

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 176**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/535</b>	(2006.01)	<b>C07D 317/60</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4525</b>	(2006.01)	<b>C07D 403/14</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/4453</b>	(2006.01)	<b>C07D 405/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/453</b>	(2006.01)	<b>C07C 235/34</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/5375</b>	(2006.01)	<b>C07C 235/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/495</b>	(2006.01)	<b>C07D 211/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/496</b>	(2006.01)	<b>C07D 307/52</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/40</b>	(2006.01)	<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/404</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>C07D 317/54</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/445</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011** **E 15188438 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 3002008**

54 Título: **Compuestos amido como moduladores de ROR $\gamma$ t y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**11.03.2010 US 339974 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2019**

73 Titular/es:

**NEW YORK UNIVERSITY (50.0%)  
70 Washington Square South  
New York, NY 10012, US y  
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF  
AMERICA, AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND  
HUMAN SERVICES, NATIONAL INSTITUTES OF  
HEALTH, OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LITTMAN, DAN;  
HUH, JUN R.;  
HUANG, WENWEI;  
HUANG, RUILI y  
ENGLUND, ERIKA ELAINE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 703 176 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

Compuestos amido como moduladores de ROR $\gamma$  y usos de los mismos

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

Esta invención se refiere a compuestos amido capaces de modular la actividad de ROR $\gamma$  y usos de tales compuestos para tratar enfermedades o afecciones relacionadas con la actividad de ROR $\gamma$ . Más particularmente, los compuestos amido se pueden usar para disminuir la inflamación asociada con una enfermedad o afección inflamatoria o para reducir los síntomas asociados con un trastorno autoinmune. También se incluyen en el presente documento composiciones de compuestos amido, composiciones farmacéuticas de compuestos amido, ensayos y procedimientos para usar los mismos para identificar compuestos capaces de modular la actividad de ROR $\gamma$ .

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15 El receptor nuclear huérfano (ROR) relacionado con el receptor de ácido retinoico ROR $\gamma$  y su isoforma ROR $\gamma$ t (colectivamente «ROR $\gamma$ /yt») desempeñan un papel importante en la regulación de una diversidad de sistemas biológicos. Para ilustrar, ROR $\gamma$ t tiene un papel central en el desarrollo del sistema inmunológico, la homeostasis y las respuestas a los patógenos microbianos. Por ejemplo, se requiere ROR $\gamma$ t para la diferenciación de las células Th17  
 20 (Ivanov, Il y col. Cell, 2006, 126, 1121-33), un subconjunto de linfocitos T auxiliares que protegen al huésped de la infección mediante la secreción de citocinas inflamatorias tales como IL-17, IL-17 (también denominada IL-17A), IL-17F, IL-22 y TNF $\alpha$ . Estas citocinas son proteínas de señalización que han demostrado ser esenciales en la regulación de numerosas respuestas inmunitarias, incluidas las respuestas inflamatorias a los antígenos. También se ha demostrado recientemente que las células Th17 tienen funciones importantes en la activación y la dirección de las  
 25 respuestas inmunes en una diversidad de enfermedades autoinmunes, tal como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), artritis inducida por colágeno (CIA), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), cáncer (Weaver, C. y col. Ann. Rev. Immunol., 2007, 25, 821-52; Kryczek, I. y col. J. Immunol., 2007, 178, 6730-3; Cua, D. J. y col. Nature, 2003, 421, 744-8; Langrish, C. L. y col. J. Exp. Med., 2005, 201, 233-40; Yen, D. y col. J. Clin. Invest., 2006, 116, 1310-6), y enfermedad de injerto contra huésped (Carlson, M.J. y col. Blood, 28 de octubre de 2008. [Epub antes de la publicación impresa]; Kappel, L.W. y col. Blood, 17 de octubre de 2008. [Epub antes de la publicación impresa]). Las células Th17 también se han visto implicadas en el asma, la psoriasis, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple (Tzartos, J.S., y col. Am. J. Pathology, 2008, 172, 146-55; Yu, J.J., y Gaffen, S.L. Front. Biosci., 2008, 13, 170-77; y Zheng, Y. y col. Nature, 2007, 445, 648-51), y la enfermedad de Crohn (Duerr, R.H., y col. Science, 2006, 314, 1461-63). Adicionalmente, se ha demostrado que los ratones defectuosos para la expresión de ROR $\gamma$ t carecen de células  
 35 Th17 y son resistentes a una diversidad de enfermedades autoinmunes y que la ausencia de microbiota productora de Th17 en el intestino delgado de los ratones altera el equilibrio de células Th17:linfocitos T reguladores (Treg) con implicaciones para la inmunidad intestinal, la tolerancia y la susceptibilidad a las enfermedades inflamatorias del intestino (Ivanov, I.I. Cell Host & Microbe, 2008, 4, 337-49).

40 Se sabe que la formación de agregados de células inmunitarias, como criptoparches (CP) y folículos linfoides aislados (ILF), que contienen células que expresan ROR $\gamma$ t, es un paso vital en muchas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, se requieren CP e ILF para la inmunidad de la mucosa y para la producción del anticuerpo intestinal IgA. Dichas respuestas inmunitarias pueden dar como resultado inflamación en diversas enfermedades, tal como la enfermedad de Crohn. La capacidad de inhibir dichas respuestas inmunitarias mediante la inhibición de la formación de agregados  
 45 de células inmunitarias puede ofrecer otra forma de tratar enfermedades asociadas con dichas respuestas.

También se ha demostrado que los linfocitos T desempeñan una función en enfermedades caracterizadas por la pérdida y la degradación ósea, tal como la osteoartritis. Por ejemplo, en la artritis autoinmune, la activación de linfocitos T dar como resultado la destrucción ósea mediada por los osteoclastos. Se ha demostrado que Th17, cuya  
 50 diferenciación está regulada por ROR $\gamma$ t, es osteoclastogénico, lo que vincula la activación de linfocitos T y la reabsorción ósea (Sato, K. y col. J. Ex. Med., 2008, 203, 2673-82). Por lo tanto, la capacidad de regular la diferenciación de células Th17 a través de la modulación de ROR $\gamma$ t puede ofrecer una forma de tratar la pérdida y la degradación ósea, tal como la asociada con una enfermedad autoinmune. Además, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) suprime la formación de osteoclastos degradando rápidamente la proteína adaptadora RANK TRAF6 en la ruta de señalización RANK-RANKL, y se ha demostrado que ROR $\gamma$ t regula negativamente la baja la producción de IFN- $\gamma$  (Ivanov, I.I. y col. Cell, 2006, 126, 1121-33). Por lo tanto, la capacidad de regular la formación de osteoclastos mediante la modulación de la supresión de osteoclastos de IFN- $\gamma$  mediada por ROR $\gamma$ t puede proporcionar procedimientos adicionales para tratar la pérdida y degradación ósea, tal como la asociada con una enfermedad autoinmune (por ejemplo, osteoartritis).

60

- El ritmo circadiano se refiere a una periodicidad aproximadamente diaria en los procedimientos bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento de los seres vivos, incluyendo las plantas, animales, hongos y algunas bacterias. Los miembros de la familia ROR de receptores nucleares huérfanos se han visto implicados en la regulación del control de la función del reloj circadiano mediante la regulación de los genes reloj (Ueda, H. R. y col. Nature, 2002, 418, 534-39; Sato, T. K. y col. Neuron, 2004, 43, 527-37), y ROR $\gamma$ / $\gamma$ t se ha visto implicado en la regulación de genes que rigen el metabolismo circadiano (Kumaki, Y. y col. PNAS, 2008, 105, 14946-51; Liu, C. y col. Nature, 2007, 447, 477-81). Además, se sabe que la expresión del gen ROR $\gamma$  oscila de manera circadiana en tejidos metabólicamente activos tal como el hígado y el tejido adiposo marrón (Yang, X. y col., Cell, 2006, 126, 801-10), lo que confirma adicionalmente que existe una función para ROR $\gamma$  en la regulación de la función circadiana. Por lo tanto, la capacidad de modular la expresión de ROR $\gamma$ / $\gamma$ t también puede dar como resultado la regulación del ritmo circadiano y el tratamiento de trastornos asociados con la alteración del ritmo circadiano. Dado que el ritmo circadiano es esencial para mantener los niveles metabólicos, cuyo desequilibrio está relacionado con la obesidad y la diabetes, los moduladores de ROR $\gamma$ / $\gamma$ t también pueden ser útiles para tratar la obesidad y la diabetes a través de la regulación del ritmo circadiano.
- 15 Kumar y col. describen un compuesto que es un agonista inverso del receptor huérfano  $\alpha$ / $\gamma$  (ROR) relacionado con el receptor de ácido retinoico.

El documento WO2006/007486 describe procedimientos y composiciones para la modulación de la inmunidad intestinal, y procedimientos para potenciar o deprimir la actividad o función de las células inmunitarias mediante la administración de un modulador de la actividad de ROR $\gamma$ t.

Kelin y col. describen un protocolo para producir dihidrocoumarinas y la funcionalización de fenoles a través de una segunda reacción de hidroarilación.

25 Huh y col. describen una serie de difenilpropanamidas que se dice que son antagonistas selectivos de ROR $\gamma$ .

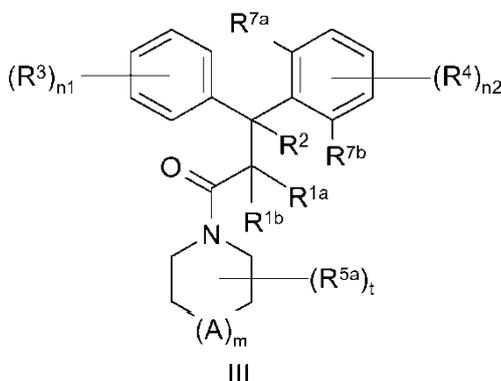
Khan y col. describen un estudio de la relación estructura-actividad de una serie de difenilpropanamida de moduladores selectivos de ROR $\gamma$ .

30 En vista de lo anterior, existe la necesidad de agentes terapéuticos, y las correspondientes composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento relacionados que aborden afecciones causalmente relacionadas con la actividad de ROR $\gamma$ t, y es hacia el cumplimiento y la satisfacción de esa necesidad a la que se dirige la presente invención.

### 35 **RESUMEN DE LA INVENCION**

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que esté fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a los procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia. La presente invención se refiere a compuestos de fórmula III y su uso en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar en un mamífero una enfermedad o afección que está causalmente relacionada con la actividad de ROR $\gamma$  o ROR $\gamma$ t *in vivo*.

45 La presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula III:



donde

A es CH<sub>2</sub> u O; m es 1;

- 5 n<sub>1</sub> es 1, 2, 3, 4 o 5; n<sub>2</sub> es 1, 2, o 3;  
 cada R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o sin sustituir, o CN; o  
 R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> se unen entre sí para formar un anillo de cicloalquilo;  
 R<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o sin sustituir, o arilo;  
 o uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> está unido al C de CR<sup>2</sup> para formar un anillo de ciclopropilo; o R<sup>2</sup> está unido al C de CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup> para  
 10 formar un anillo de ciclopropilo;  
 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente de H, OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin  
 sustituir, acilo sustituido o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio  
 sustituido o sin sustituir, alcoxicarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino  
 sustituido o sin sustituir, arialquilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinilo sustituido,  
 15 sulfanilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo  
 sustituido o sin sustituir, azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir,  
 heteroarilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir,  
 dialquilamino sustituido o sin sustituir, halo, nitro, y tiol; o dos cualesquiera grupos R<sup>3</sup> adyacentes, o dos cualquiera  
 grupos R<sup>4</sup> adyacentes pueden unirse para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico sustituido o sin sustituir;  
 20 cada R<sup>5a</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, halo, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, CN,  
 alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), amido, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido; y t es 0, 1, 2, o 3;  
 R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> son independientemente OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, acilo sustituido  
 o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio sustituido o sin sustituir,  
 alcoxicarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir,  
 25 arialquilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinilo sustituido, sulfanilo sustituido,  
 aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir,  
 azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin  
 sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, dialquilamino sustituido o sin  
 sustituir, halo, nitro, y tio; y  
 30 o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 y estereoisómeros, variantes isotópicas y tautómeros del mismo;  
 con la condición de que
- i) cuando t sea 1, A sea CH<sub>2</sub> cada uno de R<sup>1a</sup>, R<sup>1b</sup> y R<sup>2</sup> sea H, R<sup>4</sup> sea 4-OMe, y uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> sea OH y el otro sea  
 35 OMe; entonces R<sup>5a</sup> sea distinto de 2-Me;
- ii) cuando t sea 0, cada uno de R<sup>1a</sup>, R<sup>1b</sup> y R<sup>2</sup> sea H, R<sup>4</sup> sea 4-OMe o 4-Me, y uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> sea OH y el otro sea  
 OMe o Me; entonces R<sup>3</sup> sea distinto de 4-OMe, 4-NMe<sub>2</sub>, o 3,4-metilendioxi;
- 40 iii) el grupo (R<sup>3</sup>)<sub>n1</sub>-Ph- sea distinto de benzopirano sustituido o sin sustituir.

En una realización particular, con respecto al compuesto de fórmula III, R<sup>7b</sup> es distinto de H.

