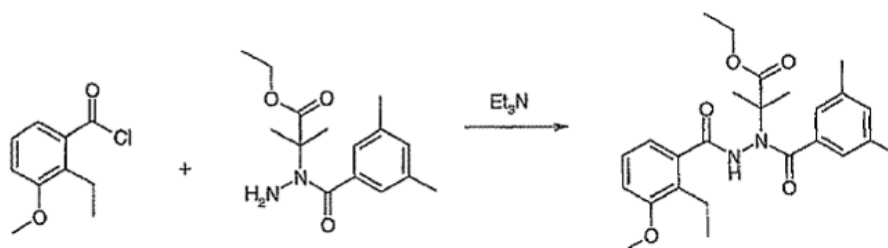
Se disolvieron 1,09 g (0,0027 mol) de N'-[1-(2-etil-3-metoxi-fenil)-vinil]-N-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico en 100 ml de CH_2Cl_2 . Y se añadieron 1,80 g (0,0082 mol) de clorocromato de piridinio. La mezcla de reacción se dejó a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar, la mezcla de reacción total se vertió en una cromatografía en columna en sílice para purificar el producto, N-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-N'-[1-(2-etil-3-metoxi-fenil)-vinil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. Se eluyó un sólido cristalino blanco (1,04 g) con acetato de etilo/hexano al 30-35 %. La TLC indicó pureza alta (> 95 %), R_f = 0,46 (acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 9,6 (s, 1H), 7,15 (s, 2H), 7,1 (m, 2H), 6,9 (d, 1H), 6,3 (d, 1H), 3,806 (s, 3H), 2,304 (s, 6H), 2,2-2,4 (m, 2H), 1,576 (s, 3H), 1,429 (s, 3H), 1,01 (t, 3H).



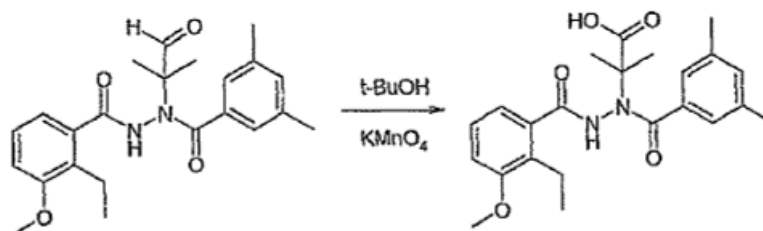
En un vial de 20 ml se añadieron 55 mg de N'-[1-(2-etil-3-metoxi-fenil)-vinil]-N-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico, 2 ml de CH₂Cl₂ y 200 mg de Et₃N. La mezcla de reacción se agitó y después se añadieron 17 mg de cloruro de acetilo. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se calentó a 40 °C durante 30 min. Después de enfriar, se añadió más CH₂Cl₂ y después se transfirió a un embudo separador y se agitó con K₂CO₃ diluido. La capa de CH₂Cl₂ se secó con MgSO₄. La TLC mostró una mancha principal en R_f 38. El producto se limpió por cromatografía eluyendo con acetato de etilo en hexano al 30 %. Esto produjo aproximadamente 40 mg de éster 2-[N-(3-dimetil-benzoil)-N'-[1-(2-etil-3-metoxi-fenil)vinil]-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,1 - 6,8 (m, 6H), 6,1 (d, 1H), 4,7 - 4,4 (q, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,29 (s, 6H), 2,12 (s, 3H), 1,75 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 0,98 (t, 3H).



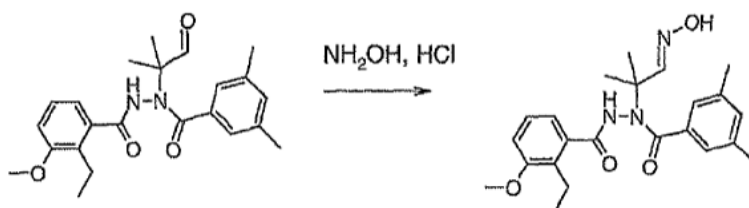
En un matraz que contiene 1,5 g (0,0036 mol, puro al 80 %) de éster etílico de ácido 2-[N'-benciloxicarbonil-N-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico, se añadieron 20 ml de CH₂Cl₂ seco, 1,5 ml de Et₃N y 1,27 g (0,010 mol) de Et₃SiH. Mientras se agitaba. Se añadieron pequeñas porciones de un total de 0,010 g de Pd(OAc)₂ y la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se añadieron 100 ml de CH₂Cl₂ y algo de MgSO₄ para ayudar a la filtración/retirada del producto de Pd. La solución de CH₂Cl₂ se agitó con NH₄Cl saturado, CH₂Cl₂ seco y se evaporó para producir 1,61 g de éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico. El producto se purificó por cromatografía, elución con acetato de etilo en hexano al 21-24 %. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,045 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 4,4 (s, 2H), 2,324 (s 6H), 2,236 (s, 3H), 1,487 (s, 6H).



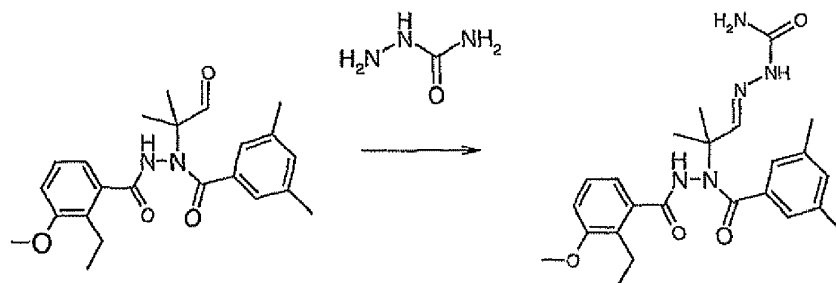
A un matraz que contenía 1,6 g (0,0057 mol) de éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico en 30 ml de CH₂Cl₂ se añadieron 3,5 g de Et₃N y 1,20 g (0,0060 mol) de cloruro de 2-etil-3-metoxibenzoilo. La mezcla de reacción se dejó a reflujo durante 3 horas y después se evaporó hasta sequedad. El residuo se redisolvió con 100 ml de CH₂Cl₂ y se extrajo dos veces con K₂CO₃ diluido. El extracto de CH₂Cl₂ se secó y se evaporó hasta un residuo, que después se trituró con Et₂O al 6 % en hexano. Un producto sólido blanco, éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico, se filtró y se secó en un horno de vacío caliente (50 %). TLC: producto, R_f = 0,40, material de partida, R_f = 0,35, acetato de etilo: hexano 1:1. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,70 (s, 1H), 7,2 - 6,8 (m, 5H), 6,2 (d, 1H), 4,2 (q, 2H), 3,801 (s, 3H), 2,4 (q, 2H), 2,291 (s, 6H), 1,882 (s, 3H), 1,557 (s, 3H), 1,291 (t, 3H), 1,036 (t, 3H).



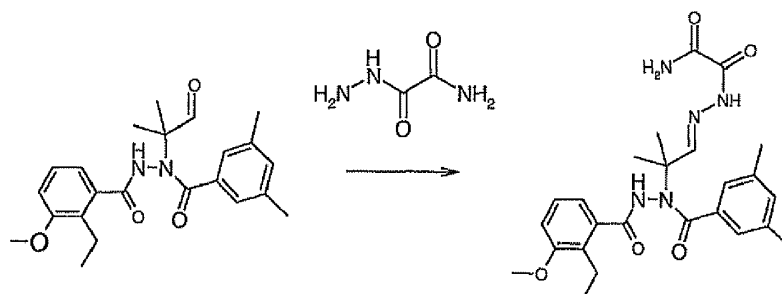
Se preparó ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico por oxidación de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico con KMnO₄. El éster correspondiente no podía saponificarse hasta el ácido mostrado, incluso con NaOH/CH₃OH al 40 % o NaOH acuoso al 50 % + EtOH a reflujo.



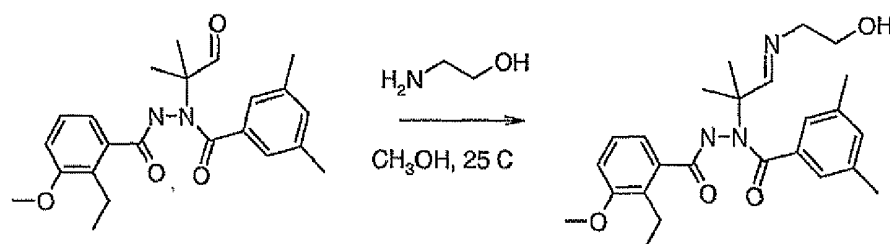
Se pesaron 50 mg (0,000126 mol) de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico en un vial de 20 ml. Después se añadieron 20 mg de hidroxiamina-HCl disueltos en 0,5 ml de CH_3OH . Se añadieron 40 mg de trietilamina y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad con N_2 , se re-disolvió con 5 ml de CH_2Cl_2 y 5 ml de $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ 0,1 N. Se separó la capa de CH_2Cl_2 . La TLC mostró el producto, N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico, tenía un R_f de 0,27 (acetato de etilo: hexano 1:1) y era aproximadamente un 85 % puro. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,1-6,8 (m, 5H), 6,2 (d, 1H), 3,79 (s, 3H), 2,29 (s, 6H), 1,76 (s, 3H), 1,65 (s, 3H), 0,98 (t, 3H).



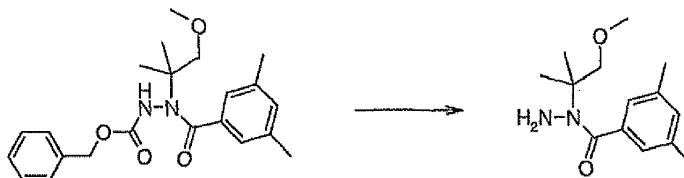
50 mg de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico, 40 mg de semicarbazida, 40 mg de Et_3N y 2 ml de CH_3OH se dejaron a reflujo durante 2 horas, se concentraron hasta sequedad, se redisolieron con CH_2Cl_2 y se diluyeron con HCl (0,5 N). El extracto de CH_2Cl_2 se secó y se evaporó para dar la semicarbazida de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,4-6,8 (m, 5H), 6,2 (d, 1H), 3,767 (s, 3H), 2,203 (s, 6H), 1,717 (s, 3H), 1,474 (s, 3H), 0,913 (t, 3H).



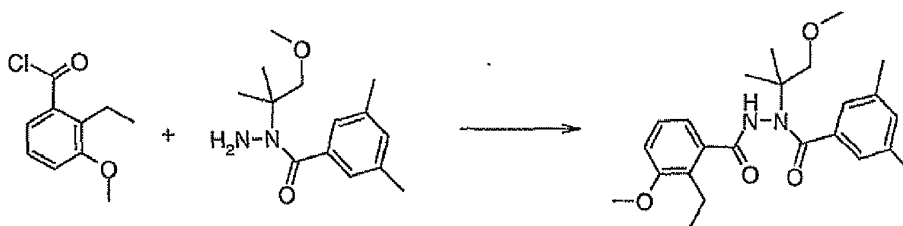
50 mg de aldehído de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico, 2 ml de CH_3OH , 0,5 ml de una solución de ácido acético glacial al 0,5 % con CH_3OH y 26 mg de hidrazida oxámica y 40 mg de Et_3N se dejaron a reflujo durante 2 horas. Los disolventes se retiraron en un evaporador y el residuo se redisolvió con CH_2Cl_2 y agua. El extracto de CH_2Cl_2 se secó y se evaporó. La TLC mostró la presencia del producto, la carbazida oxámica de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico, que tenía un R_f de 0,50 mientras que el aldehído de partida tenía un R_f de 0,74 (en acetato de etilo al 100 %). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8,1 (s 1H), 7,1-6,8 (m, 6H), 6,1 (d, 1H), 3,667 (s, 3H), 2,3 (m, 1H), 2,19 (s, 6H), 2,00 (m, 1H), 1,581 (s, 3H), 1,511 (s, 3H), 0,802 (t, 3H).



50 ml de N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico se añadieron a un matraz de 20 ml, con 45 g de aminoetanol en 2 ml de CH₃OH y después se dejaron a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar, el CH₃OH se retiró en el evaporador y el residuo se cromatografió. El producto N'-[1-(2-etil-3-metoxi-fenil)-vinil]-N-(2-hidroximetoxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico se eluyó con acetato de etilo/hexano al 40 %. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,2-6,9 (m, 5H), 4,1 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,7 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 2,338 (s, 6H), 1,36 (s, 3H), 1,21-1,87 (m, 6H).



A un matraz que contiene 0,94 g (0,002 mol) de éster bencílico de ácido metil éter N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil).hidrazincarboxílico, se añadieron 10 ml de CH₂Cl₂, 0,87 g de Et₃SiH, 0,10 g de acetato de paladio y 1 g de Et₃N. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 horas. Se añadió más CH₂Cl₂ (10-20 ml) y la mezcla se filtró para retirar el paladio. La solución de CH₂Cl₂ marrón se trató con MgSO₄ y carbón, después se filtró y se evaporó. La evaporación produjo 0,87 g de un sólido rojo oleaginoso. La TLC indicó la presencia del producto; R_f = 0,44 en acetato de etilo: hexano 1:1. El producto se purificó por cromatografía, eluyó con acetato de etilo/hexano al 19-20 % para producir 401 mg (80 %) de producto N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,1 (s, 2H), 7,0 (s, 1H), 3,682 (s, 2H), 3,377 (s, 3H), 2,319 (s, 6H), 1,495 (s, 3H).



A un vial de 20 ml que contiene 90 mg de N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico 1462 mg (0,00036 mol), se añadieron 2 ml de CH₂Cl₂, 145 mg (0,00072 mol) de cloruro de 2-etil-3-metoxibenzoilo, 0,5 K₂CO₃ en 3 ml de H₂O. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador con 10 ml de K₂CO₃ y 50 ml de CH₂Cl₂. El extracto de CH₂Cl₂ se secó y se evaporó hasta sequedad. El producto, N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico, se purificó por cromatografía, eluyendo con acetato de etilo en hexano al 25 % para producir 105 mg. TLC: R_f = 0,44 (acetato de etilo: hexano 1:1). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7,8 (s, 1H), 7,1-6,8 (m, 5H), 6,2 (d, 1H), 4,0 (d, 1H), 3,84 (d, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,387 (s, 3H), 2,27 (s, 6H), 2,4-2,1 (m, 2H), 1,728 (s, 3H), 1,503 (s, 3H) 0,98 (t 3H).

1.49 Preparación del Compuesto RG-101494

La N-(5-etil-1,4-benzodioxan-6-carbonil)-N'-(terc-butil)-N'-(3-cloro-5-metilbenzoil)hidrazina puede prepararse de acuerdo con la Patente de EE.UU. N.º 5.530.028. Brevemente, el producto del Ejemplo 17 se trata por el método del Ejemplo 5 y después el método del Ejemplo 8. El producto resultante se trata con cloruro de 3-metil-5-clorobenzoilo [(K. Knoevenagel, Chemische Berichte 28: 2045 (1895); Sloodmaekers; P. J., Verbeerst, R., Bull. Soc. Chm. Belg. 77: 273-285 (1968))] de acuerdo con el método del ejemplo 9.

1.50 Preparación del Compuesto RG-102240

La N-(3-metoxi-2-etilbenzoil)-N'-(3,5-dimetilbenzoil)-N'-terc-butilhidrazina puede prepararse de acuerdo con el Ejemplo 12 de la Patente de EE.UU. N.º 5.530.028.

1.51 Preparación del Compuesto RG-102317

La N-(5-metil-1,4-benzodioxan-6-carbonil)-N'-(terc-butil)-N'-(3,5-dimetilbenzoil)hidrazina puede prepararse de acuerdo con el Ejemplo 3 de la Patente de EE.UU. N.º 5.530.021.

1.52 Preparación del Compuesto RG-115092

La N-(5-metil-1,4-benzodioxan-6-carbonil)-N'-(2-ciano-2-propil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)hidrazina puede prepararse por un método directamente análogo a los Ejemplos 802 y 809 de la Patente de EE.UU. N.º 5.117.057

pero usando N-5-metil-1,4-benzodioxan-6-carbohidrazina (para la preparación véase la Patente de EE.UU. N.º 5.530.021, Ejemplo 2) y cloruro de 3,5-metoxi-4-metilbenzoilo.

1.53 Preparación del Compuesto RG-115575

La N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico puede prepararse por analogía al Ejemplo 11 de la Patente de EE.UU. N.º 5.530.021, pero usando cloruro de 3,4,5-trifluorobenzoilo.

1.54 Preparación del Compuesto RG-115637

La N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico puede prepararse por analogía al Ejemplo 3 de la Patente de EE.UU. N.º 5.530.021, pero usando cloruro de 3,5-dimetoxi-4-metilbenzoilo.

EJEMPLO 2: DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y DE TRANSPORTE

2.1 Determinación de LC logP (experimental)

Se preparan soluciones 1000 ppm para cada uno de un conjunto de patrones de logP (compuestos para los que el logP se conoce experimentalmente; véase la Tabla 3) y para cada compuesto de ensayo. Los tiempos de retención (RT) de la cromatografía líquida se miden para cada sustancia usando las condiciones descritas a continuación. Se deriva una ecuación lineal con respecto a los RT a los logP que se desarrolla a partir de los datos de los patrones de logP. El logP para el compuesto de ensayo se calcula a partir de la ecuación de logP/tiempo de retención.

Condiciones cromatográficas:

Columna: MetaChem Polaris A-18 3u 50 x 3,0 mm; n.º parte C2001-050x030

Gradiente de disolvente:	tiempo (min)	metanol (%)	agua (%)
	0,0	25	75
	7,0	99	1
	8,0	25	75

Temperatura (°C): 30

Tipo de Detector: UV o DAD (detector de matriz de diodos): 200-220 nm

2.2 Determinación de C logP

CLogP puede calcularse de acuerdo con cálculos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. Corwin Hansch, Albery Leo, American Chemical Society, Washington, D.C., 1995.

2.3 Determinación de la solubilidad en agua

Se preparan por triplicado soluciones acuosas como sigue: se añaden 50 µl de una solución 10.000 ppm (2.000 µg de sólidos disueltos en 200 µl de metanol) del sustrato en metanol o en DMSO a 1 ml de agua desionizada en un vial de 7,5 ml (2 dram) o más pequeño con agitación magnética. La agitación se continúa durante toda la noche a temperatura ambiente. La suspensión se toma con una jeringa con una punta luer. Los contenidos se pasan a través de un filtro Acrodisc nuevo de 13 mm 0,2 µM (Tuffryn o fibra de vidrio) en una botella de inyector automático. Para la preparación de las soluciones patrón de calibrado: se prepararon diluciones de la solución 10.000 ppm se prepararon a 10, 5, 1, 0,5 y 0,2 ppm. La solubilidad en agua de la mayoría de diacilhidrazinas cae dentro de este intervalo de concentración. Para materiales más solubles, es preferible la dilución de las muestras en este intervalo para aumentar el intervalo de calibrado debido a que la no linealidad de la respuesta da como resultado curvas de calibrado menos útiles. Sin embargo se requiere un viraje en el intervalo de los patrones de calibrado para compuestos muy insolubles.

Después se realizó la cromatografía de las muestras. Para la mayoría de las diacilhidrazinas las siguientes condiciones fueron adecuadas para la medida. Pueden sustituirse otras columnas y gradientes según sea apropiado.

Columna: MetaChem Polaris A-18 3µ 50 x 3,0 mm; n.º parte C2001-050x030 (o MetaChem Inertsil 5µ ODS3 50 mm x 2,1 mm)

Gradiente de disolvente	tiempo (min)	metanol (%)	agua (%)
	0,00	25	75
	4,50	99	1
	6,00	99	1

Temperatura (°C) 30

El análisis de las muestras de ensayo se lleva a cabo como sigue: Cada réplica de solubilidad se analiza por duplicado. Aunque cualquier método de análisis adecuado es aceptable, estos resultados se obtuvieron por LC/MS en un Micromass Platform II en el modo iónico de electropulverizador negativo usando SIM (monitoreado de ión único). Las curvas patrón se obtienen a partir de inyecciones por duplicado de los patrones. La concentración del sustrato se determina calculando a partir de la ecuación con respecto a la concentración y a la respuesta.

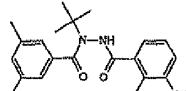
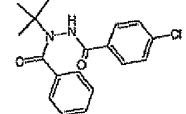
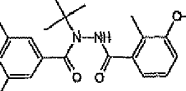
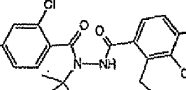
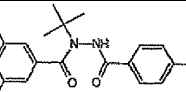
2.4 Determinación de los coeficientes de permeabilidad celular

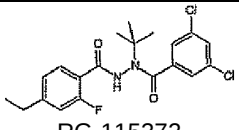
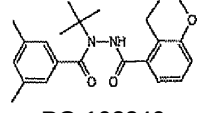
El método para determinar los coeficientes de permeabilidad celular se conoce por los expertos en la materia. MI-QSAR: Predicting Caco-2 Cell Permeation Coefficients of Organic Molecules using Membrane-Interaction QSAR Analysis. Kulkarni, Amit; Han, Yi, Hopfinger, A. J.; Journal of Chemical Information and Computer Sciences (2002) 42: 331-342. La Tabla 2 representa las propiedades físicas y de transporte de los compuestos de la presente invención

Tabla 2: Propiedades físicas y de transporte de los Compuestos

Compuesto	LC LogP (exp)	C logP	Sol. Exp. En agua (μM)	MI-QSAR P(caco2) x10 ⁶ cm/s	MI-QSAR Log BB
RG-115009	1,9	2,19	30,4	NA	NA
RG-115613	2,8	0,82	NA	NA	NA
RG-101523	4,35	4,46	13,4	9,3	-0,63
RG-101382	4,4	4,96	NA	NA	NA
RG-101494	4,3	4,43	NA	NA	NA
RG-102240	4,2	4,18	9,8	11,4	-1,00
RG-102317	3,6	4,21	10,1	0,13	0,13
RG-103309		5,89	2,9	NA	NA
RG-115092	3,5	2,8	NA	NA	NA
RG-115517	3,15	2,68	36,7	0,04	0,04
RG-115575	4,1	4,22	21,6	12	12,0
RG-115637	3,54	3,6	13,7	6,1	6,1
NA = No Evaluado					

Tabla 3: Tiempos de retención (RT) y logP para los patrones de diacilhidrazina

Compuesto	RT (min)	logP
 RG-102208	2,59	2,9
 RG-100864	3,29	3,2
 RG-102398	3,82	3,7
 RG-115002	3,81	3,5
 RG-102125	4,84	4,2

 RG-115372	5,52	5,02
 RG-102240	4,64	4,2

2.5 Solubilidad acuosa

La solubilidad en equilibrio se midió en tampón acuoso a pH 7,4. El tampón se preparó ajustando el pH de una solución de NaH_2PO_4 0,07 M hasta pH 7,4 con NaOH 10 N. El tampón tenía una fuerza iónica de 0,15. Se combinó al menos 1 mg de polvo con 1 ml de tampón para producir una mezcla de ≥ 1 mg/ml. Estas muestras se agitaron durante ≥ 2 horas y se dejaron reposar durante toda la noche a temperatura ambiente. Las muestras se filtraron después a través de un filtro de jeringa de Nylon de 0,45 μm que se saturó primero con la muestra. El filtrado se muestreó dos veces, consecutivamente. El filtrado se evaluó por HPLC frente a los patrones preparados en metanol.

Tabla 4: Solubilidad de los Compuestos

Compuesto	Solubilidad (mg/ml) pH 7,4
RG-115280	0,0012
RG-102125	0,0006
RG-102398	$\leq 0,0002$
RG-100150	$\geq 1,0$
RG-115595	0,026
RG-103309	$\leq 0,0002$
RG-115555	$\geq 1,0$
RG-115199	0,0064
RG-115823	0,0003
RG-101523	0,0010
RG-102240	0,0007
RG-102317	0,0043
RG-115517	0,014
RG-100021	$\geq 1,0$

2.6 Coeficientes de partición

El coeficiente de partición, Log (D), entre 1-octanol saturado con agua y tampón a pH 7,4 se determinó para los compuestos de ensayo. El tampón se preparó como se describe en la sección 2. Una alícuota de 12 μl de una solución madre 10 mM en DMSO se introdujo en un vial que contenía 0,60 ml de octanol y 0,60 ml de tampón a temperatura ambiente. También se añadió testosterona hasta una concentración final de 100 μM como control interno. La solución se colocó en el vórtex durante 60 minutos y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las capas orgánicas y acuosas se retiraron. Se hicieron diluciones seriadas de la capa orgánica con metanol al 50 % excepto la dilución inicial, que se hizo en metanol al 100 %. Las diluciones seriadas de la capa acuosa se hicieron en el tampón a pH 7,4. Las muestras diluidas se evaluaron después por LC/MS para el compuesto así como para testosterona. El Log de la relación de las respuestas de áreas de picos se calculó para obtener el Log (D). Los valores típicos de LogD para la testosterona son de 3,0-3,3.

Tabla 5: Log (D) de los Compuestos

Compuesto	Log(D) Octanol/pH 7,4
RG-115280	3,9
RG-102125	3,2
RG-102398	3,5
RG-100150	-2,1
RG-115595	2,1
RG-103309	3,0
RG-115555	0,0
RG-115199	2,0

Compuesto	Log(D) Octanol/pH 7,4
RG-115823	3,3
RG-101523	2,9
RG-102240	3,4
RG-102317	3,6
RG-115517	2,9
RG-100021	0,8

2.7 Permeabilidad bi-direccional, CACO-2

- 5 Las monocapas Caco-2 se crecieron para confluir en membranas de policarbonato microporosas recubiertas de colágeno en placas Costar Transwell de 12 pocillos. Los detalles de las placas y su certificación se muestran a continuación. El tampón de ensayo de permeabilidad fue Solución Salina Equilibrada de Hank que contenía HEPES 10 mM y glucosa 15 mM a un pH de $7,0 \pm 0,2$. La concentración de solución de dosificación fue 10 μ M en tampón de ensayo. En cada punto de tiempo, 1 y 2 horas, se tomó una alícuota de 200 μ l de la cámara receptora y se reemplazó con tampón de ensayo fresco. Las células se dosificaron en el lado apical (A a B) o en el lado basolateral (B a A) y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % y humedad relativa del 90 %. Cada determinación se realizó por duplicado. Los parámetros experimentales importantes se subrayan a continuación. Se estudió la permeabilidad a través de una membrana libre de células (blanco) para determinar la unión no específica y la difusión libre del compuesto a través del dispositivo. También se midió el flujo de amarillo lucifer para cada monocapa después de someterse a los compuestos de ensayo para asegurar que no se infligió daño a las monocapas celulares durante el periodo de flujo.

Todas las muestras se evaluaron por LC/MS usando ionización por electropulverizado. Las condiciones de LC/MS típicas son como sigue:

Cromatografía líquida

- Columna: Keystone Hypersil BDS C18 30x2,0 mm i.d., 3 μ m, con columna de seguridad.
- 25 Tampón M.P.: Tampón de Formiato de Amonio, pH 3,5
- Reservorio acuoso (A): agua al 90 %, tampón al 10 %
- Reservorio orgánico (B): acetonitrilo al 90 %, tampón al 10 %
- Velocidad de caudal: 300 μ l/min
- 30 Programa de Gradiente (típicamente):

Tiempo	Grad. de la curva	% de A	% de B	TE3	TEA
-0,1	0	100	0	cerca	
1,2	1	60	40		cerca
3,0	1	0	100		
3,1	0	100	0		
4	0	100	0	cerca	

- Tiempo total de funcionamiento: 4,5 min
- 35 Inyector automático: volumen de inyección de 10 μ l
- Lavado del inyector automático: agua/acetonitrilo/2-propanol::1/1/1; con ácido fórmico al 0,2 %

Espectrómetro de masas

- 40 (Condiciones de funcionamiento típicas)

Interfase: Electropulverizador ("Turbo Pulverizador Iónico")

Modo: Monitorizado de Ión Sencillo

45 Gases: Gas nebulizador = 8, Cortina de gas = 10, Gas del turbo pulverizador iónico = 8000 ml/min.

TEM: 350 °C

Voltajes: IS 4500, OR 25, RNG 200, Q0-10, IQ1-12, ST -15, RQ0-12, DF -200, CEM (por edad)

Método: duración de 4,5 minutos.

- 50 La permeabilidad aparente, P_{app} , y el porcentaje de recuperación se calcularon como sigue:

$$\text{Pap} = (\partial C_T / \partial t) \times V_r / (A \times C_0) \quad (1)$$

$$\text{Porcentaje de recuperación} = 100 \times ((V_r \times C_r^{\text{final}}) + (V_d \times C_d^{\text{final}})) / (V_d \times C_0) \quad (2)$$

donde,

5

$(\partial C_T / \partial t)$ es la concentración acumulativa en el compartimento receptor frente al tiempo en M s^{-1} .

V_r es el volumen del compartimento receptor en cm^3 .

V_d es el volumen del compartimento donante en cm^3 .

A es el área de la monocapa celular ($1,13 \text{ cm}^2$ para Transwell de 12 pocillos).

10

C_0 es la concentración de la solución de dosificación en M .

C_r^{final} es la concentración receptora a cumulativa en M al final del periodo de incubación.

C_d^{final} es la concentración del donante en M al final del periodo de incubación.

<u>Placas:</u>	T12pocillos	T12pocillos
Fecha de siembra:	6/11/02 (KW)	6/18/02 (PSK)
Paso:	62	61
Edad (días):	27	22

<u>Certificación</u>			<u>Criterios de aceptación</u>
Valor TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$):	506	504	$450-650 \Omega \cdot \text{cm}^2$
Amarillo Lucifer, Pap x 10^{-6} cm/s :	0,14	0,12	$<0,4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
Atenolol, Pap x 10^{-6} cm/s :	0,20	0,18	$<0,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
Propranolol, Pap x 10^{-6} cm/s :	20	19	$15-25 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$
Digoxina, Pap x 10^{-6} cm/s :	1,7	1,8	ninguno
Digoxina, Pap x 10^{-6} cm/s :	12	16	ninguno

15

Parámetros experimentales

Concentración de dosificación: 10 μM

Réplicas: 2

Dirección: apical a basolateral, basolateral a apical

Puntos de tiempo: 1 y 2 horas

Tabla 6: Recuperación y permeabilidad (10^{-6} cm/s) de los Compuestos

Compuesto	Porcentaje de recuperación ^(C)			Pap ^(D) del blanco	Pap. A a B			Pap. B a A			Potencial de absorción ^(A)	Eflujo Significativo (B)
	Blanco	A a B	B a A		Rep. 1	Rep. 2	Media	Rep. 1	Rep. 2	Media		
RG-115280	41	46	99	1,88	1,24	1,30	1,27	1,50	1,48	1,49	Alto	No
RG-102125	62	84	63	21,9	25,7	26,3	26,0	20,7	19,7	20,2	Alto	No
RG-102398	94	85	90	34,7	27,0	26,8	26,9	25,9	28,2	27,1	Alto	No
RG-100150	117	102	107	36,9	0,19	0,18	0,18	0,33	0,34	0,33	Bajo	No
RG-115595	103	95	104	33,2	19,6	18,9	19,2	29,8	31,7	30,7	Alto	No
RG-103309	70	74	75	23,6	25,2	23,8	24,5	32,5	32,5	32,5	Alto	No
RG-115555	110	98	106	35,8	0,18	0,18	0,18	1,55	1,67	1,61	Bajo	Sí
RG-115199	82	85	87	23,0	31,1	30,2	30,6	31,0	30,9	30,9	Alto	No
RG-115823	77	64	63	24,2	17,4	17,8	17,6	18,8	15,4	17,1	Alto	No
RG-101523	95	95	88	29,4	24,2	26,6	25,4	23,6	25,4	24,5	Alto	No
RG-102240	78	94	87	28,4	32,3	31,4	31,8	23,3	23,7	23,5	Alto	No
RG-102317	87	91	86	27,9	28,6	27,3	28,0	21,0	21,2	21,1	Alto	No
RG-115517	96	91	95	31,6	28,4	29,3	28,8	25,2	27,6	26,4	Alto	No
RG-100021	113	90	94	43,0	0,21	0,22	0,22	0,91	0,95	0,93	Bajo	No

^(A) Clasificación de la absorción potencial:
Pap (A a B) $\geq 1,0 \times 10^{-6}$ cm/s Alto
Pap (A a B) $> 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s, Pap $< 1,0 \times 10^{-6}$ cm/s Medio
Pap (A a B) $< 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s Bajo

^(B) El eflujo se considera significativo si:
Pap (B a A) $\geq 1,0 \times 10^{-6}$ cm/s y Relación Pap (B a A)/Pap (A a B) $\geq 3,0$

^(C) Las bajas recuperaciones provocadas por uniones no específicas, etc. pueden afectar a la permeabilidad medida

^(D) Una velocidad de difusión baja ($< 20 \times 10^{-6}$ cm/s) a través de la membrana libre de la célula indica una carencia de difusión libre, que puede afectar a la permeabilidad medida.

EJEMPLO 3: ENSAYO BIOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS

Los ligandos de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen la terapia génica, la expresión de proteínas de interés en células hospedadoras, la producción de organismos transgénicos y los ensayos basados en células.

Ensayo 27-63Casete de Expresión Génica

GAL4 DBD (1-147)-CfEcR(DEF)/VP16AD-βRXREF-LmUSPEF: Los dominios D, E y F del tipo silvestre del EcR de la larva del pino *Choristoneura fumiferana* ("CfEcR-DEF"; ID de SEC N.º: 1) se fusionaron al dominio de unión al ADN de GAL4 ("Gal4dbd1-147"; ID de SEC N.º: 2) y se colocaron bajo el control de un promotor de fosfoglicerato quinasa ("PGK", ID de SEC N.º: 3). Las hélices 1 a 8 de los dominios EF de RXRβ de *Homo sapiens* ("HsRXRβ-EF"; nucleótidos 1-465 de ID de SEC N.º: 4) y las hélices 9 a 12 de los dominios EF de la Proteína Ultraespiráculo de *Locusta migratoria* ("LmUSP-EF"; nucleótidos 403-630 de ID de SEC N.º: 5) se fusionaron al dominio de transactivación de VP16 ("VP16AD", ID de SEC N.º: 6) y se colocaron bajo el control de un promotor del factor de elongación 1α ("EF-1α"; ID de SEC N.º: 7). Se fusionaron cinco sitios consenso de unión al elemento de respuesta de GAL4 ("5xGAL4RE"; que comprenden 5 copias de un GAL4RE que comprende la ID de SEC N.º: 8) a un promotor mínimo TATA sintético (ID de SEC N.º: 9) y se colocó aguas arriba del gen indicador de la luciferasa (ID de SEC N.º: 10).

Línea celular estable

Las células CHO se transfectaron de forma transitoria con las casetes de transcripción para GAL4 DBD (1-147) CfEcR(DEF) y para VP16AD βRXREF-LmUSPEF controladas por promotores celulares ubicuamente activos (PGK y EF-1α, respectivamente) en un único plásmido. Las células transfectadas de forma estable se seleccionaron por resistencia a Zeocina. Los clones celulares CHO aislados individualmente se transfectaron de forma transitoria con un indicador GAL4 RE-luciferasa (pFR Luc). Se seleccionó el clon 27-63 usando Higromicina.

Tratamiento con ligando

Las células se sometieron a tripsina y se diluyeron hasta una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/ml. Se colocó una suspensión de células de 100 µl en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 24 h. Las soluciones madre de ligando se prepararon en DMSO y se diluyeron 300 veces para todos los tratamientos. Las dosis de respuesta de ensayo consistían en 8 concentraciones que variaban de 33 µM a 0,01 µM.

Ensayo de gen indicador

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

Ensayo Z3Línea celular estable

El Dr. F. Gage proporcionó una población de células transformadas de forma estable que contenían CVBE y 6XEcRE como se describe en Shur, S.T., Gil, E.B., Senut M.C., Gage, F.H. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, 7999-804. Unas células 293 de riñón humanas, también denominadas células HEK-293, se infectaron secuencialmente con vectores retrovíricos que codifican primero la construcción interruptora CVBE y posteriormente la construcción indicadora 6XEcRE LacZ. La construcción interruptora contenía la secuencia codificante para los aminoácidos 26-546 del EcR de *Bombyx mori* (BE) (Iatrou) insertada en marco y aguas abajo del dominio de transactivación de VP16 (VBE). Se colocó un codón de inicio ATG sintético bajo el control del promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CVBE) y se flanqueó por repeticiones terminales largas (LTR). La construcción indicadora contenía seis copias del sitio de unión al elemento de respuesta a ecdisona (EcRE) colocadas aguas arriba de LacZ y flanqueadas en ambos lados con secuencias LTR (6XEcRE).