- 45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un  
 compuesto de fórmula (III) (en lo sucesivo en el presente documento denominado «el compuesto de la presente  
 invención»), y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico. Además, el compuesto de la presente invención útil  
 en las composiciones farmacéuticas y los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento, son  
 todos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con se preparan y se usan.
- 50 En un aspecto adicional, esta invención proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en la  
 prevención, tratamiento o mejora en un mamífero de una enfermedad o afección seleccionada de enfermedad  
 autoinmune, enfermedad inflamatoria, artritis, diabetes, esclerosis múltiple, uveítis, artritis reumatoide, psoriasis, asma,  
 bronquitis, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, infecciones por *H. pylori*, úlceras  
 resultantes de dicha infección, enfermedades inflamatorias del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa,  
 55 esprúe, alergias alimentarias y artritis inducida por colágeno.

En un aspecto adicional de la descripción, se contempla un ensayo para la detección para identificar moduladores de  
 la actividad transcripcional de RORY/yt, comprendiendo el ensayo una primera línea celular de insecto que expresa  
 una proteína de fusión (SEQ ID NO: 2; codificada por la SEQ ID NO: 1) que comprende una secuencia RORY/yt, donde  
 60 la secuencia RORY/yt no comprende el dominio de unión a ADN (DBD) de RORY/yt de longitud completa y un DBD

GAL4 de levadura, donde la expresión de la proteína de fusión está regulada transcripcionalmente por un promotor inducible, y donde la primera línea celular de insecto comprende además un indicador, cuya expresión está regulada positivamente en presencia de la proteína de fusión. Por consiguiente, el componente de la proteína de fusión representativa de las secuencias RORy/yt es una secuencia RORy/yt eliminada por DBD. La proteína de fusión es esencialmente una proteína quimérica donde el DBD de RORy/yt se elimina de las secuencias RORy/yt y se reemplaza con el dominio de unión al ADN DBD GAL4 de levadura. En una realización particular, el dominio de unión al ADN Gal4 (G4DBD) corresponde a los aminoácidos 1 a 147 de la proteína Gal4 y la secuencia RORy/yt eliminada por DBD son los aminoácidos 79 con respecto al extremo carboxilo terminal. Por consiguiente, el G4DBD corresponde a los aminoácidos 1-147 de la SEQ ID NO: 2 y la secuencia RORy/yt eliminada por DBD corresponde a los aminoácidos 148-564 de SEQ ID NO: 2. En una realización particular, el promotor inducible es un promotor inducible por cobre.

En una realización del ensayo, el indicador está regulado transcripcionalmente por una pluralidad de copias del potenciador del sitio de unión a GAL4 (UAS) unido operativamente a las secuencias de ácido nucleico que codifican el indicador. En una realización particular del ensayo, la pluralidad de copias del potenciador del sitio de unión a GAL4 (UAS) está entre 1 y 5 copias. En una realización más particular, el indicador es el indicador de luciferasa de luciérnaga.

En un aspecto del ensayo, la primera línea celular de insecto es la línea celular S2. En otro aspecto del ensayo, la proteína de fusión está codificada por ácidos nucleicos que están integrados en el genoma de la primera línea celular de insecto o codificados por ácidos nucleicos extracromosómicos incorporados en la primera línea celular de insecto. Por consiguiente, el ensayo puede relacionarse con una línea celular transfectada de manera estable o una línea celular transfectada transitoriamente. La elección de la línea celular transfectada de forma estable o transitoria depende, en parte, de la cantidad de compuestos a ensayar y la disponibilidad y el coste de los reactivos de ensayo requeridos.

Como se describe en el presente documento, el ensayo puede comprender además una segunda línea celular de insecto que exprese una segunda proteína de fusión (SEQ ID NO: 4; codificada por la SEQ ID NO: 3) que comprende una secuencia ROR $\alpha$ , donde la secuencia ROR $\alpha$  no comprende el DBD de la secuencia ROR $\alpha$  de longitud completa y un DBD GAL4 de levadura; una tercera línea celular de insecto que exprese una tercera proteína de fusión (SEQ ID NO: 6; codificada por la SEQ ID NO: 5) que comprende una secuencia DHR3, donde la secuencia DHR3 no comprende el dominio de unión al ADN (DBD) de la secuencia DHR3 de longitud completa y un DBD GAL4 de levadura, y una cuarta línea celular de insecto que exprese una cuarta proteína de fusión (SEQ ID NO: 8; codificada por la SEQ ID NO: 7) que comprende un dominio transcripcionalmente activo del activador transcripcional general VP16 y un DBD GAL4 de levadura, donde la expresión de la segunda, tercera y cuarta proteínas de fusión está regulada transcripcionalmente por promotores inducibles. En una realización particular, la secuencia ROR $\alpha$  de ratón eliminada por DBD con los aminoácidos aminoácido 142 con respecto al extremo carboxilo terminal de ROR $\alpha$  de ratón y DHR3 de *Drosophila* eliminado por DBD son los aminoácidos 120 con respecto al extremo carboxilo terminal de DHR3 de *Drosophila*. Por consiguiente, el G4DBD corresponde a los aminoácidos 1-147 de la SEQ ID NOs: 4, 6 y 8, y la secuencia ROR $\alpha$  eliminada por DBD corresponde a los aminoácidos 148-529 de la SEQ ID NO: 4, la secuencia DHR3 eliminada por DBD corresponde a los aminoácidos 148-513 de la SEQ ID NO: 6, y la secuencia VP16 corresponde a los aminoácidos 148-231 de la SEQ ID NO 8. En una realización, los promotores inducibles que regulan la expresión de la primera, segunda, tercera y cuarta proteínas de fusión son promotoras idénticos. En aún otra realización, los promotores inducibles que regulan la expresión de la primera, segunda, tercera y cuarta proteínas de fusión son promotores inducibles por cobre.

Los procedimientos para usar el ensayo de la invención también se incluyen en el presente documento. Dichos procedimientos incluyen aquellos que implican el uso de los sistemas de ensayo basados en células descritos en el presente documento para cribar diversas bibliotecas de compuestos, tales como las disponibles en instituciones de investigación, agencias federales y/o proveedores comerciales, para identificar moduladores de la actividad transcripcional de RORy/yt. Los moduladores de la actividad transcripcional de RORy/yt pueden identificarse basándose en los resultados determinados utilizando el primer sistema de ensayo basado en células de insecto descrito en el presente documento solo o en combinación con al menos uno del segundo, tercero y cuarto sistemas de ensayo basado en células de insecto descritos en el presente documento para identificar compuestos que sean moduladores específicos de la actividad transcripcional de RORy/yt. Los moduladores identificados usando los ensayos descritos en el presente documento pueden identificarse como inhibidores o agonistas de la actividad transcripcional de RORy/yt. Los compuestos identificados utilizando los sistemas basados en células descritos en el presente documento pueden evaluarse en cribados secundarios, también descritos en el presente documento y entendidos en la técnica, para validar su identidad como moduladores genuinos de la actividad transcripcional de RORy/yt.

Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la materia a partir de una consideración de la siguientes

descripción detallada.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- 5 La Figura 1 muestra las estructuras de los compuestos específicos de ROR $\gamma$  con actividad agonista o antagonista inversa.  
La Figura 2 ilustra la actividad inhibitoria específica de ROR $\gamma$  de los compuestos mostrados en la misma y las estructuras de compuestos relacionados que no pueden inhibir la actividad de ROR $\gamma$ .  
La Figura 3 muestra un análisis gráfico del clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) que revela los efectos de los compuestos inhibidores de ROR $\gamma$  en la diferenciación de Th17 de ratón.  
10 La Figura 4 muestra un análisis gráfico FACS que revela que los compuestos inhibidores de ROR $\gamma$  no inhiben la diferenciación de Th1 de ratón.  
La Figura 5 muestra un análisis gráfico FACS que revela que los compuestos inhibidores de ROR $\gamma$  166547 y 166488 inhiben la producción de IL17a dependiente de la sobreexpresión de ROR $\gamma$ , pero no dependiente de ROR $\alpha$ , en  
15 linfocitos T CD4 humanos.  
Las Figuras 6A y B muestran un gráfico de FAC que muestra que (A) el Compuesto NCGC00238427 inhibe selectivamente ROR $\gamma$ . Citometría de flujo de la producción de IL-17a e IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD4 $^+$ T sin tratar de sangre de cordón umbilical (CD45RO $^-$ CD45RA $^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^-$ HLA-DR $^-$ ) transducidos con RORad-IRES-GFP o ROR $\gamma$ t-IRES-GFP el día 1 y analizados el día 6. Las células que expresaban GFP se clasificaron para el análisis. Se añadió DMSO o N2 (3  $\mu$ M) 6-8 h después de la transducción viral; y (B) el Compuesto NCGC00238427 inhibe la diferenciación  
20 de las células Th17 humanas a un nivel tan bajo como 1  $\mu$ M. Citometría de flujo de la producción de IL-17a e IFN- $\gamma$  por linfocitos T sin tratar de sangre de cordón umbilical humanos (CD45RO $^-$ CD45RA $^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^-$ HLA-DR $^-$ ), que se cultivaron durante seis días en presencia de IL2, IL23 e IL1 $\beta$ , y con diversas concentraciones de TGF $\beta$  (ng/ml). Se añadió DMSO o N2 16 horas después de la adición de citocinas.  
25 Las Figuras 7A y B representan (A) la estructura de NCGC00238427 y (B) gráficos que demuestran que la actividad de ROR $\gamma$ t es importante para el mantenimiento de células Th17 humanas. Las células de memoria humanas (CD45RO $^+$ CD45RA $^-$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CCR6 $^+$ CD161 $^+$ ) se purificaron a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos y se cultivaron en presencia de IL-1 $\beta$ , IL-23 e IL-2 durante 6 días con o sin NCGC00238427 (3  $\mu$ M). Tinción intracelular para IFN- $\gamma$  o IL-17a en los linfocitos T CD4 $^+$  de memoria, evaluada el día 6. Cada símbolo (n = 11 o 9, respectivamente) indica un donante separado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student no  
30 pareada de dos colas; IL-17a $^+$ IFN- $\gamma$  $^+$ , no significativo e IL-17a $^+$ IFN- $\gamma$  $^{+/-}$ , p = 0,02.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

#### **35 Definiciones**

Cuando se describen los compuestos, las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y los procedimientos para usar dichos compuestos y composiciones, los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique otra cosa. También debe entenderse que cualquiera de los restos definidos a  
40 continuación puede estar sustituido con una diversidad de sustituyentes, y que las definiciones respectivas pretenden incluir dichos restos sustituidos dentro de su alcance. Debe entenderse además que los términos «grupos» y «radicales» pueden considerarse intercambiables cuando se usan en el presente documento.

«Acilo» se refiere a un radical -C(O)R $^{20}$ , donde R $^{20}$  es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo como se define en el presente documento. Los ejemplos  
45 representativos incluyen formilo, acetilo, ciclohexilcarbonilo, ciclohexilmetilcarbonilo, benzoilo y bencilcarbonilo.

«Acilamino» se refiere a un radical -NR $^{21}$ C(O)R $^{22}$ , donde R $^{21}$  es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo y R $^{22}$  es hidrógeno, alquilo, alcoxi, cicloalquilo, cicloheteroalquilo,  
50 arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo, como se define en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen formilamino, acetilamino, ciclohexilcarbonilamino, ciclohexilmetil-carbonilamino, benzoilamino y bencilcarbonilamino.

«Aciloxi» se refiere al grupo -OC(O)R $^{23}$  donde R $^{23}$  es hidrógeno, alquilo, arilo o cicloalquilo.  
55

«Alquenilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo alquenilo que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino,  
60 aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, ceto,

nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

«Alcoxi» se refiere al grupo -OR<sup>24</sup> donde R<sup>24</sup> es alquilo. Los grupos alcoxi particulares incluyen, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, terc-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi, n-hexoxi y 1,2-dimetilbutoxi.

5

«Alcoxi sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo alcoxi que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, heteroarilo, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

10

«Alcoxycarbonilamino» se refiere al grupo -NR<sup>25</sup>C(O)OR<sup>26</sup>, donde R<sup>25</sup> es hidrógeno, alquilo, arilo o cicloalquilo, y R<sup>26</sup> es alquilo o cicloalquilo.

15

«Alquilo» se refiere a grupos radicales alcano saturados monovalentes que tienen particularmente hasta aproximadamente 11 átomos de carbono, más particularmente como un alquilo inferior, de 1 a 8 átomos de carbono y aún más particularmente, de 1 a 6 átomos de carbono. La cadena de hidrocarburo puede ser de cadena lineal o ramificada. Este término se ilustra por grupos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-hexilo, *n*-octilo y *terc*-octilo. El término «alquilo inferior» se refiere a grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. El término «alquilo» también incluye «cicloalquilos» como se define a continuación.

20

«Alquilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo alquilo que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, heteroarilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

30

«Alquileno» se refiere a grupos radicales alqueno saturados divalentes que tienen de 1 a 11 átomos de carbono y más particularmente de 1 a 6 átomos de carbono que pueden ser de cadena lineal o ramificada. Este término se ilustra por grupos tales como metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), los isómeros de propileno (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-).

35

«Alquileno sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo alquileno que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, halógeno, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

40

«Alquenilo» se refiere a grupos hidrocarbilo olefinicamente insaturados monovalentes que tienen preferiblemente de 2 a 11 átomos de carbono, en particular, de 2 a 8 átomos de carbono, y más particularmente, de 2 a 6 átomos de carbono, que pueden ser de cadena lineal o ramificada y tener al menos 1 y particularmente de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. Los grupos alquenilo particulares incluyen etenilo (-CH=CH<sub>2</sub>), *n*-propenilo (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), isopropenilo (-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>), vinilo y vinilo sustituido.

45

«Alquenileno» se refiere a grupos hidrocarbilo olefinicamente insaturados divalentes que tienen particularmente hasta aproximadamente 11 átomos de carbono y más particularmente de 2 a 6 átomos de carbono que pueden ser de cadena lineal o ramificada y que tienen al menos 1 y particularmente de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. Este término se ilustra por grupos tales como etenileno (-CH=CH-), los isómeros de propenileno (por ejemplo, -CH=CHCH<sub>2</sub>- y -C(CH<sub>3</sub>)=CH- y -CH=C(CH<sub>3</sub>)-).

50

«Alquinilo» se refiere a grupos hidrocarbilo insaturados acetilénicamente o alquínicamente que tienen particularmente de 2 a 11 átomos de carbono, y más particularmente de 2 a 6 átomos de carbono que pueden ser de cadena lineal o ramificada y que tienen al menos 1 y particularmente de 1 a 2 sitios de la insaturación alquinilo. Los ejemplos particulares de grupos alquinilo incluyen acetilénico, etinilo (-C≡CH) y propargilo (-CH<sub>2</sub>C≡CH).

55

60

«Alquinilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo alquinilo que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxicarbonilo, alcoxicarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

«Alcanoílo» o «acilo» como se usa en el presente documento, se refiere al grupo R<sup>27</sup>-C(O)-, donde R<sup>27</sup> es hidrógeno o alquilo como se ha definido anteriormente.

«Arilo» se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Los grupos arilo típicos incluyen grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, crisenno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno y trinaftaleno. Particularmente, un grupo arilo comprende de 6 a 14 átomos de carbono.

«Arilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo arilo que puede estar sustituido con 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxicarbonilo, alquilo, alquilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

«Arilo condensado» se refiere a un arilo que tiene dos de su anillo de carbono en común con un segundo anillo de arilo o con un anillo alifático.

«Alcarilo» se refiere a un grupo arilo, como se define anteriormente, sustituido con uno o más grupos alquilo, como se define anteriormente.

«Aralquilo» o «arilalquilo» se refiere a un grupo alquilo, como se define anteriormente, sustituido con uno o más grupos arilo, como se define anteriormente.

«Ariloxi» se refiere a grupos -O-arilo donde «arilo» es como se define anteriormente.

«Alquilamino» se refiere al grupo alquil-NR<sup>28</sup>R<sup>29</sup>, donde cada uno de R<sup>28</sup> y R<sup>29</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo.

«Arilamino» se refiere al grupo aril-NR<sup>30</sup>R<sup>31</sup>, donde cada uno de R<sup>30</sup> y R<sup>31</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno, arilo y heteroarilo.

«Alcoxi-amino» se refiere a un radical -N(H)OR<sup>32</sup> donde R<sup>32</sup> representa un grupo alquilo o cicloalquilo como se define en el presente documento.

«Alcoxicarbonilo» se refiere a un radical -C(O)-alcoxi donde alcoxi es como se define en el presente documento.

«Alquillarilamino» se refiere a un radical -NR<sup>33</sup>R<sup>34</sup> donde R<sup>33</sup> representa un grupo alquilo o cicloalquilo y R<sup>34</sup> es un arilo como se define en el presente documento.

«Alquilsulfonilo» se refiere a un radical -S(O)<sub>2</sub>R<sup>35</sup> donde R<sup>35</sup> es un grupo alquilo o cicloalquilo como se define en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen metilsulfonilo, etilsulfonilo, propilsulfonilo y butilsulfonilo.

«Alquilsulfinito» se refiere a un radical -S(O)R<sup>35</sup> donde R<sup>35</sup> es un grupo alquilo o cicloalquilo como se define en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen metilsulfinito, etilsulfinito, propilsulfinito y butilsulfinito.

«Alquiltio» se refiere a un radical -SR<sup>35</sup> donde R<sup>35</sup> es un grupo alquilo o cicloalquilo como se define en el presente documento que puede estar opcionalmente sustituido como se define en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen metiletio, etiletio, propiltio y butiltio.

«Amino» se refiere al radical -NH<sub>2</sub>.

5 «Amino sustituido» incluye los grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y particularmente se refiere al grupo -N(R<sup>36</sup>)<sub>2</sub> donde cada R<sup>36</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, y donde ambos grupos R se unen para formar un grupo alqueno. Cuando ambos grupos R son hidrógeno, -N(R<sup>36</sup>)<sub>2</sub> es un grupo amino.

10 «Aminocarbonilo» se refiere al grupo -C(O)NR<sup>37</sup>R<sup>37</sup> donde cada R<sup>37</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo y cicloalquilo, o donde los grupos R<sup>37</sup> están unidos para formar un grupo alqueno.

«Aminocarbonilamino» se refiere al grupo -NR<sup>38</sup>C(O)NR<sup>38</sup>R<sup>38</sup> donde cada R<sup>38</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o cicloalquilo, o donde dos grupos R están unidos para formar un grupo alqueno.

15 «Aminocarboniloxi» se refiere al grupo -OC(O)NR<sup>39</sup>R<sup>39</sup> donde cada R<sup>39</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o cicloalquilo, o donde los grupos R están unidos para formar un grupo alqueno.

«Arilalquiloxi» se refiere a un radical -O-arilaquilo donde arilalquilo es como se define en el presente documento.

20 «Arlamino» significa un radical -NHR<sup>40</sup> donde R<sup>40</sup> representa un grupo arilo como se define en el presente documento.

«Arloxicarbonilo» se refiere a un radical -C(O)-O-arilo donde arilo es como se define en el presente documento.

25 «Arlisulfonilo» se refiere a un radical -S(O)<sub>2</sub>R<sup>41</sup> donde R<sup>41</sup> es un grupo arilo o heteroarilo como se define en el presente documento.

30 «Azido» se refiere al radical -N<sub>3</sub>. «Bicicloarilo» se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo bicicloaromático precursor. Los grupos bicicloarilo típicos incluyen grupos derivados de indano, indeno, naftaleno y tetrahidronaftaleno. Particularmente, un grupo arilo comprende de 8 a 11 átomos de carbono.

35 «Bicicloheteroarilo» se refiere a un grupo bicicloheteroaromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de un sistema de anillo bicicloheteroaromático precursor. Los grupos bicicloheteroarilo típicos incluyen grupos derivados de benzofurano, bencimidazol, benzindazol, benzodioxano, cromeno, cromano, cinolina, ftalazina, indol, indolina, indolizina, isobenzofuran, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, benzotiazol, benzoxazol, naftiridina, benzoxadiazol, pteridina, purina, benzopirano, benzpirazina, piridopirimidina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, benzomorfan, tetrahidroisoquinolina y tetrahidroquinolina. Preferiblemente, el grupo bicicloheteroarilo está entre bicicloheteroarilo de 9-11 miembros, siendo particularmente preferido el heteroarilo de 5-10 miembros. Los grupos bicicloheteroarilo particulares son los derivados de benzotiofeno, benzofurano, benzotiazol, indol, quinolina, isoquinolina, bencimidazol, benzoxazol y benzodioxano.

45 «Carbamoilo» se refiere al radical -C(O)N(R<sup>42</sup>)<sub>2</sub> donde cada grupo R<sup>42</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo, como se define en el presente documento, que puede estar opcionalmente sustituido como se define en el presente documento.

«Carboxi» se refiere al radical -C(O)OH.

50 «Carboxiamino» se refiere al radical -N(H)C(O)OH.

55 «Cicloalquilo» se refiere a grupos hidrocarbilo cíclicos que tienen de 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono y que tienen un solo anillo cíclico o múltiples anillos condensados, incluyendo sistemas de anillos fusionados y puenteados, que opcionalmente pueden estar sustituidos con 1 a 3 grupos alquilo. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de un solo anillo tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo, 1-metilciclopropilo, 2-metilciclopropilo, 2-metilciclooctilo, y estructuras de múltiples anillos tales como adamantanilo.

60 «Cicloalquilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo cicloalquilo que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo,

aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

5 «Cicloalcoxi» se refiere al grupo -OR<sup>43</sup> donde R<sup>43</sup> es cicloalquilo. Dichos grupos cicloalcoxi incluyen, a modo de ejemplo, ciclopentoxi y ciclohexoxi.

«Cicloalquenilo» se refiere a grupos hidrocarbilo cíclicos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono y que tienen un solo anillo cíclico o múltiples anillos condensados, incluidos los sistemas de anillos fusionados y puenteados y que tienen al menos uno y particularmente de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. Dichos grupos cicloalquenilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de un solo anillo tales como ciclohexenilo, ciclopentenilo y ciclopropenilo.

«Cicloalquenilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo cicloalquenilo que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

20 «Cicloalquenilo condensado» se refiere a un cicloalquenilo que tiene dos de sus átomos de carbono del anillo en común con un segundo anillo alifático o aromático y que tiene su insaturación olefínica ubicada para impartir aromaticidad al anillo de cicloalquenilo.

25 «Cianato» se refiere al radical -OCN.

«Ciano» se refiere al radical -CN.

«Dialquilamino» significa un radical -NR<sup>44</sup>R<sup>45</sup> donde R<sup>44</sup> y R<sup>45</sup> representan independientemente un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido como se define en el presente documento.

«Etenilo» se refiere a -(C=C)- sustituido o sin sustituir.

35 «Etileno» se refiere a -(C-C)- sustituido o sin sustituir.

«Etinilo» se refiere a -(C≡C)-.

«Halo» o «halógeno» se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo. Los grupos halo preferidos son flúor o cloro.

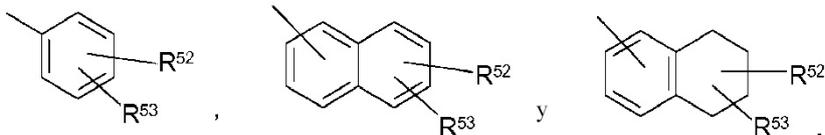
40 «Hidroxi» se refiere al radical -OH.

«Nitro» se refiere al radical -NO<sub>2</sub>.

45 «Sustituido» se refiere a un grupo en el que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan cada uno independientemente con el mismo sustituyente o sustituyentes diferentes. Los sustituyentes típicos incluyen -X, -R<sup>46</sup>, -O-, =O, -OR<sup>46</sup>, -SR<sup>46</sup>, -S-, =S, -NR<sup>46</sup>R<sup>47</sup>, =NR<sup>46</sup>, -CX<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>O, -S(O)<sub>2</sub>OH, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>46</sup>, -OS(O<sub>2</sub>)O, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>46</sup>, -P(O)(O)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>46</sup>)(O-), -OP(O)(OR<sup>46</sup>)(OR<sup>47</sup>), -C(O)R<sup>46</sup>, -C(S)R<sup>46</sup>, -C(O)OR<sup>46</sup>, -C(O)NR<sup>46</sup>R<sup>47</sup>, -C(O)O, -C(S)OR<sup>46</sup>, -NR<sup>48</sup>C(O)NR<sup>46</sup>R<sup>47</sup>, -NR<sup>48</sup>C(S)NR<sup>46</sup>R<sup>47</sup>, -NR<sup>49</sup>C(NR<sup>48</sup>)NR<sup>46</sup>R<sup>47</sup> y -C(NR<sup>48</sup>)NR<sup>46</sup>R<sup>47</sup>,  
50 donde cada X es independientemente un halógeno; cada R<sup>46</sup>, R<sup>47</sup>, R<sup>48</sup> y R<sup>49</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, alquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, -NR<sup>50</sup>R<sup>51</sup>, -C(O)R<sup>50</sup> o -S(O)<sub>2</sub>R<sup>50</sup> u opcionalmente R<sup>50</sup> y R<sup>51</sup> junto con el átomo al que están unidos ambos forman un anillo de cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido; y R<sup>50</sup> y  
55 R<sup>51</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, alquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilalquilo o heteroarilalquilo sustituido.