La dilución de clonación se usó para aislar clones individuales. Los clones se seleccionaron usando 450 µg/ml de G418 y 100 ng/ml de puomicina. Los clones individuales se evaluaron basándose en su respuesta en presencia y ausencia de ligandos de ensayo. El clon Z3 se seleccionó para fines de exploración y SAR.

Las células de riñón humanas 293 transformadas de forma estable con CVBE y 6XEcRE LacZ se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo (Mediate, 10-020-CV) que contienen FBS al 10 % (Life Technologies, 26140-087), 450 goma G418 (Mediate, 30-234-CR) y 100 goma promising (Sigma, P-7255), a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 5 % y se subcultivaron cuando alcanzaron el 75 % de confluencia.

Tratamiento con ligando

Las células Z3 se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración de $2,5 \times 10^3$ células por pocillo y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante veinticuatro horas. Las soluciones madre de ligando se prepararon en DMSO. Las soluciones madre de ligando se diluyeron 100 veces en medios y se añadieron a las células 50 µl de esta solución de ligando diluida (33 µM). La concentración final de DMSO se mantuvo al 0,03 % tanto en los controles como en los tratamientos.

Ensayos de gen indicador

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

Se muestra en la Figura 2 un esquema de la construcción interruptora CVBE y la construcción indicadora 6XEcRE LacZ. Ambas construcciones están flanqueadas por repeticiones terminales largas, G418 y puromicina son los marcadores seleccionables, CMV es el promotor del citomegalovirus, VBE es la secuencia codificante para los aminoácidos 26-546 del 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 la enzima indicadora β-galactosidasa.

Ensayo 13B3Casete de Expresión Génica

GAL4 DBD-CfEcR(DEF)/VP16AD-MmRXRE: Los dominios D, E y F del tipo silvestre del EcR de la larva del pino *Choristoneura fumiferana* ("CfEcR-DEF"; ID de SEC N.º: 1) se fusionaron al dominio de unión al ADN de GAL4 ("Gal4DBD1-147"; ID de SEC N.º: 2) y se colocaron bajo el control del promotor SV40e del vector pM (PT3119-5, Clontech, Palo Alto, CA). Los dominios D y E del RXR de *Mus musculus* ("MmRXR-DE"; ID de SEC N.º: 11) se fusionaron al dominio de transactivación de VP16 ("VP16AD"; ID de SEC N.º: 6) y se colocaron bajo el control del promotor SV40e del vector pVP16 (PT3127-5, Clontech, Palo Alto, CA).

Línea celular estable

Las células CHO se transfectaron de forma transitoria con las casetes de transcripción para GAL4 DBD-CfEcR(DEF) y para VP16AD-MmRXRE controladas por promotores SV40e. Las células transfectadas de forma estable se seleccionaron usando Higromicina. Los clones celulares CHO aislados individualmente se transfectaron de forma transitoria con un indicador GAL4 RE-luciferasa (pFR Luc, Stratagene, La Jolla, CA). Se seleccionó el clon 13B3 usando Zeocina.

Tratamiento con ligando

Las células se sometieron a tripsina y se diluyeron hasta una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/ml. Se colocó una suspensión de células de 100 µl en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 24 h. Las soluciones madre de ligando se prepararon en DMSO y se diluyeron 300 veces para todos los tratamientos. Las dosis de respuesta de ensayo consistían en 8 concentraciones que variaban de 33 µM a 0,01 µM.

Ensayo de gen indicador

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

Los resultados de los ensayos se muestran en las Tablas 7 y 8. Cada ensayo se llevó a cabo en dos pocillos separados y se hizo la media de los dos valores. El número de veces de inducción se calculó dividiendo las unidades de luz relativas ("RLU") en las células tratadas con ligando con RLU en las células tratadas con DMSO. Las EC₅₀ se calcularon a partir de datos de dosis de respuesta usando un modelo logístico de tres parámetros. La FI Máx relativa se determinó como el número de veces de inducción del ligando ensayado (una realización de la descripción) observado a cualquier concentración con respecto al número de veces la inducción máxima del ligando GS™-E (N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetilbenzoico) observado a cualquier concentración.

ES 2 566 366 T3

Tabla 7: Resultados de los ensayos biológicos para los Compuestos: número de veces de inducción

Compuesto	Ensayo 13B3 3,3 μ M	Ensayo 13B3 33 μ M	Ensayo 27-63 3,3 μ M	Ensayo 27-63 33 μ M	Ensayo Z3 3,3 μ M	Ensayo Z3 33 μ M
RG-100021		0				1
RG-100127		365	49	1239		245
RG-100150		1				1
RG-100216		8037	53	1312		398
RG-100342		611	2	1287		427
RG-100360	1111	745	1627	1353	870	891
RG-100394		178			1339	11
RG-100425		747	1156	1099	1128	592
RG-100448		2	66	847		423
RG-100492		1002	4	1378		143
RG-100524		1211			991	146
RG-100568	2	4122	615	2286	276	1193
RG-100569	1710	329	884	841	754	457
RG-100574		0	151	21		389
RG-100603		570				453
RG-100620		13982			710	428
RG-100667		1191			1480	238
RG-100690	1094	500	1136	1047	779	475
RG-100691		643	1378	1209	843	565
RG-100694	3385	2078	1057	1004	1294	1288
RG-100698		434			1089	591
RG-100699		2296	398	1413		415
RG-100725		581	1096	1050		511
RG-100749	0	288			874	145
RG-100763		2442	107	1609		151
RG-100764		3814			915	369
RG-100766		391	931	1993	921	474
RG-100767	4504	682	2097	2171	825	371
RG-100768		709	1738	1852	1246	425
RG-100769	1014	386	1595	1556	1096	542
RG-100778		2344	2159	2312		365
RG-100779		2979			947	304
RG-100801		16	1341	1244		153
RG-100812		202			1587	399
RG-100814	423	1151	2441	2165	410	1279
RG-100848	3391	578	1181	1151	885	26
RG-100864	318	187	1	1184	63	840
RG-100875	23	1143	34	1592	1006	1081
RG-100901		882			1527	185
RG-100915	133	525			532	1292
RG-100929		359	1080	988		490
RG-101013	1084	406	927	988	1039	846
RG-101016		4693	308	1347		394

ES 2 566 366 T3

Compuesto	Ensayo 13B3 3,3 μ M	Ensayo 13B3 33 μ M	Ensayo 27-63 3,3 μ M	Ensayo 27-63 33 μ M	Ensayo Z3 3,3 μ M	Ensayo Z3 33 μ M
RG-101036	4582	908	1721	1459	767	404
RG-101036	4582	908	1721	1459	767	404
RG-101048		701	19	1453		283
RG-101057	33	842	30	1008	632	930
RG-101062		319			1127	391
RG-101088		1400	6	1743		302
RG-101171		8453	395	1357		268
RG-101178		699			1200	431
RG-101202	5	7			195	1
RG-101218		1983	1097	1223	886	398
RG-101248		415	146	1033		375
RG-101312		1874			600	292
RG-101316		1280			1045	350
RG-101340	675	879	1624	1549	866	432
RG-101353	1347	718	3583	3835	530	439
RG-101376	25656	7393			1293	415
RG-101382	13058	1012	2704	2568	725	426
RG-101398		159			1138	403
RG-101408		326	2445	1886	780	398
RG-101494	755	613	717	294	832	384
RG-101509		1144			1303	328
RG-101511	1912	744	1421	1207	947	487
RG-101523	831	718	2427	2745	704	596
RG-101528	259	3027			748	1515
RG-101531		274			1130	428
RG-101542		439			1151	324
RG-101585		1015	154	1495		330
RG-101659	1556	1185	2283	1896	954	876
RG-101664	1	0			6	1
RG-101670	2297	738			1190	929
RG-101691	5245	630	2249	2073	654	1089
RG-101692	4180	170	1798	591	435	860
RG-101734	918	442			987	951
RG-101759	623	137			796	158
RG-101774	987	526	1807	1359	631	429
RG-101862	3279	293			717	250
RG-101863	3187	207	1705	636	832	374
RG-101864	5959	349	1807	1464	796	494
RG-101887	2462	542	1142	1107	1004	334
RG-101889		378			1085	245
RG-102021	4081			2951	417	
RG-102125	762	315	1164	1043	359	473
RG-102125	762	315	1164	1043	359	473
RG-102317	2425	814	2551	2504	416	1501

ES 2 566 366 T3

Compuesto	Ensayo 13B3 3,3 μ M	Ensayo 13B3 33 μ M	Ensayo 27-63 3,3 μ M	Ensayo 27-63 33 μ M	Ensayo Z3 3,3 μ M	Ensayo Z3 33 μ M
RG-102398	8125	795	2875	3181	535	1972
RG-102408	25				249	
RG-102592	194	909	7	1265	746	574
RG-103309	924	95	2537	1201	1155	591
RG-103361	504	2262			171	244
RG-103451	576	661	3326	3865	67	118
RG-104074	544	5378			189	200
RG-115006	4180	3146			415	1071
RG-115009	19	2547			35	472
RG-115025	8	1700	2288	2243	269	489
RG-115033	386	12	2	1256	24	388
RG-115038	4119	4970			600	321
RG-115043	835	547			466	1588
RG-115046		1076	18	1069		754
RG-115050	2027	894			424	1446
RG-115055	1356	1350	4499	2725	573	617
RG-115064	2	415			1	3
RG-115065		880	859	1095		878
RG-115068	2828	1500			54	802
RG-115077	932	199			294	
RG-115085		236	1143	1149		627
RG-115086					433	
RG-115088	542	1048			561	228
RG-115092	2322	2409	2869	3106	351	302
RG-115095						
RG-115102	1425	109	1154	971	88	865
RG-115106					68	
RG-115112					618	
RG-115116	2				276	
RG-115118	979	769	1063	914	90	1160
RG-115128					110	
RG-115130	987	511	4436	4096	412	930
RG-115143	1	2032	59	1736	111	1045
RG-115162	755	320	1814	1464	334	772
RG-115167					73	
RG-115169	405				443	
RG-115171						
RG-115191	3				386	
RG-115199					349	
RG-115199					349	
RG-115207	7260	7959	1332	1279	354	508
RG-115220	5	1143			298	
RG-115223	8	3437	273	1935	323	1299
RG-115229	599	709	2829	1423		1032

ES 2 566 366 T3

Compuesto	Ensayo 13B3 3,3 μ M	Ensayo 13B3 33 μ M	Ensayo 27-63 3,3 μ M	Ensayo 27-63 33 μ M	Ensayo Z3 3,3 μ M	Ensayo Z3 33 μ M
RG-115244	2404	573	2203	1847	283	816
RG-115253		471	848	910		832
RG-115256					647	
RG-115257	820	354	1130	1320	297	691
RG-115258	144	3745	1973	2212	382	1120
RG-115259	3513	2981			91	
RG-115260		13				526
RG-115261					31	
RG-115269					112	
RG-115278	1950	1050	1250	906	158	1225
RG-115280		0	9	422		376
RG-115280		0	9	422		376
RG-115297	1364	304	1544	946	443	604
RG-115302	521	648	940	815		404
RG-115306					5	
RG-115310	2	3044			199	960
RG-115311						
RG-115327		3785			279	325
RG-115329		5644			259	430
RG-115330	1995	3577			633	432
RG-115337	631	1010	1080	1053		682
RG-115350	450				499	
RG-115352					7	
RG-115378	1778	2424	1493	1407	488	1464
RG-115384	2753	2277	1713	1282	337	
RG-115407	2476	2612	1611	1515	391	879
RG-115416	3618	2737	2412	1867	164	1116
RG-115422					204	
RG-115429	18	1843			3	1724
RG-115441					118	
RG-115443						
RG-115480						
RG-115496					874	
RG-115499	1182	731	2092	1536	173	641
RG-115508	310	191	1195	969	199	680
RG-115514	4009	515	1616	1427	383	658
RG-115515		1996			1306	420
RG-115517	8397	11953			408	
RG-115517	8397	11953			408	
RG-115518	1644	926	1640	1126	232	803
RG-115532	908	738			530	
RG-115534		211			168	249
RG-115536	483				488	
RG-115539	20	592	1076	534		339

ES 2 566 366 T3

Compuesto	Ensayo 13B3 3,3 μ M	Ensayo 13B3 33 μ M	Ensayo 27-63 3,3 μ M	Ensayo 27-63 33 μ M	Ensayo Z3 3,3 μ M	Ensayo Z3 33 μ M
RG-115550	1	0				21
RG-115551		290	1150	1068		470
RG-115555					1	
RG-115557					426	
RG-115567						
RG-115575	3085	865			282	785
RG-115580		298	1104	1031		615
RG-115592						
RG-115595	6	1381			44	1067
RG-115595	6	1381			44	1067
RG-115609	558	4217			90	383
RG-115611					745	
RG-115613	180	1726			991	1469
RG-115625	3	715			265	1559
RG-115627	1291	10058			378	362
RG-115637	1109	636	4159	2741	211	
RG-115647	2169	98	817	815	96	510
RG-115648					9	
RG-115664	1363	333	1928	1768	209	620
RG-115674	442				319	
RG-115683						
RG-115684		151				498
RG-115689					13	
RG-115690	930				571	
RG-115716	3	0				66
RG-115717	0	0				9
RG-115718	0	2				0
RG-115719	0	1				271
RG-115721	0	0				2
RG-115722	0	0				1
RG-115723	0	0				17
RG-115819			1970	2371	1433	722
RG-115820			2861	1971	1413	701
RG-115823			2093	1025	1440	1050
RG-115824			2675	948	895	737
RG-115829			2605	45	1441	319
RG-115830			2287	353	1604	983
RG-115831			2063	1435	1481	544
RG-115832			2063	1435	1564	621
RG-115834			1900	1837		
RG-115835			3	1895		
RG-115836			1822	823		
RG-115837			1474	1156		
RG-115840			1612	263		

ES 2 566 366 T3

Compuesto	Ensayo 13B3 3,3 μ M	Ensayo 13B3 33 μ M	Ensayo 27-63 3,3 μ M	Ensayo 27-63 33 μ M	Ensayo Z3 3,3 μ M	Ensayo Z3 33 μ M
RG-115841			1407	437		
RG-115842			1269	447		
RG-115846			1643	645		
RG-115847			2729	848		
RG-115848			1346	1156		
RG-115849			1	231		
RG-115850			1	23		
RG-115856				1760		
RG-115857				328		
RG-115858				182		
RG-115859				1056		
RG-115861			8	593		
RG-115862			1	243		
RG-115863			1	804		
RG-115864				1255		
RG-115865				76		
RG-115866				3		
RG-115867				654		
RG-115003	0	301				1276
RG-115044	0	1	1	2	1	7
RG-115079	3	0			1	0
RG-115091		1				61
RG-115117	1			221	7	
RG-115160	3	3			3	157
RG-115172	1	0			1	216
RG-115225	3	8			3	571
RG-115358	1	584			33	769
RG-115371	1	1092			249	1774
RG-115408	1	0			1	3
RG-115490	2	844			123	814
RG-115497	1	0			1	20
RG-115511	1	98	1	1155	10	570
RG-115597	0	4667	2	2065		942
RG-115653	6	0	1	832		666
RG-115665	1	0	2	0	6	74
RG-115783	3	2765				1362

Tabla 8: Resultados de los ensayos biológicos para los Compuestos: FI máx con respecto a EC50

Compuesto	EC50 13B3 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 13B3	Ensayo 27-63 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 27-63	Ensayo Z3 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo Z3
RG-100127			6,704	0,689	4,677	
RG-100216			6,972	0,685	1,778	
RG-100342			17,694	0,674	10,233	
RG-100360	0,588	0,825	0,615	0,873	0,257	1,073
RG-100394					1,223	
RG-100425			0,370	0,671	0,099	1,180

ES 2 566 366 T3

Compuesto	EC50 13B3 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 13B3	Ensayo 27-63 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 27-63	Ensayo Z3 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo Z3
RG-100448			5,288	0,609	2,818	
RG-100492			11,757	0,916	8,128	
RG-100524					0,263	1,002
RG-100568	44,284	1,035	4,132	1,197	3,311	0,855
RG-100569	0,185	0,773	0,287	0,720	0,098	0,835
RG-100574			4,000	0,371	1,122	
RG-100620					2,399	0,869
RG-100667					0,347	0,890
RG-100690	0,268	0,506	0,200	0,727	0,240	1,008
RG-100691			0,330	0,863	0,257	0,945
RG-100694	0,405	0,632	0,400	0,767	0,389	1,157
RG-100698					1,000	1,025
RG-100699			3,963	0,939	2,089	
RG-100725			0,330	0,726		
RG-100749					2,692	0,951
RG-100763			5,301	0,856	2,138	
RG-100764					2,344	0,900
RG-100766			3,419	0,944	0,174	1,194
RG-100767	1,056	0,920	0,334	1,218	0,251	0,996
RG-100768			0,333	1,039	0,214	1,129
RG-100769	0,337	0,685	0,196	0,735	0,219	1,109
RG-100778			0,678	1,342	0,513	1,000
RG-100779					0,178	0,707
RG-100801			2,076	0,936	0,891	
RG-100812					0,912	0,954
RG-100814	37,888	0,843	1,500	1,157	1,148	
RG-100848	1,645	0,666	0,322	0,765	0,240	0,996
RG-100864	1,155		17,269	0,716	2,239	
RG-100875	4,019	0,853	8,920	1,004	2,042	0,818
RG-100901					0,316	0,918
RG-100915	4,449	0,552			1,000	0,912
RG-100929			1,047	0,770	0,631	
RG-101013	2,256	0,539	2,140	0,606	1,479	0,720
RG-101016			4,201	0,703	1,995	
RG-101036	0,223	0,545	0,177	0,724	0,054	1,049
RG-101036	0,223	0,545	0,177	0,724	0,054	1,049
RG-101048			8,415	0,708	19,055	
RG-101057	4,970	0,569	6,617	0,648	4,467	0,697
RG-101062					2,570	0,992
RG-101088			9,947	1,159	4,074	
RG-101171			4,019	0,877	3,236	
RG-101178					1,318	0,887
RG-101202	0,369	0,007			1,738	
RG-101218			0,128	0,645	0,316	0,998
RG-101248			5,036	0,790	1,445	
RG-101312					5,623	0,955
RG-101316					1,585	0,896
RG-101340	0,106	0,364	0,240	0,964	0,234	1,126
RG-101353	0,675	1,163	0,266	1,168	0,107	1,078
RG-101376	1,361	0,654			0,537	0,777
RG-101382	0,588	0,915	0,306	1,188	0,066	0,951
RG-101398					0,282	0,712
RG-101408			0,336	1,185	0,148	1,118
RG-101494	0,148	0,822	0,036	0,916	0,079	1,093
RG-101509					1,175	0,882

ES 2 566 366 T3

Compuesto	EC50 13B3 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 13B3	Ensayo 27-63 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 27-63	Ensayo Z3 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo Z3
RG-101511	0,794	0,811	0,714	0,762	0,468	1,122
RG-101523	2,374	0,772	0,165	0,943	0,242	
RG-101528	29,303	1,111			1,047	0,923
RG-101531					0,085	
RG-101542					0,324	0,793
RG-101585			5,057	0,893	4,898	
RG-101659	0,562	0,867	0,347	1,009	0,214	
RG-101664	>50	0,002			21,081	
RG-101670	0,646	0,874			0,468	0,853
RG-101691	0,406	0,918	0,250	0,969	0,174	1,068
RG-101692	0,728	1,004	0,788	1,008	0,309	0,975
RG-101734					0,145	0,988
RG-101759	0,877	0,336			0,331	0,639
RG-101774	0,327	0,657	0,359	0,795	0,155	0,943
RG-101862	1,050	0,861			0,269	0,866
RG-101863	0,728	0,837	1,003	1,043	0,257	0,953
RG-101864	0,288	0,460	0,343	0,750	0,245	1,075
RG-101887	0,861	0,579	0,351	0,675	0,257	0,930
RG-101889					3,300	
RG-102021	4,045	1,136			0,513	0,920
RG-102125	0,479		0,190	0,721	0,174	
RG-102125	0,479		0,190	0,721	0,174	
RG-102240	0,5	1	0,288	1	0,286	1
RG-102317	0,345		0,102	0,948		
RG-102398	0,627	0,838	0,325	1,017	0,095	1,027
RG-102408	0,091	0,662			0,054	1,114
RG-102592	4,922	0,684	7,770	0,798	3,890	0,699
RG-103309	0,146	1,486	3,024	0,975	0,078	0,950
RG-103361	28,000	0,758			0,526	0,938
RG-103451	0,208	0,742	0,314	0,884	0,083	1,054
RG-104074	0,865	0,812			0,307	1,122
RG-115006	3,496	0,890			0,275	1,031
RG-115009	18,908	0,917			3,307	0,916
RG-115025	39,254	0,186	2,449	1,523	0,347	0,385
RG-115033	1,000	0,643	18,101	0,868	16,218	0,575
RG-115038	1,743	1,172			0,550	1,064
RG-115043	2,669	0,852			0,178	0,943
RG-115046			5,657	0,739	3,548	
RG-115050	0,762	0,724			0,282	0,808
RG-115055	0,303	0,894	0,318	1,341	0,043	0,936
RG-115064	>50	0,000			>50	0,031
RG-115065			3,000	0,746	1,479	
RG-115068	0,926	0,722			21,000	0,804
RG-115077	0,847	1,509			0,389	0,911
RG-115085			0,807	0,683	0,195	
RG-115086					0,692	0,433
RG-115088	1,827	0,709			0,501	0,958
RG-115092	0,184	1,176	0,213	1,092	0,037	0,917
RG-115102	0,930	0,546	0,491	0,667	0,139	0,858
RG-115106					2,570	0,457
RG-115112					0,309	0,618
RG-115116	>50	1,172			3,311	0,960
RG-115118	0,689	0,530	0,94	0,612	0,234	0,969
RG-115128					0,245	0,538
RG-115130	0,512		0,093	1,375	0,036	

ES 2 566 366 T3

Compuesto	EC50 13B3 (µM)	FI Máx con resp al ensayo 13B3	Ensayo 27-63 EC50 (µM)	FI Máx con resp al ensayo 27-63	Ensayo Z3 EC50 (µM)	FI Máx con resp al ensayo Z3
RG-115143	>50	0,651	7,777	1,112	7,413	0,844
RG-115162	0,811	0,630	0,424	0,653	0,069	0,988
RG-115167					0,240	0,533
RG-115169	0,497	0,618			0,347	0,956
RG-115191	>50	1,513			2,399	0,934
RG-115199					3,467	0,734
RG-115207	0,618	0,707	0,593	0,704	0,257	0,923
RG-115220	>50	0,125			0,871	0,591
RG-115223	>50	1,346	4,685	1,167	1,905	0,925
RG-115229	2,250	0,418	1,153	0,735	0,427	
RG-115244	0,369	0,663	0,169	0,785	0,085	0,959
RG-115253			0,107	0,742	0,269	
RG-115256					0,692	0,527
RG-115257	0,886	0,742	0,698	0,663	0,204	0,885
RG-115258		1,334	1,879	1,279	0,646	0,882
RG-115259	2,704	0,702			0,427	0,617
RG-115261					29,512	0,498
RG-115269					0,437	0,552
RG-115278	0,630	0,823	0,885	0,720	0,257	0,893
RG-115280			11,000	0,254		
RG-115280			11,000	0,254		
RG-115297	1,361	0,737	0,330	0,986	0,066	0,872
RG-115302	2,000	0,624	1,044	0,521	0,275	
RG-115306					3,467	0,424
RG-115310	>50	0,676			2,630	0,781
RG-115327					2,754	0,662
RG-115329					2,570	0,892
RG-115330	5,690	0,711			0,186	0,860
RG-115337	0,621	0,927	0,363	0,822	0,095	
RG-115350	0,795	0,711			0,309	0,935
RG-115352					45,709	0,265
RG-115378	1,762	0,655	0,758	0,863	0,324	0,947
RG-115384	0,320	0,426	0,113	0,645	0,166	0,904
RG-115407	7,000	1,048	1,056	0,932	0,347	0,906
RG-115416	0,938	12,104	0,637	0,721	0,091	1,869
RG-115422					0,398	0,769
RG-115429	8,676	1,065			9,574	0,880
RG-115441					0,126	0,759
RG-115496					1,175	0,878
RG-115499	0,328	0,489	0,336	0,705	0,170	0,954
RG-115508	0,849	0,805	1,033	0,719	0,537	0,787
RG-115514	0,541	0,550	0,170	0,720	0,056	0,970
RG-115515					0,617	0,975
RG-115517	0,355	0,675			0,089	0,923
RG-115517	0,355	0,675			0,089	0,923
RG-115518	1,253	0,648	1,053	0,866	0,257	0,834
RG-115532	0,518	0,835			0,129	0,933
RG-115534					2,754	0,463
RG-115536	0,781	0,734			0,126	0,950
RG-115539	5,000	0,955	1,177	0,595	0,151	
RG-115551			0,852	0,684	0,398	
RG-115555					>50	0,006
RG-115557					1,698	0,566
RG-115575	0,271	0,641			0,102	0,886
RG-115580			0,375	0,760	0,182	

ES 2 566 366 T3

Compuesto	EC50 13B3 (µM)	FI Máx con resp al ensayo 13B3	Ensayo 27-63 EC50 (µM)	FI Máx con resp al ensayo 27-63	Ensayo Z3 EC50 (µM)	FI Máx con resp al ensayo Z3
RG-115595					5,623	0,686
RG-115595					5,623	0,686
RG-115609	13,782	0,883			1,386	0,625
RG-115611					1,585	0,703
RG-115613	5,937	0,734			0,589	0,964
RG-115625	25,322	0,931			0,389	0,950
RG-115627	0,921	0,854			0,813	0,840
RG-115637	0,088	1,002	0,117	1,305	0,018	0,947
RG-115647	0,832	0,662	0,372	0,505	0,145	0,923
RG-115648					21,380	0,182
RG-115664	0,323	0,497	0,359	0,635	0,126	0,846
RG-115674	1,723	0,875			0,229	0,995
RG-115689					100,000	0,411
RG-115690	0,632	1,181			0,209	0,998
RG-115819			0,025	1,045	0,042	0,915
RG-115820			0,193	1,270	0,203	0,887
RG-115823			0,011	1,069	0,020	0,933
RG-115824			0,036	1,218	0,046	0,806
RG-115829			0,035	1,264	0,058	0,937
RG-115830			0,036	1,049	0,045	1,020
RG-115831			0,096	1,366	0,102	0,937
RG-115832			0,035	1,075	0,037	1,002
RG-115834			1,170	0,733		
RG-115835			20,000	0,731		
RG-115836			0,098	0,808		
RG-115837			1,114	0,569		
RG-115840			0,110	0,776		
RG-115841			2,015	0,610		
RG-115842			1,196	0,524		
RG-115846			0,095	0,846		
RG-115847			1,100	1,120		
RG-115848			1,291	0,494		
RG-115849			>33	0,007		
RG-115850			>33	0,001		
RG-115851			0,02	1		
RG-115852			0,07	1		
RG-115856			0,003	0,879		
RG-115857			0,013	1,140		
RG-115858			0,005	0,915		
RG-115859			0,007	1,218		
RG-115861			4,308	0,215		
RG-115862			>33	0,048		
RG-115863			>33	0,154		
RG-115864			0,004	0,979		
RG-115865			0,010	1,246		
RG-115044	>50	0,87	>33	0,00	>50	1,08
RG-115079	0,02	0,20			>50	0,02
RG-115117	>50	0			3,93	0,36
RG-115160	>50	0			>50	0,21
RG-115172	>50	0			>50	0,32
RG-115225	0,58	0,08			>50	0,32
RG-115358	>50	0,20			9,45	0,48
RG-115371	>50	1,44			3,02	0,76
RG-115490	>50	1,01			6,35	0,44
RG-115497	>50	0			>50	0,07

Compuesto	EC50 13B3 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 13B3	Ensayo 27-63 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo 27-63	Ensayo Z3 EC50 (μ M)	FI Máx con resp al ensayo Z3
RG-115511	>50	0,07	12,00	0,74	38,99	0,66
RG-115597			9,83	1,26		
RG-115408	>50	0			>50	0,01
RG-115653			19,77	0,53		
RG-115665	>50	0	5,49	0,01	12,20	0,09
RG-115783	~15	1,42			3,05	0,93
RG-115866			0,010	0,999		

EJEMPLO 4: ENSAYO BIOLÓGICO (*IN VIVO*) DE LOS COMPUESTOS

Los ligandos de los presentes solicitantes son útiles en diversas aplicaciones incluyendo la terapia génica, la expresión de proteínas de interés en células hospedadoras, la producción de organismos transgénicos y los ensayos basados en células. La inducción *in vivo* de una enzima indicadora con diversos ligandos de la presente invención se evaluó en un sistema modelo de ratón C57BL/6 que contenía un interruptor génico.

Casetes de Expresión Génica

Los dominios D, E y F del tipo silvestre del EcR de la larva del pino *Choristoneura fumiferana* ("CfEcR-DEF"; ID de SEC N.º: 1) se mutaron [V107 (gtt) → I107 (att) e Y127 (tac) → E127 (gag)] y se fusionaron al dominio de unión al ADN de GAL4 ("Gal4DBD1-147"; ID de SEC N.º: 2). Las hélices 1 a 8 de los dominios EF de RXR β de *Homo sapiens* ("HsRXR β -EF"; nucleótidos 1-465 de ID de SEC N.º: 4) y las hélices 9 a 12 de los dominios EF de la Proteína Ultraespiráculo de *Locusta migratoria* ("LmUSP-EF"; nucleótidos 403-630 de ID de SEC N.º: 5) se fusionaron al dominio de transactivación de VP16 ("VP16AD"; ID de SEC N.º: 6) que regula un gen indicador de la fosfatasa alcalina secretada humana ("SEAP", ID de SEC N.º: 12) que se colocó bajo el control de un elemento de respuesta 6cGAL4 (ID de SEC N.º: 13) y un promotor de transtiretrina (ID de SEC N.º: 14). Cada elemento del interruptor génico estaba en un plásmido separado. La expresión del receptor estaba bajo el control de un promotor CMV (ID de SEC N.º: 15). La inducción se evaluó por la cantidad de proteína indicadora expresada en presencia de ligando.

Electroporación de Interruptor génico

Se evaluó la expresión de SEAP en suero de ratones después de la electroporación del interruptor génico en cuádriceps de ratón. Los ratones se anestesiaron con 2 μ g/ml de una mezcla de ketamina (100 mg/ml) y xilazina (20 mg/ml). Los animales después se afeitaron, se inyectaron los vectores de ADN en el músculo en un volumen de 2 x 50 μ l de ácido poliglútamico (12 mg/ml de agua), se aplicó un gel de conductividad de electrodos y se colocó un calibrador de electrodos (1 cm x 1 cm, modelo 384) en la pata trasera. El músculo se electroporó con 200 V/cm, 8 veces, durante 20 ms/pulso, a intervalos de tiempo de 1 s. La dirección del campo eléctrico transversal se invirtió después de que los animales recibieran la mitad de los pulsos. La electroporación se realizó con un electroporador ECM 830 de BTX Molecular Delivery Systems.

Tratamiento con ligando

En algunos experimentos los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de 2,6 μ mol de ligando en 50 μ l de DMSO 3 días después de la electroporación del interruptor génico. En otros experimentos la concentración de ligando se disminuyó a 26 nmol/50 μ l de DMSO/ratón. La expresión de SEAP se evaluó 2-11 días después de la administración del ligando. En otros experimentos el ligando se administró en pienso para roedores. El pienso se preparó disolviendo 2 g de ligando en 20 ml de acetona y añadiéndolo a 1 kg de pienso autoclavable LabDiet 5010 de Purina Mills. Éste se mezcló exhaustivamente en un mezclador Hobart y después se mezcló durante unos 15 min adicionales en un mezclador Cross Blend. Los animales recibieron pienso a voluntad durante 1, 2 o 3 días. Todos los valores son la media de cuatro animales. La SEAP de fondo en el suero de los animales tratados con vector solamente sin adición de ligando fue 0-11 ng/ml de suero.

Ensayo indicador

El suero de ratón se obtuvo por centrifugación de sangre adquirida por sangrado retroorbital con un tubo capilar de vidrio pequeño. La cuantificación de SEAP se determinó usando un kit de quimioluminiscencia Clontech Great Escape y por comparación con el patrón Clontech SEAP.

Tabla 9: Evaluación *in vivo* de la inducción mediada por ligando de un interruptor génico basado en un receptor de ecdisona mutado. La expresión de SEAP en el suero de los ratones se evaluó después de la electroporación de las casetes de expresión génica en los cuádriceps de ratones. Los ratones recibieron una inyección IP de 2,6 μ mol de ligando 3 días después de la electroporación. Se evaluó la expresión de SEAP 2-11 días después de la

administración de los ligandos. Cada grupo de dosis estaba compuesto por cuatro animales. El porcentaje de inducción de ligando GSTM-E se determinó calculando la medida de la expresión de SEAP a partir de cuatro animales dividido por la expresión de SEAP media inducida con ligando GSTM-E y después multiplicando por 100.

5 Tabla 10: Inducción de la expresión del interruptor génico con bajas concentraciones de ligando. La expresión de SEAP en el suero de ratones se evaluó después de la electroporación de las casetes de expresión génica en los cuádriceps de ratones. Los ratones recibieron una inyección IP de 26 nmol de ligando 3 días después de la electroporación. Se evaluó la expresión de SEAP 2-7 días después de la administración de los ligandos. Los valores son la media de cuatro animales.

10 Tabla 11: Inducción de SEAP en ratones C57BL/6 con ligando GSTM-E o RG-103309 administrado en pienso para roedores. La expresión de SEAP en el suero de ratones se evaluó después de la electroporación de las casetes de expresión génica en los cuádriceps de ratones. Los ratones recibieron ligando GSTM-E o RG-103309 en su alimento (2 g/kg) 3 días después de la electroporación. El alimento se administró a voluntad durante 1, 2 o 3 días. Después de cada intervalo se retiró el alimento tratado con ligando y los animales recibieron alimento sin tratar. Los valores son la media de cuatro animales.

Tabla 9: Evaluación *in vivo* de la inducción mediada por ligando de un interruptor génico basado en un receptor de ecdisona mutado

Compuesto.	Fosfatasa alcalina secretada (porcentaje de inducción del ligando GS TM -E)		
	Día 2	Día 3	Día 11
RG-101382	92	81	890
RG-102317	112	116	61
RG-101523	85	79	1.116
RG-101494	136	138	ND
RG-115613	2	1	ND
RG-115575	74	78	69
RG-115637	12	7	0
RG-115517	4	3	ND
RG-115092	8	2	ND
RG-115009	4	3	ND
Ligando GS TM -E	100	100	100
RG-103309	251	298	ND
RG-103451	76	73	371
RG-115819	172	215	3.008
RG-115820	82	63	399
RG-115823	129	183	2.652
RG-115824	102	101	415
RG-115832	147	189	4.183
RG-115831	118	121	105
RG-115830	120	158	3.558
RG-115829	72	83	687
ND – sin determinar.			

Tabla 10: Inducción de la expresión del interruptor génico con bajas concentraciones de ligando.

Compuesto	Fosfatasa alcalina secretada (ng/ml de suero de ratón)		
	Día 2	Día 3	Día 7
Ligando GS TM -E (130 nmol)	652	1.780	139
RG-103309 (26 nmol)	3.428	2.800	143
RG-115819 (26 nmol)	5.984	4.096	453
RG-115823 (26 nmol)	3.788	2.705	373
RG-115832 (26 nmol)	2.349	1.807	149
RG-115830 (26 nmol)	6.835	5.339	590
RG-115856 (26 nmol)	2.292	2.350	ND
RG-115857 (26 nmol)	574	401	ND
RG-115858 (26 nmol)	13.661	11.820	ND
RG-115864 (26 nmol)	6.722	5.652	ND
ND – sin determinar.			

Tabla 11: Inducción de la expresión del interruptor génico con ligandos administrados en el alimento para roedores.