Los ejemplos de arilos sustituidos representativos incluyen los siguientes

60

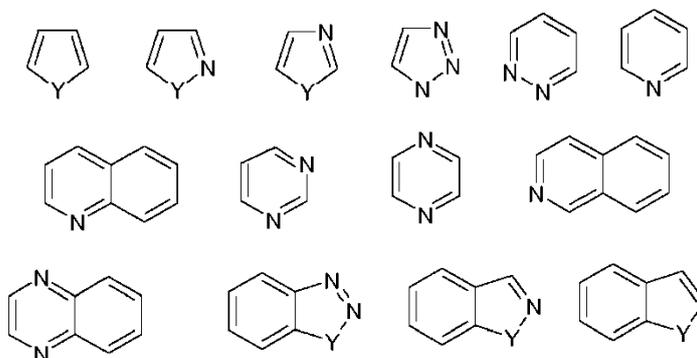


En estas fórmulas, uno de  $R^{52}$  y  $R^{53}$  puede ser hidrógeno y al menos uno de  $R^{52}$  y  $R^{53}$  se selecciona cada uno independientemente de alquilo, alqueno, alquino, cicloheteroalquilo, alcanilo, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi, alquilamino, arilamino, heteroarilamino,  $NR^{54}COR^{55}$ ,  $NR^{54}SOR^{55}NR^{54}SO_2R^{57}$ ,  $COOalquilo$ ,  $COOarilo$ ,  $CONR^{54}R^{55}$ ,  $CONR^{54}OR^{55}$ ,  $NR^{54}R^{55}$ ,  $SO_2NR^{54}R^{55}$ , S-alquilo, S-alquilo,  $SOalquilo$ ,  $SO_2alquilo$ , Sarilo,  $SOarilo$ ,  $SO_2arilo$ ; o  $R^{52}$  y  $R^{53}$  pueden estar unidos para formar un anillo cíclico (saturado o insaturado) de 5 a 8 átomos, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados de entre el grupo N, O o S.  $R^{54}$ ,  $R^{55}$ , y  $R^{56}$  son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, perfluoroalquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, sustituido o heteroalquilo o similares.

«Hetero» cuando se usa para describir un compuesto o un grupo presente en un compuesto significa que uno o más átomos de carbono en el compuesto o grupo han sido reemplazados por un heteroátomo de nitrógeno, oxígeno o azufre. Se puede aplicar hetero a cualquiera de los grupos hidrocarbilo descritos anteriormente, tal como alquilo, por ejemplo, heteroalquilo, cicloalquilo, por ejemplo, cicloheteroalquilo, arilo, por ejemplo, heteroarilo, cicloalqueno y cicloheteroalqueno, que tienen de 1 a 5, y especialmente de 1 a 3 heteroátomos.

«Heteroarilo» se refiere a un grupo heteroaromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de un sistema anular heteroaromático precursor. Los grupos heteroarilo típicos incluyen grupos derivados de acridina, arsindol, carbazol,  $\beta$ -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol y xanteno. Preferiblemente, el grupo heteroarilo está entre 5 y 15 miembros heteroarilo, siendo particularmente preferido el heteroarilo de 5 a 10 miembros. Los grupos heteroarilo particulares son aquellos derivados de tiofeno, pirrol, benzotiofeno, benzofurano, indol, piridina, quinolina, imidazol, oxazol y pirazina.

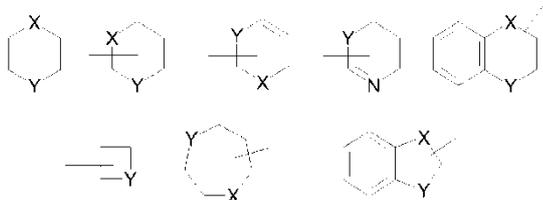
Los ejemplos de heteroarilos representativos incluyen los siguientes:



donde cada Y se selecciona de carbonilo, N,  $NR^{58}$ , O, y S; y  $R^{58}$  es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalquilo o similares.

Como se usa en el presente documento, el término «cicloheteroalquilo» se refiere a un anillo heterocíclico estable no aromático y anillos fusionados que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de N, O y S. Un sistema de anillo heterocíclico fusionado puede incluir anillos carbocíclicos y solo necesita incluir un anillo heterocíclico. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo y morfolinilo, y se muestran en los siguientes ejemplos ilustrativos:

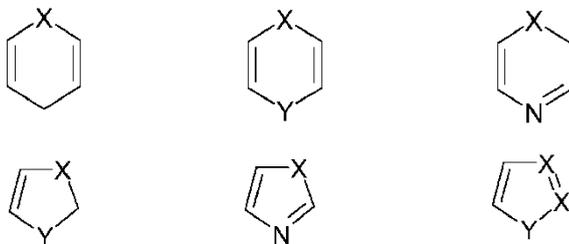




- 5 donde cada X se selecciona de CR<sup>58</sup><sub>2</sub>, NR<sup>58</sup>, O y S; y cada Y se selecciona de NR<sup>58</sup>, O y S; y R<sup>58</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalquilo o similares. Estos anillos de cicloheteroalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano,
- 10 cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-. Los grupos de sustitución incluyen carbonilo o tiocarbonilo que proporcionan, por ejemplo, derivados de lactama y urea.

Los ejemplos de cicloheteroalquilenos representativos incluyen los siguientes:

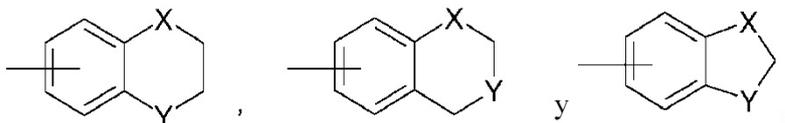
15



- 20 donde cada X se selecciona de CR<sup>58</sup><sub>2</sub>, NR<sup>58</sup>, O y S; y cada Y se selecciona de carbonilo, N, NR<sup>58</sup>, O y S; y R<sup>58</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalquilo o similares.

Los ejemplos de arilo representativo que tienen heteroátomos que contienen sustitución incluyen los siguientes:

25



donde cada X se selecciona de C-R<sup>58</sup><sub>2</sub>NR<sup>58</sup>, O y S; y cada Y se selecciona de carbonilo, NR<sup>58</sup>, O y S; y R<sup>58</sup> es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalquilo o similares.

- 30 «Sustituyente hetero» se refiere a una funcionalidad que contiene halo, un átomo de O, S o N que puede estar presente como R<sup>4</sup> en un grupo R<sup>4</sup>C presente como sustituyentes directamente en A, B, W, Y o Z de los compuestos de esta invención o puede estar presente como un sustituyente en los grupos arilo y alifáticos «sustituidos» presentes en los compuestos.

35 Los ejemplos de sustituyentes hetero incluyen:

- halo,
- NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHR<sup>59</sup>, -N(R<sup>59</sup>)<sub>2</sub>,
- NRCOR, -NR<sup>59</sup>SOR<sup>59</sup>, -NR<sup>59</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>59</sup>, OH, CN,
- 40 -CO<sub>2</sub>H,
- R<sup>59</sup>-OH, -O-R<sup>59</sup>, -COOR<sup>59</sup>,
- CON(R<sup>59</sup>)<sub>2</sub>, -CONROR<sup>59</sup>,
- SO<sub>3</sub>H, -R<sup>59</sup>-S, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>59</sup>)<sub>2</sub>,
- S(O)R<sup>59</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>59</sup>

45

donde cada R<sup>59</sup> es independientemente un arilo o alifático, opcionalmente con sustitución. Entre los sustituyentes

hetero que contienen los grupos  $R^{59}$ , se da preferencia a los materiales que tienen grupos arilo y alquilo  $R^{59}$  como se define en el presente documento. Los sustituyentes hetero preferidos son los enumerados anteriormente.

El grupo «donante de enlaces de hidrógeno» se refiere a un grupo que contiene funcionalidad O-H, o N-H. Los ejemplos de grupos «donantes de enlaces de hidrógeno» incluyen -OH, -NH<sub>2</sub>, y -NH-R<sup>59a</sup> y donde R<sup>59a</sup> es alquilo, cicloalquilo, arilo, o heteroarilo.

«Dihidroxifosforilo» se refiere al radical -PO(OH)<sub>2</sub>.

10 «Dihidroxifosforilo sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un radical dihidroxifosforilo donde uno o ambos grupos hidroxilo están sustituidos. Los sustituyentes adecuados se describen en detalle a continuación.

«Aminohidroxifosforilo» se refiere al radical -PO(OH)NH<sub>2</sub>.

15 «Aminohidroxifosforilo sustituido» incluye los grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un aminohidroxifosforilo donde el grupo amino está sustituido con uno o dos sustituyentes. Los sustituyentes adecuados se describen en detalle a continuación. En ciertas realizaciones, el grupo hidroxilo también puede estar sustituido.

20 «Tioalcoxi» se refiere al grupo -SR<sup>60</sup> donde R<sup>60</sup> es alquilo.

«Tioalcoxi sustituido» incluye aquellos grupos enumerados en la definición de «sustituido» en el presente documento, y en particular se refiere a un grupo tioalcoxi que tiene 1 o más sustituyentes, por ejemplo de 1 a 5 sustituyentes, y en particular de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en acilo, acilamino, aciloxi, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxicarbonilo, alcoxicarbonilamino, amino, amino sustituido, aminocarbonilo, aminocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, ciano, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, hidroxilo, ceto, nitro, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioceto, tiol, alquil-S(O)-, aril-S(O)-, alquil-S(O)<sub>2</sub>- y aril-S(O)<sub>2</sub>-.

30 «Sulfanilo» se refiere al radical HS-. «Sulfanilo sustituido» se refiere a un radical tal como RS- donde R es cualquier sustituyente descrito en el presente documento.

«Sulfonilo» se refiere a radical divalente -S(O<sub>2</sub>)-. «Sulfonilo sustituido» se refiere a un radical tal como R<sup>61</sup>-(O<sub>2</sub>)S- donde R<sup>61</sup> es cualquier sustituyente descrito en el presente documento. «Aminosulfonilo» o «Sulfonamida» se refiere al radical H<sub>2</sub>N(O<sub>2</sub>)S-, y «aminosulfonilo sustituido» o «sulfonamida sustituida» se refiere a un radical tal como R<sup>62</sup><sub>2</sub>N(O<sub>2</sub>)S- donde cada R<sup>62</sup> es independientemente cualquier sustituyente descrito en el presente documento.

«Sulfona» se refiere al grupo -SO<sub>2</sub>R<sup>63</sup>. En realizaciones particulares, R<sup>63</sup> se selecciona de H, alquilo inferior, alquilo, arilo y heteroarilo.

40 «Tioariloxi» se refiere al grupo -SR<sup>64</sup> donde R<sup>64</sup> es arilo.

«Tioceto» se refiere al grupo =S.

45 «Tiol» se refiere al grupo -SH.

Un experto en la técnica de la síntesis orgánica reconocerá que el número máximo de heteroátomos en un anillo heterocíclico estable químicamente factible, ya sea aromático o no aromático, está determinado por el tamaño del anillo, el grado de insaturación y la valencia de los heteroátomos. En general, un anillo heterocíclico puede tener de uno a cuatro heteroátomos siempre que el anillo heteroaromático sea químicamente viable y estable.

«Farmacéuticamente aceptable» significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

55 «Sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a una sal de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto precursor. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico,

ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico y ácido mucónico; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor se reemplaza por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión alcalinotérreo o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina y N-metilglucamina. Las sales incluyen además, solo a modo de ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y tetraalquilamonio; y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tal como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato y oxalato. El término «catión farmacéuticamente aceptable» se refiere a un contraión catiónico aceptable, no tóxico, de un grupo funcional ácido. Dichos cationes se ilustran en ejemplos de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y tetraalquilamonio.

15 «Vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto de la invención.

20 «Prevenir» o «prevención» se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (es decir, hacer que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un sujeto que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad, pero que aún no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad).

25 «Profármacos» se refiere a compuestos, incluyendo derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos escindibles y se convierten por solvolisis o en condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*. Dichos ejemplos incluyen derivados de éster de colina y ésteres de N-alquil morfolina.

30 «Solvato» se refiere a las formas del compuesto que están asociadas con un disolvente, generalmente por una reacción de solvolisis. Los disolventes convencionales incluyen agua, etanol y ácido acético. Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, en forma cristalina y pueden estar solvatados o hidratados. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, e incluyen además solvatos estequiométricos y solvatos no estequiométricos.

35 «Sujeto» incluye seres humanos. Los términos «humano», «paciente» y «sujeto» se usan indistintamente en el presente documento.

40 «Cantidad terapéuticamente eficaz» significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para realizar dicho tratamiento para la enfermedad. La «cantidad terapéuticamente eficaz» puede variar dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad y el peso del sujeto a tratar.

45 «Tratar» o «tratamiento» de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, «tratar» o «tratamiento» se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otra realización más, «tratar» o «tratamiento» se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos.

50 Como se usa en el presente documento, el término «unido operativamente» se refiere a una secuencia reguladora capaz de mediar la expresión de una secuencia codificante y que se coloca en una molécula de ADN (por ejemplo, un vector de expresión) en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante para realizar la expresión de la secuencia codificante. Esta misma definición se aplica a veces a la disposición de secuencias de codificación y elementos de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores y elementos de terminación) en un vector de expresión. Esta definición también se aplica a veces a la disposición de secuencias de ácido nucleico de una primera y una segunda molécula de ácido nucleico donde se genera una molécula de ácido nucleico híbrida.

Un «vector» es un replicón, tal como un plásmido, cósmido, bácmido, fago o virus, al cual se puede unir otra secuencia o elemento genético (ADN o ARN) para provocar la replicación de la secuencia o elemento adjunto.

60 Un «vector de expresión» o «operón de expresión» se refiere a un segmento de ácido nucleico que puede poseer

secuencias de control de transcripción y traducción, tales como promotores, potenciadores, señales de inicio de traducción (por ejemplo, codones ATG o AUG), señales de poliadenilación y terminadores, y que facilitan la expresión de una secuencia codificante de polipéptido en una célula u organismo huésped.