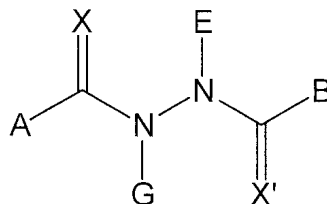
Compuesto (periodo de dosificación)	Fosfatasa alcalina secretada (ng/ml de suero de ratón) ¹		
	Día 2	Día 3	Día 7
Ligando GS TM -E (1 día)	7.302	7.670	3.784
Ligando GS TM -E (2 días)	13.046	15.831	8.816
Ligando GS TM -E (3 días)	8.064	11.392	8.372
RG-103309 (1 día)	9.003	14.850	5.172
RG-103309 (2 días)	6.971	16.518	7.460
RG-103309 (3 días)	11.126	20.373	11.549

Además, un experto en la materia también es capaz de predecir que los ligandos descritos en el presente documento también funcionarán modulando la expresión génica en diversos tipos celulares descritos anteriormente usando sistemas de expresión génica basados en los receptores nucleares del grupo H y del grupo B.

PÁRRAFOS RESUMEN

La presente invención se define en las reivindicaciones y en la descripción acompañante. Por conveniencia otros aspectos de la presente descripción se presentan en el presente documento a modo de cláusulas numeradas.

1. Un compuesto de la fórmula general:



en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-(CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenoiloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenoil opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinoil (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a; sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une un fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-) (-N-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄;

B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-(CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenoiloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenoil opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinoil (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a; sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une un fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄;

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxi; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcóxicarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -CONR^aR^b; amino; alquilamino (C₁-C₆); dialquilamino (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye -CF³; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado (C₄-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo (C₅-C₆); fenilo; alqueno (C₂-C₃); hidroxi, alcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); alcianoilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); formilo; trialkilsililo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -C=N-OR^a; -C=N-R^d; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

en el que R^a, R^b y R^c son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; R^d es hidroxi alquilo (C₁-C₆); y n = 1-4; y

G es H o CN;

con la condición de que:

1) cuando E es alquilo ramificado (C₄-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; alqueno (C₂-C₃); carboxi; o alcóxicarbonilo (C₁-C₆); entonces B es

(a) fenilo sustituido que lleva al menos un grupo -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

(b) heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares que lleva al menos un grupo haloalquilo; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a, R^b son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; o

2) cuando E es alquilo ramificado (C₄-C₁₀) sustituido que lleva al menos uno de fenilo; hidroxi, alcoxi (C₁-C₆); o formilo; entonces B es

(a) fenilo sustituido que lleva al menos un grupo -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

(b) heterociclo de 6 miembros sustituido o no sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo.

2. El compuesto de la cláusula 1 en el que X y X' son O y G es H.

3. El compuesto de la cláusula 2 en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

Éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;

N'-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(N₂NC(O)NHN=CH-5)-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(N₂NC(O)C(O)NHN=CH-5)-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;

N'-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazina de ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;

N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3)-tritil-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazol-3-carboxílico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-tritil-1H-indazol-3-carboxílico;

N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida;

N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y

N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico.

4. Un método para modular la expresión de un gen diana en una célula hospedadora, en el que la célula hospedadora incluye una primera casete de expresión génica que comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende:

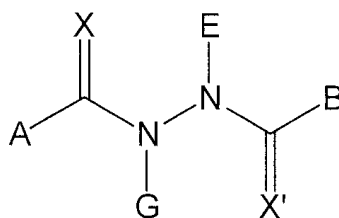
- 5 (i) un dominio de transactivación;
(ii) un dominio de unión al ADN; y
(iii) un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H;

una segunda casete de expresión génica que comprende:

- 10 (i) un elemento de respuesta capaz de unirse a dicho dominio de unión al ADN;
(ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación; y
(iii) dicho gen diana;

- 15 comprendiendo el método poner en contacto dicha célula hospedadora con:

(1) un compuesto de fórmula:



- 20 en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino ($-NR^aR^b$); alquilaminoalquilo ($-(CH_2)_nNR^aR^b$); alquilo (C_1-C_6); haloalquilo (C_1-C_6); cianoalquilo (C_1-C_6); hidroxialquilo (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6); fenoxi; haloalcoxi (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); alquenilo (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6) alcoxi (C_1-C_6); alcanilo (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); (C_2-C_6) alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C_1-C_4) o alcoxi (C_1-C_4); alquinilo (C_2-C_6) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C_1-C_4); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C_1-C_6); haloalquilcarbonilo (C_1-C_6); benzoilo; alcocarbonilo (C_1-C_6); haloalcoxycarbonilo (C_1-C_6); alcanilo (C_1-C_6) ($-OCOR^a$); carboxamido ($-CONR^aR^b$); amido ($-NR^aCOR^b$); alcocarbonilamino ($-NR^aCO_2R^b$); alquilaminocarbonilamino ($-NR^aCONR^bR^c$); mercapto; alquiltio (C_1-C_6); alquilsulfonilo (C_1-C_6); alquilsulfonil (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); alquilsulfóxido (C_1-C_6) ($-S(O)R^a$); alquilsulfóxido (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6) ($-(CH_2)_nS(O)R^a$); sulfamido ($-SO_2NR^aR^b$); $-SO_3H$; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C_1-C_6), alquilo (C_1-C_6) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-OCH_2O-$), ($-OCH(CH_3)O-$), ($-OCH_2CH_2O-$), ($-OCH(CH_3)CH_2O-$), ($-S-CH=N-$), ($-CH_2OCH_2O-$), ($-O(CH_2)_3-$), ($=N-O-N=$), ($-C=CH-NH-$), ($-OCF_2O-$) ($-N-CH=N-$), ($-CH_2CH_2O-$), y ($-(CH_2)_4-$);

B es

- 40 (a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino ($-NR^aR^b$); alquilaminoalquilo ($-(CH_2)_nNR^aR^b$); alquilo (C_1-C_6); haloalquilo (C_1-C_6); cianoalquilo (C_1-C_6); hidroxialquilo (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6); fenoxi; haloalcoxi (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); alquenilo (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6) alcoxi (C_1-C_6); alcanilo (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); (C_2-C_6) alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C_1-C_4) o alcoxi (C_1-C_4); alquinilo (C_2-C_6) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C_1-C_4); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C_1-C_6); haloalquilcarbonilo (C_1-C_6); benzoilo; alcocarbonilo (C_1-C_6); haloalcoxycarbonilo (C_1-C_6); alcanilo (C_1-C_6) ($-OCOR^a$); carboxamido ($-CONR^aR^b$); amido ($-NR^aCOR^b$); alcocarbonilamino ($-NR^aCO_2R^b$); alquilaminocarbonilamino ($-NR^aCONR^bR^c$); mercapto; alquiltio (C_1-C_6); alquilsulfonilo (C_1-C_6); alquilsulfonil (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6); alquilsulfóxido (C_1-C_6) ($-S(O)R^a$); alquilsulfóxido (C_1-C_6) alquilo (C_1-C_6) ($-(CH_2)_nS(O)R^a$); sulfamido ($-SO_2NR^aR^b$); $-SO_3H$; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C_1-C_6), alquilo (C_1-C_6) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-OCH_2O-$), ($-OCH(CH_3)O-$), ($-OCH_2CH_2O-$), ($-OCH(CH_3)CH_2O-$), ($-S-CH=N-$), ($-CH_2OCH_2O-$), ($-O(CH_2)_3-$), ($=N-O-N=$), ($-C=CH-NH-$), ($-OCF_2O-$), ($-NH-CH=N-$), ($-CH_2CH_2O-$), y ($-(CH_2)_4-$);
- 55 (b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6); tioalcoxi (C_1-C_6); carboxi; alcocarbonilo (C_1-C_6); carboxialquilo (C_1-C_6); alcocarbonilalquilo (C_1-C_6) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en

cada grupo alquilo; $-\text{CONR}^a\text{R}^b$; amino; alquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$); dialquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-trítíl-5-benzimidazolilo; 3-trítíl-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-trítíl-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado ($\text{C}_4\text{-C}_{10}$) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo ($\text{C}_5\text{-C}_6$); fenilo; alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_3$); hidroxilo, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxi; alcóxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); formilo; trialkilsiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-\text{C}=\text{N}-\text{OR}^a$; $-\text{C}=\text{N}-\text{R}^d$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$;

en el que R^a , R^b y R^c son independientemente H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo; R^d es hidroxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); y $n = 1-4$; y

G es H o CN;

con la condición de que:

cuando E es alquilo ramificado ($\text{C}_4\text{-C}_{10}$) que contiene un carbono terciario o un ciano alquilo ($\text{C}_4\text{-C}_5$) que contiene un carbono terciario;

entonces B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilaminoalquilo ($-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); cianoalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); hidroxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); fenoxi; haloalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquenoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcaniloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); ($\text{C}_2\text{-C}_6$)alquenoiloxi opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$); alquinoil ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$); formilo; carboxi; alquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); benzoilo; alcóxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalcoxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcaniloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); carboxamido ($-\text{CONR}^a\text{R}^b$); amido ($-\text{NR}^a\text{COR}^b$); alcóxicarbonilamino ($-\text{NR}^a\text{CO}_2\text{R}^b$); alquilaminocarbonilamino ($-\text{NR}^a\text{CONR}^b\text{R}^c$); mercapto; alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfonil ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfóxido ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$); alquilsulfóxido ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{O})\text{R}^a$); sulfamido ($-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$); $-\text{SO}_3\text{H}$; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$), ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{S}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$), ($=\text{N}-\text{O}-\text{N}=$), ($-\text{C}=\text{CH}-\text{NH}-$), ($-\text{OCF}_2\text{O}-$), ($-\text{NH}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), y ($-(\text{CH}_2)_4-$);

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); tioalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxi; alcóxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcóxicarbonilalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-\text{CONR}^a\text{R}^b$; amino; alquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$); dialquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-trítíl-5-benzimidazolilo; 3-trítíl-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-trítíl-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo; o

(2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

N'-benzoil-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-cloro-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3-cloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-3-metoxi-benzoico;

N'-(4-bromo-3-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(4-cloro-3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3-cloro-4,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

- N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cianometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-nitro-benzoico;
 5 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-4-etil-benzoico;
 10 N'-terc-butil-N'-(3,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxy-etil)-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-dimetilamino-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-acetil-2-metil-benzoico;
 Éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-yodo-2-metil-benzoico;
 15 N'-(3-bromo-5-cloro-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-isopropoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 20 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzol;
 N'-(3-bromo-5-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-trifluorometoxi-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 30 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-cloro-4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-etil-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzofuran-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 35 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-3,5-fluorobenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,4-dietil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 40 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-6-metil-isonicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-yodo-3-metoxi-benzoico;
 45 N'-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-4-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 50 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metil-2,3-dihidro-benzo [1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 55 N'-(5-bromo-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-cloro-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 60 N'-(benzotiazol-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(6-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 65 N'-terc-butil-N'-(8-metil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;

- N-terc-butil-N'-(6-cloro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3,6-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 5 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,4,5-trimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 10 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cyano-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido benzoico;
 éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinol]-2-metil-propónico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 15 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-amino-3-metoxi-benzoico;
 éster 3-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-5-metil-bencílico de ácido acético;
 20 éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(2,3,4-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-5-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-fluoro-5-metil-benzoico;
 30 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,5-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
 35 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-fluoro-benzoico;
 éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 40 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 5-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 45 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,2,5]oxadiazole-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-5-nitro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 50 N-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-nitro-benzyl)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 55 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,4,5-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 60 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-[5-metoxi-2-(2,2,2-trifluoro-etoxi)-benzoil]-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-6-metil-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 65 N-terc-butil-N'-(1H-indol-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;

- N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3']dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 5 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metoximetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(hidroxiimino-metil)-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)C(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 10 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4,5-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 15 N'-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-trifluorometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 20 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 éster 4-[N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 25 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico
 ácido;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 30 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-
 6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 35 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil) hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 40 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-
 45 benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-pirimidin-4-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dimetoxi-piridazin-4-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dicloro-piridazin-4-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido piridazin-4-carboxílico;
 50 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-piridazin-4-carboxílico, del
 regioisómero de piridazina;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 55 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 60 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetilpropil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-(3,5-bis-hidroximetil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxi-etil)-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 Ácido 5-[N'-(4-acetil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazinocarbonil]-isofáltico;
 65 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;

- ácido 2-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-bencensulfónico;
 N-terc-butil-N-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,2,2-trimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 5 N'-benzoil-N'-(1-etil-pentil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico,
 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metansulfinil-benzoico;
 10 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dixnetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 6-metil-piridin-2-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 15 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-metoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
 20 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3-)tritol-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
 25 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-1-fenil-1H-pirazol-3-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-6-metilsulfonyl-pirazin-2-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazole-3-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 1-tritol-1H-indazole-3-carboxílico;
 éster metílico de ácido 6-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzil)-hidrazinocarbonil]-nicotínico;
 30 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico;
 N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C-]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C-3-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 35 Ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico;
 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinilmetil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-methanesulfonylmetil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metilamnometil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 40 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metilsulfonylmetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-allyloximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(2-acetoxioximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 45 N-terc butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-pirazin-2-carboxílico.

5. El método de la cláusula 4 en el que el compuesto de (1) es de la fórmula especificada y:

X y X' son O;

50 G es H; y

E es un alquilo ramificado (C₇-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente ciano 1-4; halo; cicloalquilo (C₅-C₆), fenilo, alqueno (C₂-C₃), hidroxi, alcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alcanilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); formilo; trialkylsililo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -C=N-OR^a; -C=N-R^d; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

En el que R^a, R^b y R^c son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo y R^d es hidroxialquilo (C₁-C₆).

6. El método de la cláusula 5 en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- 60 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 Éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(N₂NC(O)NHN=CH-5)-metil-benzoico;
 65 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(N₂NC(O)C(O)NHN=CH-5)-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;

N'-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazina de ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;

N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;

N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;

5 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3)-tritol-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;

N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazol-3-carboxílico;

N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-tritol-1H-indazol-3-carboxílico;

N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida;

N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

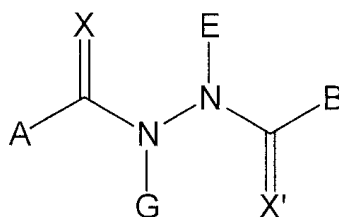
10 N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y

N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico.

7. Un método para modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto, comprendiendo administrar al sujeto una cantidad eficaz de:

15

(1) un compuesto de fórmula:



20 en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (- (CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenilo (C₁-C₆); alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquino (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-) (-N-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

B es

40 (a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (- (CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenilo (C₁-C₆); alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquino (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

55 (b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcoxycarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -CONR^aR^b; amino; alquilamino (C₁-C₆); dialquilamino (C₁-C₆) que tiene independientemente el

número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado ($\text{C}_4\text{-C}_{10}$) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo ($\text{C}_5\text{-C}_6$); fenilo; alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_3$); hidroxilo, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxi; alcóxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcánoloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); formilo; trialkilsililoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-\text{C}=\text{N}-\text{OR}^a$; $-\text{C}=\text{N}-\text{R}^d$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$;

en el que R^a , R^b y R^c son independientemente H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo; R^d es hidroxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); y $n = 1-4$; y

G es H o CN;

con la condición de que:

cuando E es alquilo ramificado ($\text{C}_4\text{-C}_{10}$) que contiene un carbono terciario o un ciano alquilo ($\text{C}_4\text{-C}_5$) que contiene un carbono terciario;

entonces B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilaminoalquilo ($-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); cianoalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); hidroxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); fenoxi; haloalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquenoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcaniloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); ($\text{C}_2\text{-C}_6$)alquenoiloxi opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$); alquinilo ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$); formilo; carboxi; alquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); benzoilo; alcóxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalcoxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcaniloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); carboxamido ($-\text{CONR}^a\text{R}^b$); amido ($-\text{NR}^a\text{COR}^b$); alcóxicarbonilamino ($-\text{NR}^a\text{CO}_2\text{R}^b$); alquilaminocarbonilamino ($-\text{NR}^a\text{CONR}^b\text{R}^c$); mercapto; alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfonil ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfóxido ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$); alquilsulfóxido ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{O})\text{R}^a$); sulfamido ($-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$); $-\text{SO}_3\text{H}$; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$), ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{S}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$), ($=\text{N}-\text{O}-\text{N}=$), ($-\text{C}=\text{CH}-\text{NH}-$), ($-\text{OCF}_2\text{O}-$), ($-\text{NH}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), y ($-(\text{CH}_2)_4$);

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); tioalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxi; alcóxicarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcóxicarbonilalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-\text{CONR}^a\text{R}^b$; amino; alquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$); dialquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo; o

(2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

N'-benzoil-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-cloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-3-metoxi-benzoico;
 N'-(4-bromo-3-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-4,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cianometil-benzoico;

- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-nitro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 5 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxy-etil)-benzoico;
 10 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-dimetilamino-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-acetil-2-metil-benzoico;
 Éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-yodo-2-metil-benzoico;
 N'-(3-bromo-5-cloro-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 15 N-terc-butil-N'-(3-isopropoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzol;
 20 N'-(3-bromo-5-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-trifluorometoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 30 N'-(benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 2-cloro-4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-etil-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzofuran-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-3,5-fluorobenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 35 N-terc-butil-N'-(4-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,4-dietil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 40 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-6-metil-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-yodo-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 45 N-terc-butil-N'-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-4-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 50 N-terc-butil-N'-(2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metil-2,3-dihidro-benzo [1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(5-bromo-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 55 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-cloro-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-(benzotiazol-6-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 60 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(6-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-metil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 65 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(6-cloro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

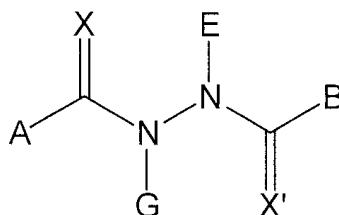
- N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3,6-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 5 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,4,5-trimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cyano-benzoico;
 10 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido benzoico;
 éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinol]-2-metil-propónico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 15 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-amino-3-metoxi-benzoico;
 éster 3-[N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-5-metil-bencílico de ácido acético;
 éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;
 20 N'-terc-butil-N'-(2,3,4-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-fluoro-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 30 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,5-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 35 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-fluoro-benzoico;
 éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 40 N'-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 5-cloro-2-metoxi benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 45 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,2,5]oxadiazole-5-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-5-nitro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 50 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-nitro-benzil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico;
 55 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,4,5-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 60 N'-terc-butil-N'-(5-fluoro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metoxi-2-(2,2,2-trifluoro-etoxi)-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-6-metil-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(1H-indol-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 65 N'-terc-butil-N'-(2-metansulfonil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;

- N-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3']dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3']dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-(ciano-dimetil-metil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metoximetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 5 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(hidroxiimino-metil)-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)C(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 10 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4,5-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-trifluorometil-benzoico;
 15 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 20 éster 4-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 25 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico
 ácido;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 30 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-
 6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 35 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil) hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 40 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;
 N-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-
 benzoico;
 45 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-pirimidin-4-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dimetoxi-piridazin-4-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dicloro-piridazin-4-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido piridazin-4-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-piridazin-4-carboxílico, del
 50 regioisómero de piridazina;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 55 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetilpropil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 60 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-(3,5-bis-hidroximetil-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxi-etil)-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 Ácido 5-[N'-(4-acetil-benzoil)-N-terc-butil-hidrazinocarbonil]-isofáltico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 65 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
 ácido 2-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-bencensulfónico;

N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,2,2-trimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-benzoil-N'-(1-etil-pentil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 5 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico,
 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metansulfinil-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dixnetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 10 carboxílico;
 N-terc-butil-N-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 6-metil-piridin-2-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 15 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-metoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 20 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3-)tritol-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-1-fenil-1H-pirazol-3-carboxílico;
 25 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-6-metilsulfonyl-pirazin-2-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazole-3-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 1-tritol-1H-indazole-3-carboxílico;
 éster metílico de ácido 6-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzil)-hidrazinocarbonil]-nicotínico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico;
 30 N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C-]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C-3-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 Ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico;
 35 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinilmetil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-methanesulfonylmetil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metilamnometil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metilsulfonylmetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 40 N'-(2-allyloximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(2-acetoxioximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-pirazin-2-carboxílico.