- 5 Los términos «transformar», «transfectar», o «transducir», se referirán a cualquier procedimiento o medio por el cual un ácido nucleico se introduce en una célula u organismo huésped y se pueden usar indistintamente para transmitir el mismo significado. Dichos procedimientos incluyen transfección, electroporación, microinyección y fusión con PEG.

- El ácido nucleico introducido puede o no estar integrado (unido covalentemente) en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor. En células de bacterias, levaduras, plantas y mamíferos, por ejemplo, el ácido nucleico introducido puede mantenerse como un elemento episomal o replicón independiente, tal como un plásmido. Como alternativa, el ácido nucleico introducido puede integrarse en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor y mantenerse de forma estable en esa célula u organismo y a continuación transmitirse adicionalmente o heredarse por células de la progenie u organismos de la célula u organismo receptor. En otras aplicaciones, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula receptora o en el organismo huésped solo de forma transitoria.

- La frase «que consiste esencialmente en» cuando se refiere a un nucleótido o aminoácido particular significa una secuencia que tiene las propiedades de una determinada SEQ ID NO.: Por ejemplo, cuando se usa en referencia a una secuencia de aminoácidos, la frase incluye la secuencia per se y las modificaciones moleculares que no afectarán a las características básicas y novedosas de la secuencia.

- Otros derivados de los compuestos de esta invención tienen actividad tanto en su forma ácida como en derivados de ácidos, pero en la forma sensible a los ácidos a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retardada en el organismo de los mamíferos (véase, Bundgard, H., Design of Prodrugs, págs. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Los profármacos incluyen derivados ácidos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, ésteres preparados por reacción del ácido precursor con un alcohol adecuado, o amidas preparadas por reacción del compuesto de ácido precursor con una amina sustituida o no sustituida, o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Son profármacos preferidos los ésteres, amidas y anhídridos alifáticos o aromáticos sencillos derivados de grupos ácidos que se encuentran en los compuestos de esta invención. En algunos casos es deseable preparar profármacos de tipo éster doble tales como ésteres de (aciloxi)alquilo o ésteres de ((alcoxicarbonil)oxi)alquilos. Se prefieren los ésteres de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, arilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, y arilaquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> de los compuestos de la invención.

- Como se usa en el presente documento, el término «variante isotópica» se refiere a un compuesto que contiene proporciones no naturales de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen dicho compuesto. Por ejemplo, una «variante isotópica» de un compuesto puede contener uno o más isótopos no radiactivos, tales como, por ejemplo, deuterio (<sup>2</sup>H o D), carbono-13 (<sup>13</sup>C), nitrógeno-15 (<sup>15</sup>N), o similares. Se entenderá que, en un compuesto donde se realiza dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando están presentes, pueden variar, de modo que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser <sup>2</sup>H/D, cualquier carbono puede ser <sup>13</sup>C, o cualquier nitrógeno puede ser <sup>15</sup>N, y que la presencia y la colocación de dichos átomos pueden determinarse dentro de los conocimientos de la técnica. Asimismo, la invención puede incluir la preparación de variantes isotópicas con radioisótopos, en el caso, por ejemplo, donde los compuestos resultantes se pueden usar para estudios de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Los isótopos radioactivos tritio, es decir, <sup>3</sup>H, y carbono-14, es decir, <sup>14</sup>C, son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios de detección disponibles. Además, se pueden preparar compuestos que están sustituidos con isótopos emisores de positrones, tales como <sup>11</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>15</sup>O y <sup>13</sup>N, y serán útiles en estudios de tomografía por emisiones de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.

- Todas las variantes isotópicas de los compuestos proporcionados en el presente documento, radioactivas o no, pretenden incluirse dentro del alcance de la invención.

- También se debe entender que los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de enlace de sus átomos o la disposición de sus átomos en el espacio, se denominan «isómeros». Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan «estereoisómeros».

- Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan «diastereómeros» y los que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan «enantiómeros». Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe mediante las reglas de secuenciación de R y S de Cahn y Prelog, o por la manera en que la molécula rota el plano de la luz polarizada y se designa como dextrorrotatorio o levorrotatorio (es decir, como isómeros (+) o (-) respectivamente). Un

compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina «mezcla racémica».

Los «tautómeros» se refieren a compuestos que son formas intercambiables de una estructura de compuesto particular, y que varían en el desplazamiento de átomos de hidrógeno y electrones. Por lo tanto, dos estructuras pueden estar en equilibrio a través del movimiento de electrones  $\pi$  y un átomo (usualmente H). Por ejemplo, los enoles y las cetonas son tautómeros porque se interconvierten rápidamente mediante el tratamiento con ácido o base. Otro ejemplo de tautomería son las formas aci y nitro de fenilnitrometano, que también se forman por tratamiento con ácido o base.

10

Las formas tautoméricas pueden ser relevantes para el logro de la reactividad química óptima y la actividad biológica de un compuesto de interés.

Los compuestos de esta invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; por lo tanto, tales compuestos pueden producirse como estereoisómeros individuales (R) o (S) o como mezclas de los mismos. A menos que se indique lo contrario, la descripción o la denominación de un compuesto particular en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones pretende incluir tanto enantiómeros individuales como mezclas, racémicas o de otro tipo, del mismo. Los procedimientos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros se conocen bien en la técnica.

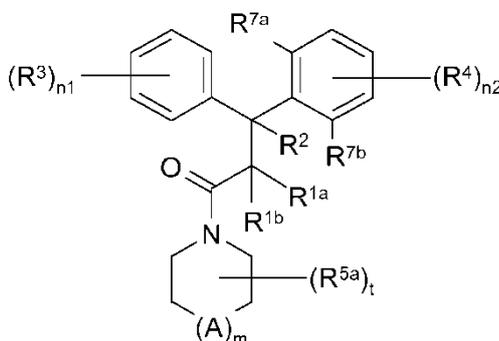
20

### LOS COMPUESTOS

La presente invención proporciona compuestos de fórmula III y su uso en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar en un mamífero una enfermedad o afección que está causalmente relacionada con la actividad de ROR $\gamma$  o ROR $\gamma$ t *in vivo*.

25

La presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula III:



III

30

donde

A es CH<sub>2</sub> u O; m es 1;

n<sub>1</sub> es independientemente 1, 2, 3, 4 o 5; n<sub>2</sub> es 1, 2, o 3;

35 cada R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o sin sustituir, o CN; o

R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> se unen entre sí para formar un anillo de cicloalquilo;

R<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o sin sustituir, o arilo;

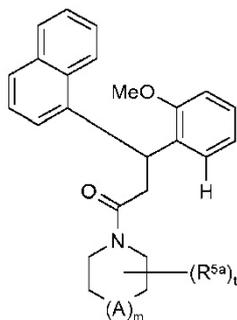
o uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> está unido al C de CR<sup>2</sup> para formar un anillo de ciclopropilo; o R<sup>2</sup> está unido al C de CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup> para formar un anillo de ciclopropilo;

40 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente de H, OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, acilo sustituido o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio sustituido o sin sustituir, alcoxicarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinilo sustituido, sulfanilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo

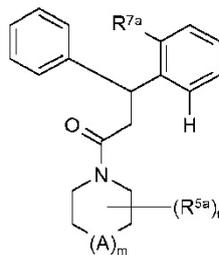
45 sustituido o sin sustituir, azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir,

- dialquilamino sustituido o sin sustituir, halo, nitro, y tío; o dos cualesquiera grupos  $R^3$  adyacentes, o dos cualesquiera grupos  $R^4$  adyacentes pueden unirse para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico sustituido o sin sustituir; cada  $R^{5a}$  es alquilo  $C_1-C_6$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido, halo, haloalquilo  $C_1-C_6$ , hidroxialquilo  $C_1-C_6$ , arilo, heteroarilo, CN, alcoxi  $C_1-C_6$ -alquilo ( $C_1-C_6$ ), amido, hidroxilo, alcoxi  $C_1-C_6$  o alcoxi  $C_1-C_6$  sustituido; t es 0, 1, 2, o 3;
- 5 cada uno de  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  es independientemente OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, acilo sustituido o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio sustituido o sin sustituir, alcoxycarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinilo sustituido, sulfanilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin
- 10 sustituir, azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, dialquilamino sustituido o sin sustituir, halo, nitro, y tío; y o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo; y estereoisómeros, variantes isotópicas y tautómeros del mismo; con la condición de que
- 15 i) cuando t sea 1, A sea  $CH_2$  cada uno de  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  y  $R^2$  sea H,  $R^4$  sea 4-OMe, y uno de  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  sea OH y el otro sea OMe; entonces  $R^{5a}$  sea distinto de 2-Me;
- ii) cuando t sea 0, cada uno de  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  y  $R^2$  sea H,  $R^4$  sea 4-OMe o 4-Me, y uno de  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  sea OH y el otro sea OMe o Me; entonces  $R^3$  sea distinto de 4-OMe, 4-NMe<sub>2</sub>, o 3,4-metilendioxi;
- 20 iii) el grupo  $(R^3)_{n1}$ -Ph- sea distinto de benzopirranilo sustituido o sin sustituir.

Para mayor claridad, la presente invención no incluye la composición de materia para los compuestos de acuerdo con las fórmulas XXa-XXe:

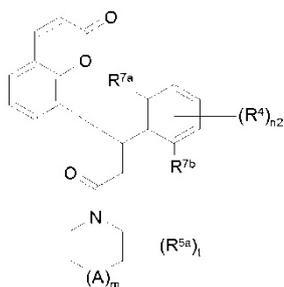


XXa

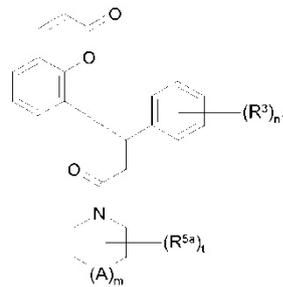


XXb:  $R^{7a} = OH, OMe, Cl, F, Br, o Me$

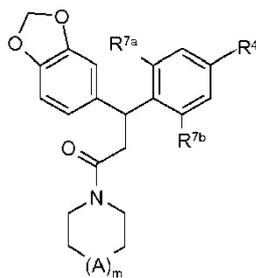
25



XXc



XXd



Xe, R<sup>4</sup> = OMe o Me, R<sup>7a</sup> = OH, R<sup>7b</sup> = OMe o Me;

donde la cumarina o benzopirano (XXc o XXd) pueden estar sustituidos o sin sustituir; y A, m, R<sup>3a</sup>, R<sup>5a</sup>, t y n1 son como se describen para la fórmula III.

5

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, t es 0. En otra realización, t es 1 o 2.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es independientemente OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, acilo sustituido o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio sustituido o sin sustituir, alcoxycarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinilo sustituido, sulfanilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, dialquilamino sustituido o sin sustituir, halo, nitro, y tio.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es independientemente OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, CN, halo, amido, o haloalquilo.

20 En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es independientemente halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CN, OH, o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es independientemente Cl, F, Me, CF<sub>3</sub>, CN, OH, u OMe.

25

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es OH; y el otro es alcoxi.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es OH o alcoxi.

30 En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es OH; y el otro es OMe.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es independientemente H, CN, o Me.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es H. En otra realización cada uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es Me.

35

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es H; y el otro es CN.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, m es 1; y A es CH<sub>2</sub>. En aún otra realización, A es O.

40

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, R<sup>4</sup> es H, alquilo, alquilo sustituido, halo, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, amido, hidroxilo, ciano, o alcoxi.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, R<sup>4</sup> es H, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CN, OH, o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

45

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, R<sup>4</sup> es H, Cl, F, Me, CF<sub>3</sub>, CN, OH, u OMe.

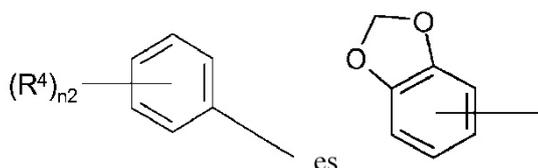
En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, n2 es 1; y R<sup>4</sup> es Cl, F, Me, Et, i-Pr, OMe,

CF<sub>3</sub>, CN u OH. En una realización, R<sup>4</sup> está en la posición 4 o para del anillo de fenilo. En otra realización, R<sup>4</sup> es 4-Cl, 4-F, 4-Me, 4-Et, 4-i-Pr, 4-OMe, 4-CF<sub>3</sub>, 4-CN o 4-OH. Todavía en otra realización, R<sup>4</sup> es 3-Cl, 3-F, 3-Me, 3-Et, 3-i-Pr, 3-OMe, 3-CF<sub>3</sub>, 3-CN o 3-OH.

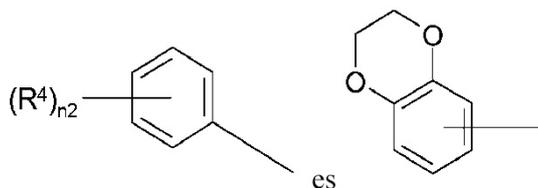
5 En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III, n<sub>1</sub> es 1; R<sup>4</sup> es 4-NMe<sub>2</sub>. En otra realización particular, R<sup>4</sup> es 4-Me. En otra realización particular, R<sup>4</sup> es 2-Me. En otra realización particular, R<sup>4</sup> es 4-OMe. En otra realización particular, R<sup>4</sup> es 4-OEt.

10 En una realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, dos grupos R<sup>4</sup> adyacente se unen entre sí para formar -O-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CF<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, o -CH=CH-CH=CH-.

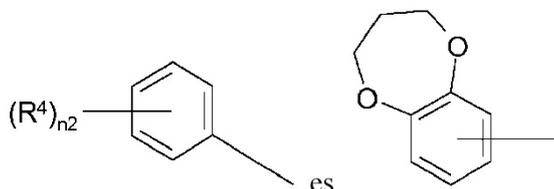
En una realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo



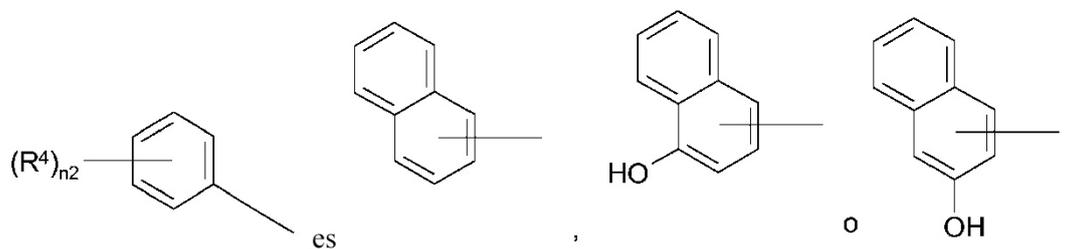
En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo



En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo

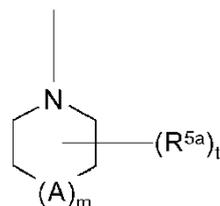


En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo



donde el naftilo está sin sustituido o sustituido con uno o más grupos R<sup>4</sup>.

30 En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III el grupo



está sustituido o sin sustituir.

5 En una realización,  $R^{5a}$  es metoxialquilo.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III,  $n_1$  es 1, 2 o 3. En otra realización,  $n_1$  es 3. En una realización particular,  $n_1$  es 1.

10 En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada  $R^3$  se selecciona independientemente de halo, amino, amino sustituido, alquilo  $C_1$ - $C_6$  sustituido o sin sustituir, CN, OH, y alcoxi  $C_1$ - $C_6$  sustituido o sin sustituir.

En otra realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, cada  $R^3$  se selecciona independientemente de halo, alquilo  $C_1$ - $C_6$  sustituido o sin sustituir, CN, OH, y alcoxi  $C_1$ - $C_6$  sustituido o sin sustituir.

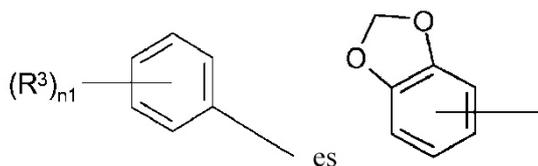
15 En una realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III,  $n_1$  es 1; y  $R^3$  es  $NMe_2$ .

En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III,  $n_1$  es 1; y  $R^3$  es Cl, F, Me, Et, i-Pr, OMe,  $CF_3$ , CN u OH. En una realización,  $R^3$  está en la posición 4 o para del anillo de fenilo. En otra realización,  $R^3$  es 4-Cl, 4-F, 4-Me, 4-Et, 4-i-Pr, 4-OMe, 4- $CF_3$ , 4-CN o 4-OH. Todavía en otra realización,  $R^3$  es 3-Cl, 3-F, 3-Me, 3-Et, 3-i-Pr, 3-OMe, 3- $CF_3$ , 3-CN o 3-OH.

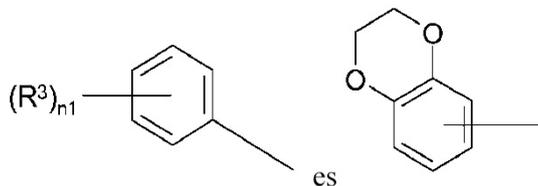
20 En una realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III,  $n_1$  es 1;  $R^3$  es 4- $NMe_2$ . En otra realización particular,  $R^3$  es 4-Me. En otra realización particular,  $R^3$  es 2-Me. En otra realización particular,  $R^3$  es 4-OMe. En otra realización particular,  $R^3$  es 4-OEt.

En una realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, dos grupos  $R^3$  adyacente se unen entre sí para formar  $-O-CH_2-O-$ ,  $-O-CF_2-O-$ ,  $-O-CH_2-CH_2-O-$ ,  $O-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ , o  $-CH=CH-CH=CH-$ .

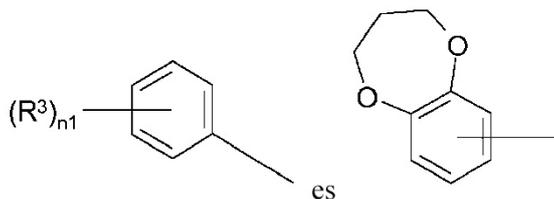
30 En una realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo



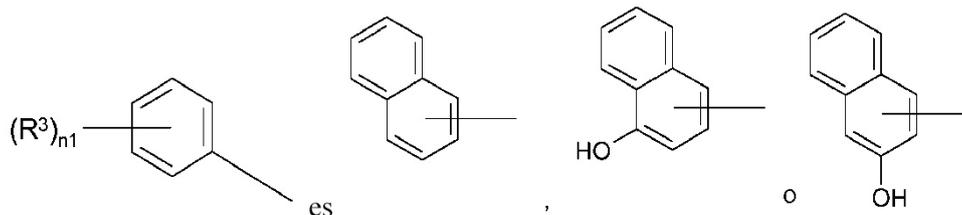
35 En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo



En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo



En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III, el grupo

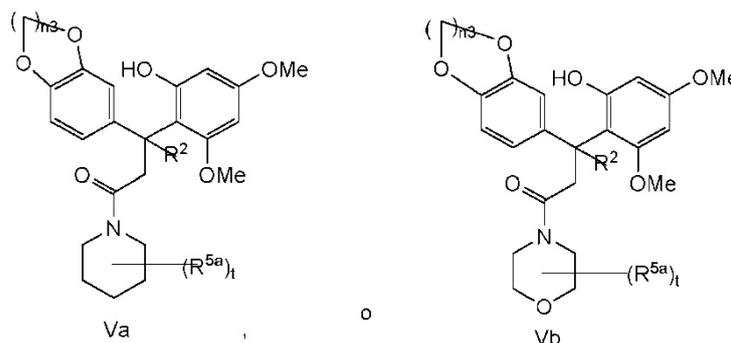


5

donde el naftilo está sin sustituido o sustituido con uno o más grupos  $R^3$ .

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III, el compuesto es de acuerdo con la fórmula Va o Vb:

10



y donde  $t$ ,  $R^2$  y  $R^{5a}$  son como se describen para la fórmula III; y  $n_3$  es 1, 2, o 3.

15 En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $R^2$  es H, OH, alquilo  $C_1$ - $C_6$  sustituido o sin sustituir, o fenilo sustituido o sin sustituir.

En otra realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $R^2$  es H, Me, OH, o Ph.

20 En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $R^2$  es H.

En otra realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $R^2$  es OH.

En otra realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $t$  es 0. En otra realización,  $t$  es 1 o 2.

En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $t$  es 1; y  $R^{5a}$  es OH, Ph, bencilo, o Me. En otra realización,  $t$  es 1; y  $R^{5a}$  es Me, Et, n-Pr, o n-Bu. En una realización particular,  $t$  es 1; y  $R^{5a}$  es 3-Me, 3-Et, 3-n-Pr, o 3-n-Bu.

30

En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $t$  es 2; y cada  $R^{5a}$  es independientemente OH, Ph, bencilo, o Me. En otra realización,  $t$  es 2; y un  $R^{5a}$  es 3-Me y el otro es 5-Me. En otra realización,  $t$  es 2; y un  $R^{5a}$  es 3-Me y el otro es 3-Me.

35 En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb,  $R^{5a}$  es OH, o Me.

En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, R<sup>5a</sup> es Me.

En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, R<sup>5a</sup> es Ph.

5 En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, R<sup>5a</sup> es bencilo.

En otra realización particular, con respecto a los compuestos de fórmula III-Vb, R<sup>5a</sup> es 3-Me.

En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, R<sup>5</sup>, cuando está presente, es H.

10 En otra realización, R<sup>5</sup>, cuando está presente, es Me o Et.

En una realización particular, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, R<sup>5</sup>, cuando está presente, es H.

En otra realización, R<sup>5</sup>, cuando está presente, es Me, Et, n-Pr, o n-Bu. En aún otra realización, R<sup>5</sup>, cuando está presente, es n-pentilo, n-hexilo, o n-heptilo.

15

En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, n3 es 1.

En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, n3 es 2.

20 En una realización, con respecto a los compuestos de las fórmulas III-Vb, n3 es 3.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de un compuesto de acuerdo con la fórmula III.

25 En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III para su uso en un procedimiento de tratamiento, la enfermedad o afección es una enfermedad autoinmune.

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III para su uso en un procedimiento de tratamiento, la enfermedad o afección es una enfermedad inflamatoria.

30

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III para su uso en un procedimiento de tratamiento, la enfermedad o la afección se selecciona de artritis, diabetes, esclerosis múltiple, uveítis, artritis reumatoide, psoriasis, asma, bronquitis, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, infecciones por *H. pylori* y úlceras resultantes de dicha infección, y enfermedades inflamatorias del intestino.

35

En una realización, con respecto a los compuestos de fórmula III para su uso en un procedimiento de tratamiento, la enfermedad o afección se selecciona de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esprúe y alergias alimentarias.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona profármacos y derivados de los compuestos de acuerdo con las fórmulas anteriores. Los profármacos son derivados de los compuestos de la invención, que tienen grupos escindibles y se convierten por solvólisis o en condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos, *in vivo*. Dichos ejemplos incluyen derivados de éster de colina y ésteres de N-alquilmorfina.

40

45 Otros derivados de los compuestos de esta invención tienen actividad tanto en su forma ácida como en derivados de ácidos, pero en la forma sensible a los ácidos a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retardada en el organismo de los mamíferos (véase, Bundgard, H., Design of Prodrugs, págs. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Los profármacos incluyen derivados ácidos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, ésteres preparados por reacción del ácido precursor con un alcohol adecuado, o amidas

50 preparadas por reacción del compuesto de ácido precursor con una amina sustituida o no sustituida, o anhídridos de ácido, o anhídridos mixtos. Son profármacos preferidos los ésteres, amidas y anhídridos alifáticos o aromáticos sencillos derivados de grupos ácidos que se encuentran en los compuestos de esta invención. En algunos casos es deseable preparar profármacos de tipo éster doble tales como ésteres de (aciloxi)alquilo o ésteres de ((alcoxycarbonil)oxi)alquilos. Se prefieren los ésteres de alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, arilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, 55 y arilaquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> de los compuestos de la invención.

### **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS**

60 Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos de esta invención se administran típicamente en forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en

la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo.

Generalmente, los compuestos de esta invención se administran en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad del compuesto realmente administrada generalmente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluida la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por una variedad de rutas que incluyen oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica e intranasal. Dependiendo de la vía de administración prevista, los compuestos de esta invención se formulan preferiblemente como composiciones inyectables u orales o como ungüentos, como lociones o como parches para la administración transdérmica.

Las composiciones para administración oral pueden adoptar la forma de soluciones o suspensiones líquidas a granel, o polvos a granel. Sin embargo, más comúnmente, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitaria para facilitar la dosificación precisa. El término «formas de dosificación unitaria» se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringas medidas previamente precargadas de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas. En tales composiciones, el compuesto de ácido furansulfónico es usualmente un componente menor (de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 50 % en peso o preferiblemente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 40 % en peso), siendo el resto diversos vehículos o portadores y auxiliares de procesamiento útiles para formar el forma de dosificación deseada.

Las formas líquidas adecuadas para administración oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispensación, colorantes y aromas. Las formas sólidas pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saporífero tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Las composiciones inyectables se basan típicamente en una solución salina estéril inyectable o una solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Como antes, el compuesto activo en tales composiciones es típicamente un componente minoritario, siendo a menudo de aproximadamente el 0,05 al 10 % en peso, siendo el resto el vehículo inyectable.

Las composiciones transdérmicas se formulan típicamente como un ungüento tópico o crema que contiene el principio o principios activos, generalmente en una cantidad que varía de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % en peso, y más preferiblemente de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 15 % en peso. Cuando se formulan como un ungüento, los principios activos se combinarán típicamente con una base de ungüento parafínico o miscible en agua. Como alternativa, los principios activos pueden formularse en una crema con, por ejemplo, una base de crema de aceite en agua. Dichas formulaciones transdérmicas se conocen bien en la técnica y generalmente incluyen ingredientes adicionales para mejorar la penetración dérmica de la estabilidad de los principios activos o la formulación. Todas las formulaciones e ingredientes transdérmicos conocidos se incluyen dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos de esta invención también pueden administrarse mediante un dispositivo transdérmico. Por consiguiente, la administración transdérmica se puede lograr usando un parche del tipo depósito o membrana porosa, o de una diversidad de matriz sólida.