8. Un método para regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico que comprende
 poner en contacto un ligando con un complejo receptor de ecdisona dentro de las células del sujeto, en el que las
 células contienen adicionalmente una secuencia de unión al ADN para el complejo receptor de ecdisona cuando en
 combinación con el ligando y en el que la formación de un complejo de complejo receptor de ecdisona-ligando-
 50 secuencia de unión al ADN induce la expresión del gen, y donde el ligando es:

(1) un compuesto de fórmula:



en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano;
 hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-(CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆);

hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) -(CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-) (-N-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxi; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR²); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) -(CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxi; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcoxycarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -CONR^aR^b; amino; alquilamino (C₁-C₆); dialquilamino (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye -CF₃; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-trítill-5-benzimidazolilo; 3-trítill-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-trítill-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado (C₄-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo (C₅-C₆); fenilo; alquenilo (C₂-C₃); hidroxi, alcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR³); formilo; alquilsililoxi (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -C=N-OR^a; -C=N-R^d; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

en el que R^a, R^b y R^c son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; R^d es hidroxialquilo (C₁-C₆); y n = 1-4; y

G es H o CN;

con la condición de que:

cuando E es alquilo ramificado (C₄-C₁₀) que contiene un carbono terciario o un ciano alquilo (C₄-C₅) que contiene un carbono terciario;

entonces B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxi; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR²); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) -(CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

alquilo (C_1-C_6) $-(CH_2)_nS(O)R^a$; sulfamido $-(SO_2NR^aR^b)$; $-SO_3H$; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C_1-C_6), alquilo (C_1-C_6) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en $(-OCH_2O-)$, $(-OCH(CH_3)O-)$, $(-OCH_2CH_2O-)$, $(-OCH(CH_3)CH_2O-)$, $(-S-CH=N-)$, $(-CH_2OCH_2O-)$, $(-O(CH_2)_3-)$, $(=N-O-N=)$, $(-C=CH-NH-)$, $(-OCF_2O-)$, $(-NH-CH=N-)$, $(-CH_2CH_2O-)$, y $(-CH_2)_4$;

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo (C_1-C_6); alcoxi (C_1-C_6); tioalcoxi (C_1-C_6); carboxi; alcoxycarbonilo (C_1-C_6); carboxialquilo (C_1-C_6); alcoxycarbonilalquilo (C_1-C_6) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-CONR^aR^b$; amino; alquilamino (C_1-C_6); dialquilamino (C_1-C_6) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-CF_3$; $-C=N-NHC(O)NR^aR^b$; o $-C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C_1-C_6)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo (C_1-C_6) o fenilo; o

(2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

N'-benzoil-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-cloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-3-metoxi-benzoico;
 N'-(4-bromo-3-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-4,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cianometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-nitro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxy-etil)-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-dimetilamino-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-acetil-2-metil-benzoico;
 Éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-yodo-2-metil-benzoico;
 N'-(3-bromo-5-cloro-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-isopropoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzol;
 N'-(3-bromo-5-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-trifluorometoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-cloro-4-fluoro-benzoico;

- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-etil-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzofuran-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-3,5-fluorobenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 5 N-terc-butil-N'-(4-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,4-dietil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 10 N-terc-butil-N'-(4-fluoro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-6-metil-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-yodo-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 15 N-terc-butil-N'-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-4-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 20 N-terc-butil-N'-(2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metil-2,3-dihidro-benzo [1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(5-bromo-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 25 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-cloro-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-(benzotiazol-6-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 30 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(6-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-metil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 35 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(6-cloro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3,6-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 40 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,4,5-trimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 45 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cyano-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido benzoico;
 éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinol]-2-metil-propónico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 50 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-amino-3-metoxi-benzoico;
 éster 3-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-5-metil-bencílico de ácido acético;
 55 éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(2,3,4-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 60 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-fluoro-5-metil-benzoico;
 65 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,5-difluoro-benzoico;

- N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 5 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-fluoro-benzoico;
 éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 10 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 5-cloro-2-metoxi benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 15 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,2,5]oxadiazole-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-5-nitro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 20 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-nitro-benzyl)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico;
 25 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,4,5-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 30 N'-terc-butil-N'-(5-fluoro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metoxi-2-(2,2,2-trifluoro-etoxi)-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-6-metil-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(1H-indol-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 35 N'-terc-butil-N'-(2-metansulfínil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3']dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-(ciano-dimetil-metil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 40 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metoximetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(hidroxiimino-metil)-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)C(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 45 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4,5-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 50 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-trifluorometil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 55 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 éster 4-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 60 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico
 ácido;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 65 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;

- N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 5 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(3,5-dimetilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil) hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 10 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;
- N-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
- 15 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-pirimidin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dimetoxi-piridazin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dicloro-piridazin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido piridazin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-piridazin-4-carboxílico, del regioisómero de piridazina;
- 20 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- 25 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetilpropil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
- 30 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
- N'-(3,5-bis-hidroximetil-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxi-etil)-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
- Ácido 5-[N'-(4-acetil-benzoil)-N-terc-butil-hidrazinocarbonil]-isofáltico;
- N-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 35 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
- ácido 2-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-bencensulfónico;
- N-terc-butil-N-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,2,2-trimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
- 40 N'-benzoil-N'-(1-etil-pentil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
- N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico,
- N-terc-butil-N'-(5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metansulfinil-benzoico;
- 45 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dixnetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N-terc-butil-N-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 6-metil-piridin-2-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 50 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
- N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-metoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
- 55 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3-)tritol-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
- 60 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-1-fenil-1H-pirazol-3-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-6-metilsulfonyl-pirazin-2-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazole-3-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 1-tritol-1H-indazole-3-carboxílico;
- éster metílico de ácido 6-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzil)-hidrazinocarbonil]-nicotínico;
- 65 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico;
- N-[2-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C-]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C-3-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 Ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico;
 5 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinilmetil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-methanesulfonylmetil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metilamnometil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metilsulfonylmetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 10 N'-(2-allyloximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico-4-metil-benzoico;
 N'-(2-acetoxioximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-pirazin-2-carboxílico.

9. El método de la cláusula 8, en el que el complejo receptor de ecdisona es un complejo receptor de ecdisona quimérico y la construcción de ADN comprende adicionalmente un promotor.

10. El método de la cláusula 8, en el que el sujeto es una planta.

11. El método de la reivindicación 8, en el que el sujeto es un mamífero.

12. Un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora que comprende las etapas de:

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

i) una primera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido híbrido que comprende:

(a) un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y
 (b) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona;

ii) una segunda casete de expresión génica que es capaz de expresarse en la célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido híbrido que comprende:

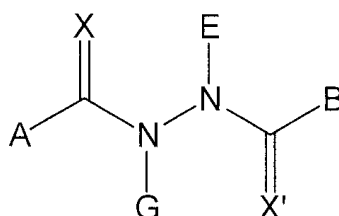
(a) un dominio de transactivación; y
 (b) un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide quimérico; y

iii) una tercera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en una célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende:

(a) un elemento de respuesta reconocido por el dominio de unión al ADN del primer polipéptido híbrido;
 (b) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido; y
 (c) un gen cuya expresión ha de modularse; y

b) introducir en la célula hospedadora:

(1) un compuesto de fórmula:



en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxil; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (- (CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquenilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcanilo (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o

alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcóxicarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) -(CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-) (-N-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxi; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxiálquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcóxicarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) -(CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxi; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcóxicarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -CONR^aR^b; amino; alquilamino (C₁-C₆); dialquilamino (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye -CF₃; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado (C₄-C₁₀) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo (C₅-C₆); fenilo; alquenilo (C₂-C₃); hidroxi, alcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); formilo; alquilsililoxi (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -C=N-OR^a; -C=N-R^d; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b;

en el que R^a, R^b y R^c son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; R^d es hidroxiálquilo (C₁-C₆); y n = 1-4; y

G es H o CN;

con la condición de que:

cuando E es alquilo ramificado (C₄-C₁₀) que contiene un carbono terciario o un ciano alquilo (C₄-C₅) que contiene un carbono terciario;

entonces B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxi; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxiálquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcóxicarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcóxicarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) -(CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo

que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-), (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄;

- (b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcoxycarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcoxycarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; -CONR^aR^b; amino; alquilamino (C₁-C₆); dialquilamino (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye -CF₃; -C=N-NHC(O)NR^aR^b; o -C=N-NHC(O)C(O)NR^aR^b; o
- (c) 5-benzimidazolilo; 1-tritil-5-benzimidazolilo; 3-tritil-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-tritil-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil (C₁-C₆)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo (C₁-C₆) o fenilo; o

(2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- N'-benzoil-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-cloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-3-metoxi-benzoico;
 N'-(4-bromo-3-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-4,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cianometil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-nitro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-4-etil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxy-etil)-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-dimetilamino-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-acetil-2-metil-benzoico;
 Éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-yodo-2-metil-benzoico;
 N'-(3-bromo-5-cloro-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-isopropoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzol;
 N'-(3-bromo-5-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-trifluorometoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 2-cloro-4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-etil-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzofuran-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

- N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-3,5-fluorobenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,4-di-
 5 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-6-metil-isonicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-benzoico;
 10 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-yodo-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-4-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 15 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 20 N'-terc-butil-N'-(3-metil-2,3-dihidro-benzo [1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(5-bromo-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-cloro-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-(benzotiazol-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(6-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 30 N'-(4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-metil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(6-cloro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3,6-trifluoro-benzoico;
 35 N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-difluoro-benzoico;
 40 N'-terc-butil-N'-(3,4,5-trimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cyano-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido benzoico;
 45 éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinol]-2-metil-propónico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 50 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-amino-3-metoxi-benzoico;
 éster 3-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-5-metil-bencílico de ácido acético;
 éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(2,3,4-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 55 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 60 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-fluoro-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,5-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4-trifluoro-benzoico;
 65 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;

- N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-fluoro-benzoico;
 5 éster 3-[N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 5-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 10 N-terc-butil-N'-(4-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,2,5]oxadiazole-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-5-nitro-benzoico;
 15 N-terc-butil-N'-(3-metil-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-nitro-benzil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 20 N-terc-butil-N'-(4-etil-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,4,5-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 25 N-terc-butil-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metoxi-2-(2,2,2-trifluoro-etoxi)-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-cloro-6-metil-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 30 N-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(1H-indol-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 35 N-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-(ciano-dimetil-metil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metoximetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(hidroxiimino-metil)-5-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 40 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)C(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4,5-trifluoro-benzoico;
 45 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-trifluorometil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4-difluoro-benzoico;
 50 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 éster 4-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 55 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 60 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 65 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;

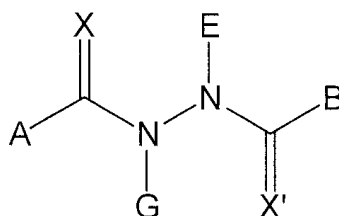
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(3,5-dimetilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil) hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 5 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 10 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;
- N'-(1-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-pirimidin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dimetoxi-piridazin-4-carboxílico;
- 15 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dicloro-piridazin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido piridazin-4-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-piridazin-4-carboxílico, del regioisómero de piridazina;
- N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- 20 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- 25 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetilpropil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
- N'-(terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
- N'-(3,5-bis-hidroxi-metil-benzoil)-N'-(terc-butil-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxi-etil)-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
- 30 Ácido 5-[N'-(4-acetil-benzoil)-N-terc-butil-hidrazinocarbonil]-isofáltico;
- N'-(terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
- ácido 2-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-bencensulfónico;
- N-terc-butil-N-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- 35 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,2,2-trimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
- N'-benzoil-N'-(1-etil-pentil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
- N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
- N'-(terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 40 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metansulfinil-benzoico;
- N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dixnetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N-terc-butil-N-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 6-metil-piridin-2-carboxílico;
- 45 N'-(terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
- N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-metoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- 50 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
- N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
- 55 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3-)tritol-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-1-fenil-1H-pirazol-3-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-6-metilsulfonil-pirazin-2-carboxílico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazole-3-carboxílico;
- 60 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 1-tritol-1H-indazole-3-carboxílico;
- éster metílico de ácido 6-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzil)-hidrazinocarbonil]-nicotínico;
- N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico;
- N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- 65 N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C-3-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;

Ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico;
 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinilmetil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-methanesulfonylmetil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 5 N-terc-butil-N'-(2-metilamnometil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metilsulfonylmetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-allyloximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 10 N'-(2-acetoxioximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-pirazin-2-carboxílico.

13. Un método para producir un polipéptido que comprende las etapas de:

15 a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a:

(1) un compuesto de fórmula:



en la que X y X' son independientemente O o S;

A es fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcocixarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-) (-N-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino (-NR^aR^b); alquilaminoalquilo (-CH₂)_nNR^aR^b); alquilo (C₁-C₆); haloalquilo (C₁-C₆); cianoalquilo (C₁-C₆); hidroxialquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); fenoxi; haloalcoxi (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alqueniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆) alcoxi (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); (C₂-C₆)alquenilo opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo (C₁-C₄) o alcoxi (C₁-C₄); alquinilo (C₂-C₆) opcionalmente sustituido con halo o alquilo (C₁-C₄); formilo; carboxi; alquilcarbonilo (C₁-C₆); haloalquilcarbonilo (C₁-C₆); benzoilo; alcocixarbonilo (C₁-C₆); haloalcoxycarbonilo (C₁-C₆); alcaniloxi (C₁-C₆) (-OCOR^a); carboxamido (-CONR^aR^b); amido (-NR^aCOR^b); alcoxycarbonilamino (-NR^aCO₂R^b); alquilaminocarbonilamino (-NR^aCONR^bR^c); mercapto; alquiltio (C₁-C₆); alquilsulfonilo (C₁-C₆); alquilsulfonil (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆); alquilsulfóxido (C₁-C₆) (-S(O)R^a); alquilsulfóxido (C₁-C₆) alquilo (C₁-C₆) (-CH₂)_nS(O)R^a); sulfamido (-SO₂NR^aR^b); -SO₃H; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en (-OCH₂O-), (-OCH(CH₃)O-), (-OCH₂CH₂O-), (-OCH(CH₃)CH₂O-), (-S-CH=N-), (-CH₂OCH₂O-), (-O(CH₂)₃-), (=N-O-N=), (-C=CH-NH-), (-OCF₂O-) (-NH-CH=N-), (-CH₂CH₂O-), y (-CH₂)₄);

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo (C₁-C₆); alcoxi (C₁-C₆); tioalcoxi (C₁-C₆); carboxi; alcocixarbonilo (C₁-C₆); carboxialquilo (C₁-C₆); alcoxycarbonilalquilo (C₁-C₆) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en

cada grupo alquilo; $-\text{CONR}^a\text{R}^b$; amino; alquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$); dialquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-trítill-5-benzimidazolilo; 3-trítill-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-trítill-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-1H-indol-2-ilo;

E es un alquilo ramificado ($\text{C}_4\text{-C}_{10}$) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo ($\text{C}_5\text{-C}_6$); fenilo; alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_3$); hidroxilo, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxi; alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); formilo; trialkilsililoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-\text{C}=\text{N}-\text{OR}^a$; $-\text{C}=\text{N}-\text{R}^d$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$;

en el que R^a , R^b y R^c son independientemente H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo; R^d es hidroxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); y $n = 1-4$; y

G es H o CN;

con la condición de que:

cuando E es alquilo ramificado ($\text{C}_4\text{-C}_{10}$) que contiene un carbono terciario o un ciano alquilo ($\text{C}_4\text{-C}_5$) que contiene un carbono terciario;

entonces B es

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; hidroxilo; amino ($-\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilaminoalquilo ($-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^a\text{R}^b$); alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); cianoalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); hidroxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); fenoxi; haloalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquenoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); ($\text{C}_2\text{-C}_6$)alquenoiloxi opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$); alquinoil ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$); formilo; carboxi; alquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); benzoilo; alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoiloxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^a$); carboxamido ($-\text{CONR}^a\text{R}^b$); amido ($-\text{NR}^a\text{COR}^b$); alcoxycarbonilamino ($-\text{NR}^a\text{CO}_2\text{R}^b$); alquilaminocarbonilamino ($-\text{NR}^a\text{CONR}^b\text{R}^c$); mercapto; alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfonil ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilsulfóxido ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$); alquilsulfóxido ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{O})\text{R}^a$); sulfamido ($-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$); $-\text{SO}_3\text{H}$; o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o amino; o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo que une fenilo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$), ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{S}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$), ($=\text{N}-\text{O}-\text{N}=$), ($-\text{C}=\text{CH}-\text{NH}-$), ($-\text{OCF}_2\text{O}-$), ($-\text{NH}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), y ($-(\text{CH}_2)_4-$);