Los componentes descritos anteriormente para composiciones administrables por vía oral, inyectables o administrables por vía tópica son meramente representativos. Otros materiales, así como técnicas de procesamiento se exponen en la Parte 8 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Los compuestos de esta invención también se pueden administrar en formas de liberación sostenida o de sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. Se puede encontrar una descripción de materiales de liberación sostenida representativos en Remington's Pharmaceutical Sciences.

Los siguientes ejemplos de formulación ilustran composiciones farmacéuticas representativas de esta invención.

**Formulación 1 - Comprimidos**

5 Un compuesto de la invención se mezcla como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Una pequeña cantidad de estearato de magnesio se añade como lubricante. La mezcla se forma en comprimidos de 240-270 mg (80-90 mg de compuesto de amida activo por comprimido) en una prensa de comprimidos.

10 **Formulación 2 - Cápsulas**

Un compuesto de la invención se mezcla como un polvo seco con un diluyente de almidón en una relación en peso aproximada de 1:1. La mezcla se carga en cápsulas de 250 mg (125 mg de compuesto de amida activo por cápsula).

15 **Formulación 3 - Líquido**

20 Un compuesto de la invención (125 mg), sacarosa (1,75 g) y goma de xantano (4 mg) se mezclan, se pasan a través de un tamiz de malla N.º 10 de EE. UU. y después se mezclan con una solución fabricada previamente de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica (11:89, 50 mg) en agua. El benzoato de sodio (10 mg), el aroma y el color se diluyen con agua y se añaden con agitación. Después, se añade suficiente agua para producir un volumen total de 5 ml.

**Formulación 4 - Comprimidos**

25 Un compuesto de la invención se mezcla como un polvo seco con un aglutinante de gelatina seco en una relación en peso aproximada de 1:2. Una pequeña cantidad de estearato de magnesio se añade como lubricante. La mezcla se forma en comprimidos de 450-900 mg (150-300 mg de compuesto de amida activo) en una prensa de comprimidos.

30 **Formulación 5 - Inyección**

Un compuesto de la invención se disuelve o suspende en un medio acuoso inyectable de solución salina estéril tamponada a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml.

35 **Formulación 6 - Tópica**

40 El alcohol estearílico (250 g) y una vaselina blanca (250 g) se funden a aproximadamente 75 °C y después se añade una mezcla de un compuesto de la invención (50 g), metilparabeno (0,25 g), propilparabeno (0,15 g), lauril sulfato de sodio (10 g) y propilenglicol (120 g) disuelta en agua (aproximadamente 370 g), y la mezcla resultante se agita hasta que se congela.

**PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO**

45 Los presentes compuestos se usan como agentes terapéuticos para el tratamiento de afecciones en mamíferos que están relacionados de manera causal o pueden atribuirse a la actividad de ROR $\gamma$ t. Por consiguiente, los compuestos y composiciones farmacéuticas de esta invención encuentran uso como agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar una diversidad de afecciones inflamatorias y trastornos autoinmunes en mamíferos, incluyendo seres humanos.

50 Esta invención proporciona un compuesto de fórmula III para su uso en un procedimiento para tratar a un mamífero susceptible o afligido con una afección asociada con una afección inflamatoria y/o un trastorno autoinmune, cuyo procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de una o más de las composiciones farmacéuticas recién descritas.

55 Esta invención proporciona un compuesto de fórmula III para su uso en procedimientos de tratamiento de un mamífero susceptible o afectado con una afección inflamatoria o trastorno autoinmune relacionado causalmente o atribuible a la actividad de ROR $\gamma$ t. Dichas afecciones y trastornos incluyen artritis, diabetes, esclerosis múltiple, uveítis, artritis reumatoide, psoriasis, asma, bronquitis, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, infecciones por *H. pylori* y úlceras resultantes de dicha infección y enfermedades inflamatorias del intestino. Dichos usos comprenden la administración de una cantidad eficaz para tratar o prevenir la afección de una o más de las  
60 composiciones farmacéuticas que se acaban de describir.

Los presentes inventores han demostrado que el tratamiento de células de tipo silvestre con el inhibidor de ROR $\gamma$ t, digoxina, dio lugar a cambios en la expresión génica que fueron muy similares a los observados en células deficientes en ROR $\gamma$ t. Véase Huh y col. (2011) Digoxin and its derivatives suppress Th17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t activity; Nature, en prensa. Siendo ese el caso, los inhibidores de ROR $\gamma$ t pueden usarse para tratar cualquier enfermedad causada por células que expresan ROR $\gamma$  o ROR $\gamma$ t, incluyendo Th17, NK22 y otras células linfoides innatas. La contribución pro-aterogénica de la IL-17 a las lesiones ateroscleróticas, por ejemplo, sugiere que la aterosclerosis puede tratarse eficazmente con los compuestos y composiciones descritos en el presente documento. Véase Chen y col. J Innate Immun. 2010;2(4):325-33. Epub, 7 de mayo de 2010.

10

Como un aspecto adicional de la invención, se proporcionan los presentes compuestos para su uso como un producto farmacéutico, especialmente en el tratamiento o prevención de las afecciones y enfermedades mencionadas anteriormente.

15 Los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 0,1 mg/kg/hora hasta al menos 10 mg/kg/hora, todos de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 horas y especialmente de 24 a 96 horas. También se puede administrar un bolo de precarga de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o más para lograr niveles de estado estable adecuados. No se espera que la dosis máxima total exceda aproximadamente 2 g/día para un paciente humano de 40 a 80 kg.

20

Para la prevención y/o tratamiento de afecciones a largo plazo, tal como, por ejemplo, artritis, diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis o asma, el régimen de tratamiento generalmente se extiende durante muchos meses o años, por lo que se prefiere la dosificación oral por conveniencia y tolerancia del paciente. Con la dosificación oral, de una a cinco y especialmente de dos a cuatro y típicamente tres dosis orales al día son regímenes representativos. Usando estos patrones de dosificación, cada dosis proporciona de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg del compuesto de la invención, proporcionando cada una de las dosis preferidas de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg y especialmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg.

30 Las dosis transdérmicas se seleccionan generalmente para proporcionar niveles en sangre similares o inferiores a los que se consiguen usando dosis de inyección. Los modos de administración adecuados para los sitios de la mucosa también se contemplan en el presente documento e incluyen: hisopos intraanales, enemas, aerosoles intranasales y compuestos y/o composiciones en aerosol o vaporizados para la administración a la mucosa pulmonar. Un experto en la técnica elegiría uno o varios modos de administración adecuados en función de una diversidad de parámetros, incluyendo el sitio del órgano o tejido en un paciente con una enfermedad o afección que se ve más gravemente afectado por la enfermedad o afección. Un experto podría, por ejemplo, tratar a un paciente afectado por una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) con un régimen terapéutico que incluía la administración de los compuestos o composiciones de la invención utilizando un enema para administración directa al intestino.

40 Cuando se usan para prevenir la aparición de una afección inflamatoria o un trastorno autoinmune, los compuestos de esta invención se administrarán a un paciente con riesgo de desarrollar la afección o trastorno, típicamente con el consejo y bajo la supervisión de un médico, en los niveles de dosificación descritos anteriormente. Los pacientes con riesgo de desarrollar una afección particular generalmente incluyen los que tienen un historial familiar de la afección, o los que se han identificado mediante pruebas genéticas o pruebas de detección como particularmente susceptibles a desarrollar la afección.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse como el único agente activo o pueden administrarse en combinación con otros agentes, incluyendo otros compuestos que demuestran la misma actividad terapéutica o una actividad terapéutica similar y se determina que son seguros y eficaces para dicha administración combinada.

50

#### **PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS GENERALES**

Los compuestos amido de esta invención pueden comprarse a partir de diversas fuentes comerciales o pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes procedimientos y procedimientos generales. Se apreciará que cuando se dan condiciones de procedimiento típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactantes, disolventes, presiones), también se pueden usar otras condiciones de procedimiento a menos que se indique otra cosa. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el disolvente utilizado, pero un experto en la técnica puede determinar dichas condiciones mediante procedimientos de optimización de rutina.

60

Adicionalmente, como será evidente para los expertos en la técnica, los grupos protectores convencionales pueden ser necesarios para evitar que ciertos grupos funcionales sufran reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, así como las condiciones adecuadas para la protección y desprotección, se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, numerosos grupos protectores, y su introducción y eliminación, se describen en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, Wiley, Nueva York, 1991, y las referencias citadas en el mismo.

Los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de materiales de partida y reactivos conocidos o disponibles comercialmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica.

10

### Materiales y procedimientos generales:

Todos los reactivos y disolventes disponibles comercialmente se adquirieron y se utilizaron sin purificación adicional. Todas las reacciones de microondas se llevaron a cabo en un vial de microondas sellado equipado con una barra de agitación magnética y se calentaron en un sintetizador de microondas Biotage Initiator. La purificación por HPLC se realizó utilizando una HPLC semipreparativa Waters equipada con una columna Phenomenex Luna® C18 de fase inversa (5 micrómetros, 30 x 75 mm) (a menos que se indique otra cosa) con un caudal de 45 ml/min. La fase móvil era una mezcla de acetonitrilo y H<sub>2</sub>O, conteniendo cada uno ácido trifluoroacético al 0,1 %. Los espectros de <sup>1</sup>H se registraron utilizando un espectrómetro Inova 400 MHz (Varian) o un espectrómetro Inova 300 MHz (Varian). Se utilizaron dos procedimientos LCMS para analizar la pureza de las muestras. Procedimiento 1: LC/MS Agilent serie 1200 equipada con una columna Zorbax™ Eclipse XDB-C18 de fase inversa (5 micrómetros, 4,6 x 150 mm) con un caudal de 1,1 ml/min. La fase móvil era una mezcla de acetonitrilo y H<sub>2</sub>O, conteniendo cada uno ácido trifluoroacético al 0,05 %. Se utilizó un gradiente de acetonitrilo del 5 % al 100 % durante 8 minutos durante el análisis analítico. Procedimiento 2: HPLC Acquity equipada con una columna Waters BEH C18, de 1,7 micrómetros, 2,1 x 50 mm; 25 Temperatura de la columna: 45 grados C; Flujo: 0,5 ml/min; Disolvente A: TFA al 0,05 % en agua; Disolvente B: TFA al 0,025 % en Acetonitrilo; Gradiente: Disolvente B del 2 % al 100 % durante 1,3 minutos; Tiempo de ejecución: 3 min. Las mediciones de espectroscopía de masas de alta resolución se realizaron en un espectrómetro de masas por electronebulización TOF Agilent 6210.

Los siguientes procedimientos generales se usaron para sintetizar compuestos que tenían estructuras diferentes pero análogas. Un experto en la técnica de la síntesis reconocerá cómo modificar estos procedimientos generales, si es necesario para lograr, las transformaciones deseadas.

### Procedimientos sintéticos representativos

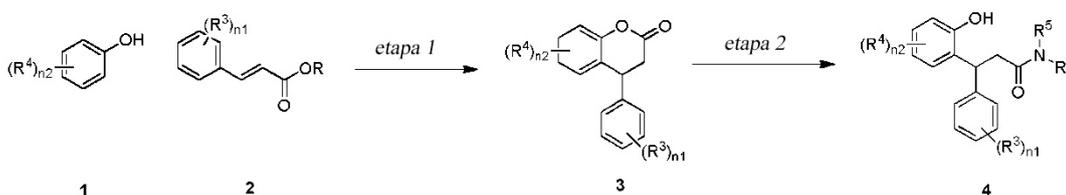
35

#### Procedimiento A

Los compuestos hidroxí representativos de la invención pueden prepararse usando la ruta sintética general representada en el Esquema 1.

40

Esquema 1



Se usaron las siguientes condiciones de reacción para la etapa 1:

- (1) TFA, 60-100 °C, 2-16 h  
o (2) ácido p-toluenosulfónico, 125 °C, 2 h

Se usaron las siguientes condiciones de reacción para la etapa 2:

- (1)  $R^5R^6NH$ , 60-80 °C, DMA o THF, 2-16 h  
o (2)  $R^5R^6NH$ , Me<sub>3</sub>Al, Tolueno/DCE, 50 °C, 4-12 h

#### Etapa 1:

Una mezcla de fenol (1, 0,2 mmol) y ácido cinnámico (2, 0,2 mmol) en TFA (2 ml) se calentó a 60-100 °C durante 2-16 h. Tras la finalización, se eliminó el TFA usando un evaporador Genevac y el residuo se disolvió en DCM (2 ml),

lavado con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2 ml). Después de eliminar el disolvente, se obtuvo **3**. El compuesto **3** puede prepararse usando el siguiente procedimiento.