(b) heterociclo de 6 miembros no sustituido o heterociclo de 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno y 3-5 átomos de carbono nucleares donde los sustituyentes son de uno a tres de los mismos o diferentes halo; nitro; hidroxilo; alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); tioalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxi; alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxycarbonilalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; $-\text{CONR}^a\text{R}^b$; amino; alquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$); dialquilamino ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o $-\text{C}=\text{N}-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$; o

(c) 5-benzimidazolilo; 1-trítill-5-benzimidazolilo; 3-trítill-5-benzimidazolilo; 1H-indazol-3-ilo; 1-trítill-1H-indazol-3-ilo; o 1-alquil ($\text{C}_1\text{-C}_6$)-1H-indol-2-ilo;

en el que R^a y R^b son independientemente H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo; o

(2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

N'-benzoil-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-cloro-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3-cloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-3-metoxi-benzoico;

N'-(4-bromo-3-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida ácido 3-cloro-2-metil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(4-cloro-3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3-cloro-4,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3-cloro-5-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-metoxi-benzoico;

N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;

- N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cianometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-nitro-benzoico;
 5 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-4-etil-benzoico;
 10 N'-terc-butil-N'-(3,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxy-etil)-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-dimetilamino-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-acetil-2-metil-benzoico;
 Éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-yodo-2-metil-benzoico;
 15 N'-(3-bromo-5-cloro-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-isopropoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 20 N'-terc-butil-N'-(2-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzol;
 N'-(3-bromo-5-metil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-5-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metil-3-trifluorometoxi-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-4-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 30 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-cloro-4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3-etil-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzofuran-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 35 N'-terc-butil-N'-(3,5-dicloro-3,5-fluorobenzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,4-dietil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 40 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-6-metil-isonicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-yodo-3-metoxi-benzoico;
 45 N'-terc-butil-N'-(2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(benzo[1,3]dioxol-4-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 50 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-etil-2-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metil-2,3-dihidro-benzo [1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 55 N'-(5-bromo-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-cloro-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 60 N'-(benzotiazol-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(6-metil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 65 N'-terc-butil-N'-(8-metil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;

- N-terc-butil-N'-(6-cloro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-4-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3,6-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-difluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 5 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3,4,5-trimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico;
 10 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cyano-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido benzoico;
 éster etílico de ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinol]-2-metil-propónico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 15 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,1-dimetil-2-oxo-etil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-metoxi-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-amino-3-metoxi-benzoico;
 éster 3-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-5-metil-bencílico de ácido acético;
 20 éster 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propílico de ácido acético;
 N-terc-butil-N'-(2,3,4-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-5-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 25 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-fluoro-5-metil-benzoico;
 30 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,5-difluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4-trifluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;
 35 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4-dicloro-5-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-fluoro-benzoico;
 éster 3-[N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2-metil-fenílico de ácido acético;
 40 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 5-cloro-2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 45 N'-terc-butil-N'-(5-cloro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-croman-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(4-cloro-2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido benzo[1,2,5]oxadiazole-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-cloro-5-nitro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-vinil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-cloro-2-metoxi-benzoico;
 50 N-terc-butil-N'-(1-metil-1H-indol-2-carbonil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-nitro-benzil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-etil-2-fluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 55 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-cloro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dicloro-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,4,5-trifluoro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 60 N'-terc-butil-N'-(2-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-[5-metoxi-2-(2,2,2-trifluoro-etoxi)-benzoil]-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-cloro-6-metil-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-2-fluoro-benzoico;
 65 N-terc-butil-N'-(1H-indol-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;

- N'-terc-butil-N'-(2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3']dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-benzoico;
 N-(ciano-dimetil-metil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-bromo-benzoico;
 5 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metoximetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dicloro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(hidroxiimino-metil)-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-(H₂NC(O)C(O)NHN=CH-5-metil-benzoico;
 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 10 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,4,5-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4,5-trifluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 15 N'-terc-butil-N'-(4-etil-benzo[1,3]dioxol-5-carbonil)-hidrazida del ácido 3-trifluorometil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,4-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-difluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,3,4,5-tetrafluoro-benzoico;
 20 N'-terc-butil-N'-(8-etil-4H-benzo[1,3]dioxin-7-carbonil)-hidrazida del ácido 4-metil-benzoico;
 éster 4-[N'-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-2,6-dimetoxi-fenílico de ácido acético;
 N'-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 25 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2,6-dicloro-isonicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-fluoro-5-trifluorometil-benzoico
 ácido;
 N'-terc-butil-N'-(5-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 30 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-
 6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 35 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-(3,5-dimetilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil) hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 40 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-
 carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-6-trifluorometil-nicotínico;
 N'-terc-butil-N'-(1-metil-2-oxo-6-trifluorometil-1,2-dihidro-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metoxi-2-metil-
 45 benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,6-dimetoxi-pirimidin-4-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dimetoxi-piridazin-4-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,6-dicloro-piridazin-4-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido piridazin-4-carboxílico;
 50 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-piridazin-4-carboxílico, del
 regioisómero de piridazina;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 55 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 60 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetilpropil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(3-metoxi-piridin-4-carbonil)-hidrazida del ácido 3-hidroxi-2-metil-benzoico;
 N'-(3,5-bis-hidroximetil-benzoil)-N'-terc-butil-hidrazida del ácido 4-(1-hidroxi-etil)-benzoico;
 N'-terc-butil-N'-(2-metansulfinil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-etil-3-metoxi-benzoico;
 Ácido 5-[N'-(4-acetil-benzoil)-N-terc-butil-hidrazinocarbonil]-isofáltico;
 65 N'-terc-butil-N'-(2,6-dimetoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 4-fluoro-3-trifluorometil-benzoico;

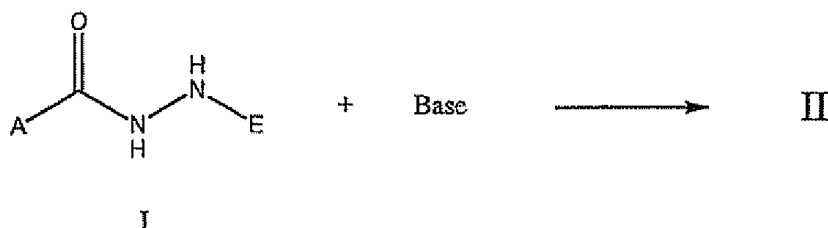
- ácido 2-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazinocarbonil]-bencensulfónico;
 N-terc-butil-N-(5-metil-croman-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1,2,2-trimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3-metil-benzoico;
 5 N'-benzoil-N'-(1-etil-pentil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 2,3-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico,
 N-terc-butil-N'-(5-fluoro-4H-benzo[1,3]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carbonil)-hidrazida del ácido 2-metansulfinil-benzoico;
 10 N'-(ciano-dimetil-metil)-N'-(3,5-dixnetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N-terc-butil-N-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 6-metil-piridin-2-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-2-nitro-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 15 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-metoxi-piridin-3-carbonil)-hidrazida del ácido 4-etil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
 20 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 2-metoxi-nicotínico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1-(o 3-)tritol-1H-benzoimidazol-5-carboxílico;
 25 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-1-fenil-1H-pirazol-3-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3-cloro-6-metilsulfonyl-pirazin-2-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 1H-indazole-3-carboxílico;
 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 1-tritol-1H-indazole-3-carboxílico;
 éster metílico de ácido 6-[N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzil)-hidrazinocarbonil]-nicotínico;
 30 N-terc-butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido pirazin-2-carboxílico;
 N-[2-(terc-butil-dimetil-silanilo)-1,1-dimetil-etil]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-N-[2-(2-hidroxi-etilimino)-1,1-dimetil-etil]-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)NHN=C)(CH₃)₂C-]-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-[(H₂NC(O)C(O)NHN=C)(CH₃)₂C-3-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 35 Ácido 2-[N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazino]-2-metil-propiónico;
 N-terc-butil-N'-(2-metansulfinilmetil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-methanesulfonylmetil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-dimetilaminometil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-terc-butil-N'-(2-metilamnometil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 40 N-terc-butil-N'-(3-metoxi-2-metilsulfonylmetil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N'-(2-allyloximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N'-(2-acetoxioximetil-3-metoxi-benzoil)-N-terc-butil-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 45 N-terc butil-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-pirazin-2-carboxílico.

b) introducir en la célula:

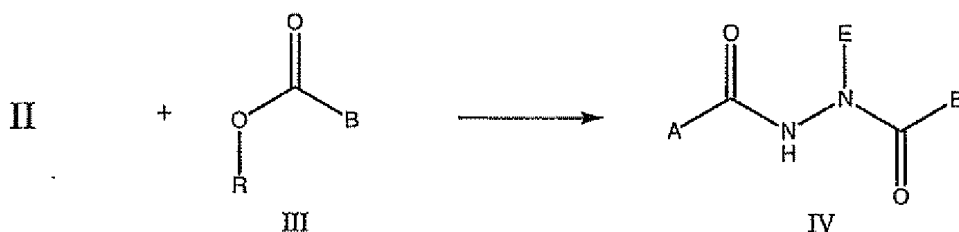
- 1) una construcción de ADN que comprende:
 50 i) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y
 ii) un elemento de respuesta;
 en el que el gen está bajo el control del elemento de respuesta; y
 55 2) un complejo receptor de ecdisona que comprende:
 i) un dominio de unión al ADN;
 ii) un dominio de unión para el ligando; y
 iii) un dominio de transactivación; y
 60 c) exponer la célula al ligando.

14. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (IV) que comprende las etapas de:

- 65 i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I) con una base seleccionada de NaH, KH o una amida MNR^aR^b para producir un producto II, en la que M es Li, Na o K y R^a y R^b son independientemente alquilo (C₁-C₆) o fenilo; y



ii hacer reaccionar el producto (II) de la etapa (i) con un compuesto de fórmula (III) en la que R es fenilo sustituido con tres a cinco del mismo o diferente cloro, fluoro o trifluorometilo;



en la que:

A y B son independientemente

(a) fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 5 H; halo; nitro; ciano; amino ($-\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); alquilaminoalquilo ($-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); cianoalquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); ($\text{C}_1\text{-C}_6$)alcoxi; fenoxi; haloalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alquilenilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$) alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_4$); alquino ($\text{C}_2\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con halo o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$); formilo; haloalquilcarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); benzoilo; alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); haloalcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^{\text{a}}$); carboxamido ($-\text{CONR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); amido ($-\text{NR}^{\text{a}}\text{COR}^{\text{b}}$); alcoxycarbonilamino ($-\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}^{\text{b}}$); alquilaminocarbonilamino ($-\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{CONR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$); sulfamido ($-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o ($-\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); o cuando una o ambas de dos posiciones adyacentes del anillo fenilo están sustituidas, los átomos unidos pueden formar el extremo de un enlace seleccionado del grupo que consiste en ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$), ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}-$), ($-\text{S}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{O}-$), ($-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$), ($=\text{N}-\text{O}-\text{N}=\text{O}$), ($-\text{C}=\text{CH}-\text{NH}-$), ($-\text{OCF}_2\text{O}-$), ($-\text{NH}-\text{CH}=\text{N}-$), ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), y ($-(\text{CH}_2)_4$); o (b) heterociclo de 5 o 6 miembros no sustituido o heterociclo de 5 o 6 miembros sustituido que tiene 1-3 átomos de nitrógeno donde los sustituyentes son de uno a cuatro de los mismos o diferentes halo; nitro; alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); tioalcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); $-\text{CONR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$; amino ($-\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); haloalquilo que incluye $-\text{CF}_3$; trialquilsililo ($\text{SiR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}\text{R}^{\text{c}}$); tritilo ($\text{C}(\text{Ph})_3$); o fenilo no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1 a 3 halo, nitro, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o ($-\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$); o cuando dos posiciones adyacentes están sustituidas, estas posiciones pueden formar un anillo benzo de fusión; y

E es fenilo o alquilo lineal o ramificado ($\text{C}_1\text{-C}_{10}$) no sustituido o sustituido en el que los sustituyentes son independientemente 1-4 ciano; halo; cicloalquilo ($\text{C}_5\text{-C}_6$); fenilo; alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_3$); alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) ($-\text{OCOR}^{\text{a}}$); formilo; trialquilsililo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) que tiene independientemente el número indicado de átomos de carbono en cada grupo alquilo; o $-\text{C}=\text{N}-\text{OR}^{\text{a}}$;

en la que R^{a} , R^{b} y R^{c} son independientemente alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o fenilo y $n = 1-4$.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Intrexon Corporation

<120> Ligandos de diacilhidrazina biodisponibles para modular la expresión de genes exógenos a través de un complejo receptor de ecdisona

<130> P024229EPA

<140> PCT/US2004/005912

<141> 27-02-2004

<150> US 60/455,741

<151> 28-02-2003

<150> US 10/787,906

<151> 26-02-2004

5 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 1054

<212> ADN

<213> *Choristoneura fumiferana*

15 <400> 1

cctgagtgcg tagtaccgga gactcagtcg gccatgaagc ggaaagagaa gaaagcacag	60
aaggagaagg acaaactgcc tgtcagcacg acgacggcgg acgaccacat gccgcccatt	120
atgcagtgctg aacctccacc tcctgaagca gcaaggattc acgaagtggc cccaagggtt	180
ctctccgaca agctgttgga gacaaaccgg cagaaaaaca tccccagtt gacagccaac	240
cagcagttcc ttatcgccag gctcatctgg taccaggacg ggtacgagca gccttctgat	300
gaagatttga agaggattac gcagacgtgg cagcaagcgg acgatgaaa cgaagagtct	360
gacactccct tccgccagat cacagagatg actatcctca cggccaact tatcgtggag	420
ttcgcgaagg gattgccagg gttcgccaag atctcgcagc ctgatcaaat tacgctgctt	480
aaggcttgct caagtgaggt aatgatgctc cgagtcgcgc gacgatacga tgcggcctca	540
gacagtggtc tggtcgcgaa caaccaagcg tacaactcgc acaactaccg caaggctggc	600
atggcctacg tcatcgagga tctactgcac ttctgccggc gcatgtactc tatggcggtg	660
gacaacatcc attacgcgct gctcacggct gtcgtcatct tttctgaccg gccagggttg	720
gagcagccgc aactgggtga agaaatccag cggctactacc tgaatacgtc ccgcatctat	780
atcctgaacc agctgagcgg gtcggcgcgt tcgtccgtca tatacgcaa gatcctctca	840
atcctctctg agctacgcac gctcggcatg caaaactcca acatgtgcat ctccctcaag	900
ctcaagaaca gaaagctgcc gcctttcctc gaggagatct gggatgtggc ggacatgtcg	960
cacacccaac cgccgcctat cctcgagtc cccacgaatc tctagcccct gcgcgcacgc	1020
atcgccgatg ccgcgtccgg ccgcgtgct ctga	1054

<210> 2

20 <211> 441

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

ES 2 566 366 T3

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagetcaag	60
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac	120
tctcccaaaa ccaaaaggtc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg	180
ctagaaagac tggaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt	240
ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat	300
aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta	360
acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaagg	420
caaagacagt tgactgtatc g	441

<210> 3

<211> 538

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 3

tcgagggccc ctgcaggcca attctaccgg gtaggggagg cgcttttccc aaggcagtct	60
ggagcatgcg ctttagcagc cccgctggca cttggcgcta cacaagtggc ctctggcctc	120
gcacacattc cacatccacc ggtagcgcca accggctccg ttctttggtg gcccttgcg	180
gccaccttct actcctcccc tagtcaggaa gttccccccc gcccgcgagc tcgcgtcgtg	240
caggacgtga caaatggaag tagcacgtct cactagtctc gtgcagatgg acagcacgcg	300
tgagcaatgg aagcgggtag gcctttgggg cagcggccaa tagcagcttt gtccttgcg	360
tttctgggct cagaggctgg gaaggggtgg gtccgggggc gggctcaggg gcgggctcag	420
gggcggggcg ggcggaagg tcctcccgag gcccggcatt ctgcgacgt tcaaaagcg	480
acgtctgccg cgtgtttctc ctcttcctca tctccgggccc ttctgacctg cagccaat	538

<210> 4

<211> 720

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

gcccccgagg agatgcctgt ggacaggatc ctggaggcag agcttgctgt ggaacagaag	60
agtgaccagg gcgttgaggg tcctggggga accgggggta gcggcagcag cccaaatgac	120
cctgtgacta acatctgtca ggcagctgac aaacagctat tcacgcttgt tgagtgggcg	180
aagaggatcc cacacttttc ctcttgcct ctggatgatc aggtcatatt gctgcgggca	240
ggctggaatg aactcctcat tgctccttt tcacaccgat ccattgatgt tcgagatggc	300
atctccttg ccacaggctc tcacgtgcac cgcaactcag ccatttcagc aggagtagga	360

ES 2 566 366 T3

	gccatctttg atcgggtgct gacagagcta gtgtccaaaa tgcgtgacat gaggatggac	420
	aagacagagc ttggctgcct gagggcaatc attctgttta atccagatgc caagggcctc	480
	tccaacccta gtgagggtgga ggtcctgcgg gagaaagtgt atgcatcact ggagacctac	540
	tgcaaacaga agtaccctga gcagcaggga cggtttgcca agctgctgct acgtcttcct	600
	gccctccggt ccattggcct taagtgtcta gagcatctgt ttttcttcaa gctcattggt	660
	gacaccccca tcgacacctt cctcatggag atgcttgagg ctcccatca actggcctga	720
	<210> 5	
	<211> 635	
5	<212> ADN	
	<213> Locusta migratoria	
	<400> 5	
	tgcatacaga catgcctgtt gaacgcatac ttgaagctga aaaacgagtg gagtgcaaag	60
	cagaaaacca agtggaatat gagctggtgg agtgggctaa acacatcccg cacttcacat	120
	ccctacctct ggaggaccag gttctcctcc tcagagcagg ttggaatgaa ctgctaattg	180
	cagcattttc acatcgatct gtagatgtta aagatggcat agtacttgcc actggtctca	240
	cagtgcacg aaattctgcc catcaagctg gagtcggcac aatatttgac agagtgttga	300
	cagaactggg agcaaagatg agagaaatga aaatggataa aactgaactt ggctgcttgc	360
	gatctgttat tcttttcaat ccagagggtga ggggtttgaa atccgccag gaagttgaac	420
	ttctacgtga aaaagtatat gccgctttgg aagaatatac tagaacaaca catcccgatg	480
	aaccaggaag atttgcaaaa cttttgcttc gtctgccttc tttacgttcc ataggcctta	540
	agtgtttgga gcatttgttt ttctttcgcc ttattggaga tgttccaatt gatacgttcc	600
10	tgatggagat gcttgaatca ccttctgatt cataa	635
	<210> 6	
	<211> 271	
	<212> ADN	
15	<213> herpes simplex virus 7	
	<400> 6	
	atgggcccta aaaagaagcg taaagtcgcc ccccgaccg atgtcagcct gggggacgag	60
	ctccacttag acggcgagga cgtggcgatg gcgcgatgcc acgcgctaga cgatttcgat	120
	ctggacatgt tgggggacgg ggattccccg gggccgggat ttacccccca cgactccgcc	180
	ccctacggcg ctctggatat ggccgacttc gagtttgagc agatgtttac cgatgccctt	240
20	ggaattgacg agtacgggtgg ggaattcccc g	271
	<210> 7	
	<211> 1167	
	<212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	

ES 2 566 366 T3

tgaggetccg gtgcccgctca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg	60
gggggagggg tccgcaattg aaccgggtgcc tagagaaggt ggcgcggggg aaactgggaa	120
agtgatgtcg tgtactggct cgcgcctttt cccgaggggtg ggggagaacc gtatataagt	180
gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacggggttg ccgccagaac acaggtaagt	240
gccgtgtgtg gttcccgcg gcttggcctc tttacgggtt atggcccttg cgtgccttga	300
attacttcca cctggctcca gtacgtgatt cttgatcccg agctggagcc aggggcgggc	360
cttgcgcttt aggagcccct tcgcctcgtg cttgagttga ggcctggcct gggcgtggg	420
gccgcgcgt gcgaatctgg tggcaccttc gcgcctgtct cgctgcttc gataagtctc	480
tagccattta aaatTTTTga tgacctgctg cgacgctttt tttctggcaa gatagtcttg	540
taaagcggg ccaggatctg cacactggta tttcggtttt tggggccgcg gccggcgacg	600
ggggccgtgc gtcccagcgc acatgttcgg cgaggcgggg cctgcgagcg cggccaccga	660
gaatcggacg ggggtagtct caagctggcc ggcctgctct ggtgcctggc ctcgcgccgc	720
cgtgtatcgc cccgccctgg gcggcaaggc tggcccggtc ggcaccagtt gcgtgagcgg	780
aaagatggcc gcttcccggc cctgctccag ggggctcaaa atggaggacg cggcgtcgg	840
gagagcgggc ggggtgagtca cccacacaaa ggaaaagggc ctttccgtcc tcagccgtcg	900
cttcatgtga ctccacggag taccgggcgc cgtccaggca cctcgattag ttctggagct	960
tttggagtac gtcgtcttta ggttgggggg aggggtttta tgcgatggag tttccccaca	1020
ctgagtgggt ggagactgaa gttaggccag cttggcactt gatgtaattc tcgttggaat	1080
ttgccctttt tgagtttga tcttggttca ttctcaagcc tcagacagtg gttcaaagtt	1140
tttttcttcc atttcaggtg tcgtgaa	1167

<210> 8

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento de respuesta de GAL4

10

<400> 8

ggagtactgt cctccgagc 19

<210> 9

15 <211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Promotor sintético

<400> 9

tatata 6

25 <210> 10

<211> 1653

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> gen de luciferasa

ES 2 566 366 T3

<400> 10

```

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga      60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctgggtcc tggacaatt      120
gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc      180
gttcggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta      240
tgcagtgaat actctcttca attctttatg ccggtgttg ggcgttatt tatcgagtt      300
gcagttgagc ccggaacga cttttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt      360
tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttg aaaaaatttt gaacgtgcaa      420
aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga      480
tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat      540
tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga      600
tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgctg cagattctcg      660
catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactgcat ttttaagtgt      720
gttccattcc atcacggtt tggaatgtt actacactcg gatatttgat atgtggattt      780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac      840
aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagcactctg      900
attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggagc acctcttctg      960
aaagaagtcg ggaagcggg tgcacaaacg tccatcttc cagggatacg acaaggatat      1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaaccgggc      1080
gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga taccgggaaa      1140
acgctgggag ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt      1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct      1260
ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct      1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc ccgctgaat tggaatcgat attgttacia      1380
caccaccaaa tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttccc acgatgacgc cggatgaactt      1440
cccgccgccc ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat      1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgag gaggagttgt gtttgtggac      1560
gaagtaccga aaggtcttac cggaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata      1620
aaggccaaga agggcgaaa gtccaaattg taa      1653

```

5

<210> 11
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 11

ES 2 566 366 T3

```

aagcgggaag ctgtgcagga ggagcggcag cggggcaagg accggaatga gaacgaggtg      60
gagtccacca gcagtgccaa cgaggacatg cctgtagaga agattctgga agccgagctt      120
gctgtcgagc ccaagactga gacatacgtg gaggcaaaca tggggctgaa cccagctca      180
ccaaatgacc ctgttaccaa catctgtcaa gcagcagaca agcagctctt cactcttgtg      240
gagtgggcca agaggatccc acacttttct gagctgcccc tagacgacca ggtcatcctg      300
ctacgggcag gctggaacga gctgctgac gcctccttct cccaccgctc catagctgtg      360
aaagatggga ttctcctggc caccggcctg cacgtacacc ggaacagcgc tcacagtgtc      420
gggtggggcg ccatctttga cagggtgcta acagagctgg tgtctaagat gctgacatg      480
cagatggaca agacggagct gggctgcctg cgagccattg tctgttcaa ccctgactct      540
aaggggctct caaacctgc tgaggtggag gcgttgaggg agaaggtgta tgcgtcacta      600
gaagcgtact gcaaacacaa gtaccctgag cagccgggca ggtttgcaa gctgctgctc      660
cgcctgctg cactgcgttc catcgggctc aagtgcctgg agcacctgtt cttcttcaag      720
ctcatcgggg acacgcccac cgacaccttc ctcattggaga tgctggaggc accacatcaa      780
gccacc                                           786

```

<210> 12
 <211> 1560
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

atgctgctgc tgctgctgct gctgggcctg aggctacagc tctccctggg catcatccca      60
gttgaggagg agaaccggga cttctggaac cgcgaggcag ccgaggccct gggtgccgcc      120
aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttcct gggcgatggg      180
atgggggtgt ctacggtgac agctgccagg atcctaaaag ggcagaagaa ggacaaactg      240
gggcctgaga taccctggc catggaccgc ttcccatatg tggctctgtc caagacatac      300
aatgtagaca aacatgtgcc agacagtgga gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc      360
aagggcaact tccagaccat tggcttgagt gcagccggcc gctttaacca gtgcaacacg      420
acacgggca acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcagtg      480
ggagtggtaa ccaccacacg agtgcagcac gcctcgccag ccggcaccta cggccacacg      540
gtgaaccgca actggtactc ggacggcgac gtgcctgcct cggcccgcca ggaggggtgc      600
caggacatcg ctacgcagct catctccaac atggacattg acgtgatcct aggtggaggc      660

```

ES 2 566 366 T3

	cgaaagtaca tgtttcgcacat gggaacccca gacctgagat acccagatga ctacagccaa	720
	ggtgggacca ggctggacgg gaagaatctg gtgcaggaat ggctggcgaa gcgccagggt	780
	gcccgggatg tgtggaaccg cactgagctc atgcaggctt ccctggaccc gtctgtgacc	840
	catctcatgg gtctctttga gcctggagac atgaaatacg agatccaccg agactccaca	900
	ctggaccctt ccctgatgga gatgacagag gctgccctgc gcctgctgag caggaacccc	960
	cgcggttctt tcctcttcgt ggaggggtgt cgcatcgacc atgggtcatca tgaaagcagg	1020
	gcttaccggg cactgactga gacgatcatg ttcgacgacg ccattgagag ggcgggccag	1080
	ctcaccagcg aggaggacac gctgagcctc gtcactgccg accactccca cgtcttctcc	1140
	ttcggagggt accccctgcg agggagctcc atcttcgggc tggcccttgg caaggcccgg	1200
	gacaggaagg cctacacggt cctcctatac ggaaacggtc caggctatgt gctcaaggac	1260
	ggcgcccggc cggatgttac cgagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gcagcagtca	1320
	gcagtgcccc tggacgaaga gaccacgca ggcgaggacg tggcgggtgt cgcgcgcggc	1380
	ccgcaggcgc acctggttca cggcgtgcag gacgagacct tcatagcgca cgtcatggcc	1440
	ttcgccgcct gcctggagcc ctacaccgcc tgcgacctgg cgcccccgcc cggcaccacc	1500
	gacgcccgcg acccgggtta ctctagagtc gggcgggccg gccgcttcga gcagacatga	1560
5	<210> 13 <211> 117 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> elemento de respuesta	
	<400> 13	
	gcggagtact gtctccgag cggagtactg tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg	60
	gagtactgtc ctccgagcgg agtactgtcc tccgagcgga gtactgtcct ccgagcg	117
15	<210> 14 <211> 136 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
20	<400> 14	
	cttttggtga ctaagtcaat aatcagaatc agcagggttg gagtcagctt ggcagggatc	60
	agcagcctgg gttggaagga gggggataaa aagccccttc accaggagaa gccgtcacac	120
	agatccacaa gctcct	136
25	<210> 15 <211> 659 <212> ADN <213> <i>Citomegalovirus sp</i>	
30	<400> 15	
	tcaatatggg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60

ES 2 566 366 T3

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatatg gctcatgtcc	120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga	420
cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg	480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac	540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaact	659

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 10 N'-(3,5-dimetoxi-4-metilbenzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
 N'-(1-terc-butil-butil)-N'-(3,5-dimetoxi-4-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 5-etil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico;
- 15 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
- 20 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxibenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
- 25 N-(2,2-dimetil-1-fenil-propil)-N'-(4-etil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico;
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metil-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico; y
 N-(1-terc-butil-pentil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetoxi-4-metil-benzoico.

2. Un compuesto de la reivindicación 1, que es N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(3-metoxi-2-metilbenzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico.

3. El compuesto de la reivindicación 1, que es N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico.

35 4. El compuesto de la reivindicación 1, que es N'-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-hidrazida del ácido 5-metil-2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-carboxílico.

5. El compuesto de la reivindicación 1, que es N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico.

40 6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 7. Un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora aislada, en el que la célula hospedadora incluye una primera casete de expresión génica que comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende:

- (i) un dominio de transactivación;
 (ii) un dominio de unión al ADN; y
 50 (iii) un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H;

una segunda casete de expresión génica que comprende:

- (i) un elemento de respuesta capaz de unirse a dicho dominio de unión al ADN;
 55 (ii) un promotor que se activa por el dominio de transactivación; y
 (iii) dicho gen diana;

comprendiendo el método poner en contacto dicha célula hospedadora con un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

60 8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la condificación de proteínas biológicamente activas para el tratamiento de enfermedades, que comprende modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto.

65 9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad es cáncer o un trastorno genético.

10. El compuesto de la reivindicación 8, en el que dichos uno o más genes exógenos codifican proteínas secretoras, enzimas, proteínas reguladoras, receptores de la superficie celular, factores de coagulación de la sangre, hormonas, citocinas, sustancias inhibidoras, toxina de la difteria, toxina colérica, anticuerpos monoclonales o proteasas.
- 5 11. El compuesto de la reivindicación 10, en el que dichos uno o más genes exógenos codifican citocinas o linfocinas tales como interferones, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, factor 1 estimulante de colonias, factor de necrosis tumoral y eritropoyetina.
- 10 12. El compuesto de la reivindicación 10, en el que dichas enzimas metabolizan un sustrato a partir de una sustancia tóxica hacia una sustancia no tóxica o metabolizan un sustrato desde una sustancia inactiva hacia una sustancia activa; en el que dichas hormonas son insulina, hormona paratiroidea, factor liberador de la hormona luteinizante, inhibinas alfa y beta seminales u hormona del crecimiento humana; o en el que dicha sustancia inhibidora es alfa1-antitripsina.
- 15 13. Un método para regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico no animal o no humano que comprende poner en contacto un ligando con un complejo receptor de ecdisona dentro de las células del sujeto, en el que las células contienen adicionalmente una secuencia de unión al ADN para el complejo receptor de ecdisona cuando en combinación con el ligando y en el que la formación del complejo de complejo receptor de ecdisona-ligando-secuencia de unión al ADN induce la expresión del gen y donde el ligando es un compuesto de
- 20 una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho complejo receptor de ecdisona es un complejo receptor de ecdisona quimérico y dicha construcción de ADN comprende adicionalmente un promotor.
- 25 15. El método de la reivindicación 13, en el que el sujeto es una planta.
16. Un método para modular la expresión de un gen en una célula hospedadora aislada que comprende las etapas de:
- 30 a) introducir en la célula hospedadora un sistema de modulación de la expresión génica que comprende:
- i) una primera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido híbrido que comprende:
- 35 (a) un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y
- (b) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona;
- ii) una segunda casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido híbrido que comprende:
- 40 (a) un dominio de transactivación; y
- (b) un dominio de unión al ligando del receptor X del retinoide quimérico; y
- 45 iii) una tercera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende:
- (a) un elemento de respuesta reconocido por dicho dominio de unión al ADN del primer polipéptido híbrido;
- (b) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación del segundo polipéptido híbrido; y
- 50 (c) un gen cuya expresión ha de modularse; y
- b) introducir en la célula hospedadora un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
17. Un método para producir un polipéptido en una célula hospedadora aislada que comprende las etapas de:
- 55 a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
- b) introducir en la célula:
- 60 1) una construcción de ADN que comprende:
- i) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y
- ii) un elemento de respuesta;
- 65 en el que el gen está bajo el control del elemento de respuesta; y
- 2) una construcción de ADN que codifica un complejo receptor de ecdisona que comprende:

- i) un dominio de unión al ADN;
- ii) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona; y
- iii) un dominio de transactivación; y

5 c) exponer la célula a dicho compuesto.

18. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para:

10 1) modular la expresión de un gen en una célula hospedadora, que comprende poner en contacto dicha célula hospedadora con dicho compuesto, en la que dicha célula hospedadora incluye una primera casete de expresión génica que comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende:

- (i) un dominio de transactivación;
- (ii) un dominio de unión al ADN; y
- 15 (iii) un dominio de unión al ligando del receptor nuclear del Grupo H;

una segunda casete de expresión génica que comprende:

- (i) un elemento de respuesta capaz de unirse a dicho dominio de unión al ADN;
- 20 (ii) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación; y
- (iii) dicho gen diana;

2) modular la expresión de uno o más genes exógenos en un sujeto;

3) regular la expresión génica endógena o heteróloga en un sujeto transgénico que comprende poner en contacto
25 dicho compuesto con un complejo receptor de ecdisona en las células de dicho sujeto, en el que dichas células contienen adicionalmente una secuencia de unión al ADN para dicho complejo receptor de ecdisona que junto con dicho compuesto y en el que la formación de un complejo de complejo receptor de ecdisona-compuesto-secuencia de unión al ADN induce la expresión de dicho gen;

4) modular la expresión de un gen en una célula hospedadora que comprende las etapas de:

30 a) introducir en dicha célula hospedadora un sistema de modulación de la expresión génica que comprende:

i) una primera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido híbrido que comprende:

- 35 (a) un dominio de unión al ADN que reconoce un elemento de respuesta asociado a un gen cuya expresión ha de modularse; y
- (b) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona;

40 ii) una segunda casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido híbrido que comprende:

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

iii) una tercera casete de expresión génica que es capaz de expresarse en dicha célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende:

- 50 (a) un elemento de respuesta reconocido por dicho dominio de unión al ADN de dicho primer polipéptido híbrido;
- (b) un promotor que se activa por dicho dominio de transactivación de dicho segundo polipéptido híbrido; y
- (c) un gen cuya expresión ha de modularse; y

b) introducir en dicha célula hospedadora dicho compuesto; o

55 5) producir un polipéptido que comprende las etapas de:

- a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a dicho compuesto;
- b) introducir en dicha célula:

60 1) una construcción de ADN que comprende:

- i) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y
- ii) un elemento de respuesta;

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

2) una construcción de ADN que codifica un complejo receptor de ecdisona que comprende:

- i) un dominio de unión al ADN;
- ii) un dominio de unión al ligando del receptor de ecdisona; y
- iii) un dominio de transactivación; y

5 c) exponer dicha célula a dicho compuesto.

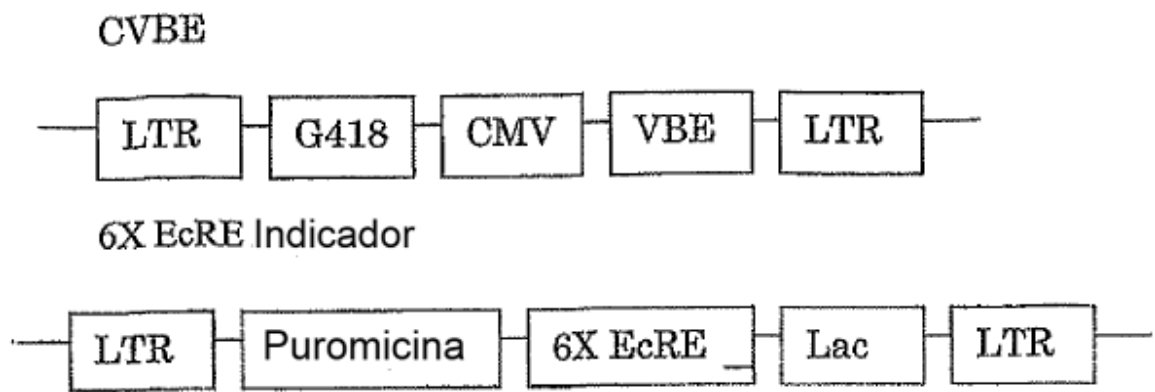


FIGURA 1