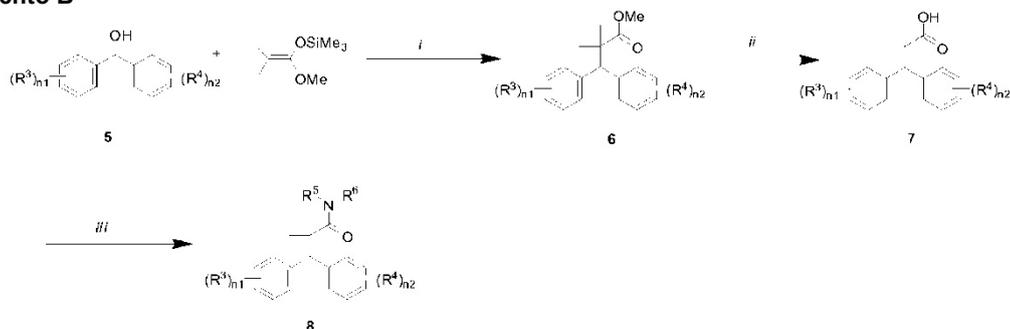
Una mezcla de (**1**, 0,2 mmol), ácido cinnámico (**2**, 0,2 mmol) y ácido p-toluenosulfónico (0,2 mmol) se calentó a 125 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se disolvió en DCM (2 ml), lavado con NaOH (1 M, 1 ml). Después de eliminar el disolvente, se obtuvo **3** y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Etapa 2:

Una mezcla de **3** (0,2 mmol) y amina ( $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$ , 0,3 mmol) en DMA o THF (2 ml) se calentó a 60-80 °C durante 2-16 h. Tras la finalización, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. El producto deseado **4** se obtuvo por purificación por HPLC. El compuesto **4** puede prepararse usando el siguiente procedimiento.

En un vial de 8 ml, se añadió amina ( $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$ , 0,3 mmol). El vial se tapó con un tapón de Teflon, y después se añadió  $\text{Me}_3\text{Al}$  (0,4 ml, 1 M en heptano). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Esto se siguió de la adición de **3** (0,2 mmol, disuelto en 1 ml de tolueno seco/o DCE). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró en un GeneVac. El residuo se disolvió en DCM (2 ml), y después se añadió  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (0,2 mmol, 32 mg). La suspensión se agitó vorticialmente y se centrifugó, la solución transparente se separó y se concentró. El producto en bruto se purificó por HPLC para proporcionar **4**.

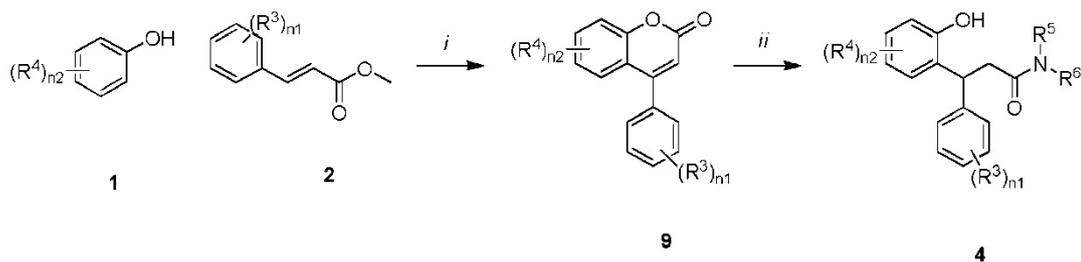
#### Procedimiento B



Condiciones de reacción: (i)  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ , 0 °C - t.a. 1-2 h; (ii) LiOH, THF/ $\text{H}_2\text{O}$ /MeOH, MW, 150 °C, 1 h; (iii) DMC,  $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$ . Base de Hunig,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

#### Procedimiento general

A una solución de **5** (1 mmol) y (1-metoxi-2-metilprop-1-eniloxi)trimetilsilano (1,5 mmol) en 10 ml de DCM a 0 °C se le añadió  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  (1,5 mmol) con agitación. La mezcla se calentó a t.a. y la agitación continuó durante 1-2 h. Tras la finalización, se añadieron 20 ml de DCM y la capa orgánica se lavó con una solución sat. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10 ml) y agua (10 ml), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para dar **6**. Una solución de **6** (0,5 mmol) y LiOH (5 mmol) en una mezcla de disolventes (10 ml de THF, 5 ml de MeOH y 5 ml de agua) se calentó en un microondas a 150 °C durante 1 h. Tras la finalización, el disolvente se eliminó. El residuo se disolvió en 10 ml de agua y la solución se acidificó por HCl 1 M a pH = 2. La mezcla resultante se extrajo con DCM (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron para dar el ácido **7**. A una solución del ácido **7** (0,3 mmol) y base de Hunig (1 mmol) en DCM (10 ml) se le añadió cloruro de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolínio (1,5 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 10 min, se añadió una solución de amina ( $\text{R}_3\text{R}_4\text{NH}$ , 0,6 mmol en DCM o DMA). La mezcla resultante se agitó durante 4-12 h. Después de concentrarse, el residuo se purificó por HPLC para producir el **8 deseado**.

**Procedimiento C**

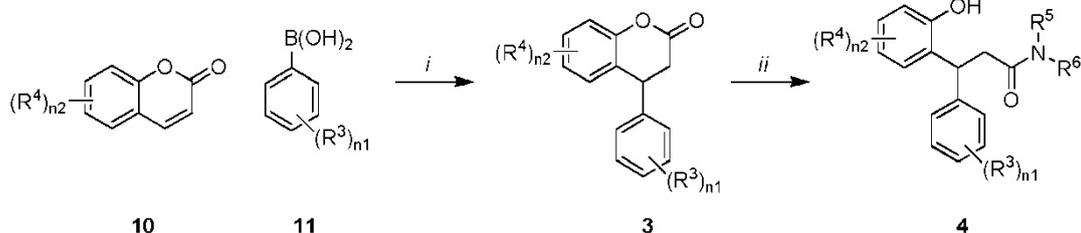
Condiciones de reacción: (i) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 40 °C, 8 h; (ii)  $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$ , MeOH,  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ , 10% Pd/C, 50 °C, 8 h

**Procedimiento general**

5 El compuesto **2** se usó sin purificación de fuentes comerciales o se sintetizó siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Xie, L. y col.; J. Med. Chem. 1999, 42, 2662).

Una solución de **2** (1 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,9 ml) se trató con fenol **1** (1 mmol), TFA (2,7 ml) y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (15 mg, 0,069 mmol), y se agitó a 40 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad usando el evaporador Genevac y se usó en bruto en la siguiente etapa.\* El producto en bruto **9** se disolvió en MeOH (1 ml), se trató con  $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$  (2 mmol), Pd al 10 %/C (8 mg, 0,1 mmol) y formiato de amonio (67 mg, 1 mmol) y se calentó a 50 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH, se filtró a través de una columna de tior soportada sólida, y se concentró a presión reducida. El material se purificó por HPLC para producir el compuesto **4**.

15 \*El grado de oxidación para dar **9** era dependiente del sustrato y, a veces, el producto primario era la lactona **3** de acuerdo con se determinó por LCMS. Si el nivel de oxidación era <20 %, la amida **4** se sintetizó siguiendo las mismas condiciones descritas en el Procedimiento A.

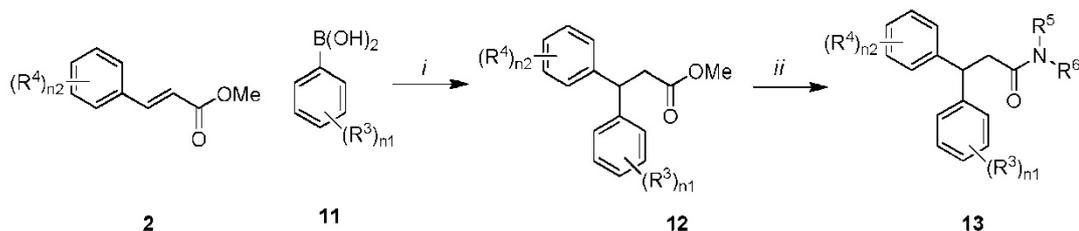
**Procedimiento D**

20 Condiciones de reacción: (i)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , BIPY, AcOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , THF, 60 °C, 8 h; (ii)  $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$ , DMA, 80 °C, 8 h

**Procedimiento general**

Una suspensión de cumarina **10** (0,15 mmol), ácido borónico **11** (0,4 mmol) BIPY (10 mg, 0,064 mmol), y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0,03 mmol) en AcOH (0,6 ml), THF (0,2 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 ml) se calentó a 60 °C durante 8 h, y se concentró a sequedad en el evaporador Genevac para proporcionar **3** que se usó sin purificación en la siguiente etapa. La lactona en bruto **3** se convirtió en la amida **4** siguiendo el mismo protocolo que en el Procedimiento A ( $\text{NHR}^5\text{R}^6$ , DMA, 80 °C) y se purificó con HPLC para proporcionar el producto **4**.

**30 Procedimiento E**



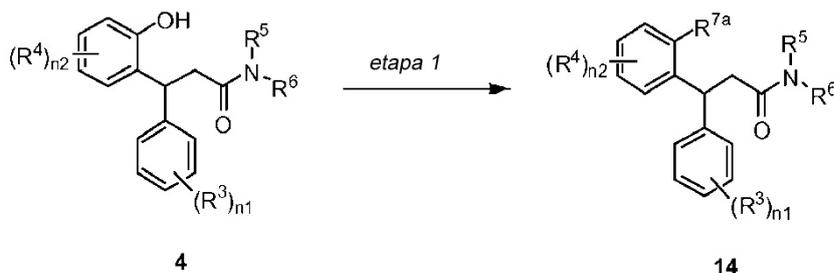
Condiciones de reacción: (i) Pd(OAc)<sub>2</sub>, BIPY, AcOH, H<sub>2</sub>O, THF, 60 °C, 8 h; (ii) R<sup>5</sup>R<sup>6</sup>NH, 2,3,4,6,7,8-hexahidro-1H-pirido[1,2-a]pirimidina, 70 °C, 8 h

### Procedimiento general

5 Una suspensión de éster cinnámico **2** (0,15 mmol), ácido borónico **11** (0,4 mmol) BIPY (10 mg, 0,064 mmol), y Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0,03 mmol) en AcOH (0,6 ml), THF (0,2 ml) y H<sub>2</sub>O (0,1 ml) se calentó a 60 °C durante 8 h, y se concentró a sequedad en el evaporador Genevac para proporcionar **12** que se usó sin purificación en la siguiente etapa. El producto en bruto **12** se trató con 2,3,4,6,7,8-hexahidro-1H-pirido[1,2-a]pirimidina (0,18 mmol) y R<sup>5</sup>R<sup>6</sup>NH y se calentó a 70 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para proporcionar **13**.

10

### Procedimiento F



### 15 Procedimiento general

Una mezcla de **4** (0,1 mmol) y NaH (0,2 mmol) se disolvió en THF seco (2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 0,5 h, se añadió haluro de alquilo (0,4 mmol). La mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 2-8 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron un par de gotas de agua y la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **14**.

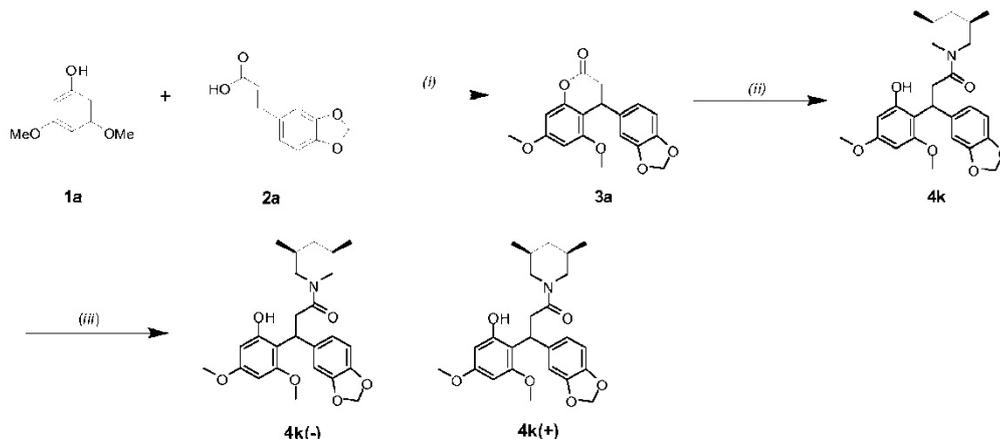
20

### Ejemplos representativos:

#### Compuesto 35 (Procedimiento A)

25

(-)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-*cis*-3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona (4k(-)) (NCGC00238427,35)



(i) TFA, 80 °C 6 h; (ii) Base de Hunig, 3,5-cis-dimetilpiperidina, 60°C DMA, 16 h; (iii) separación quiral por HPLC

Se preparó siguiendo el procedimiento A: Una mezcla de 3,5-dimetilfenol (**1a**, 10,0 mmol, 1,54 g) y ácido 3,4-(metilendioxi)cinnámico (**2a**, 10,0 mmol, 1,92 g) en TFA (30 ml) se calentó a 70 °C durante 3 h. Después de eliminar el TFA, el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando hexano/acetato de etilo (7-60 %) para dar **3a** (2,13 g, 65 %) en forma de un polvo de color blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2,83 (dd, *J*=15,8, 1,6 Hz, 1 H), 3,20 (dd, *J*=15,9, 6,9 Hz, 1 H), 3,74 (s, 3 H), 3,79 (s, 3 H), 4,43 (d, *J*=5,9 Hz, 1 H), 5,96 (s, 2 H), 6,33 - 6,50 (m, 3 H), 6,66 (d, *J*=1,6 Hz, 1 H), 6,79 (d, *J*=8,0 Hz, 1 H); LC/MS: Tiempo de retención *t* = 5,78 min; Pureza: UV<sub>220</sub>> 98 %, UV<sub>254</sub>> 98 %.

10

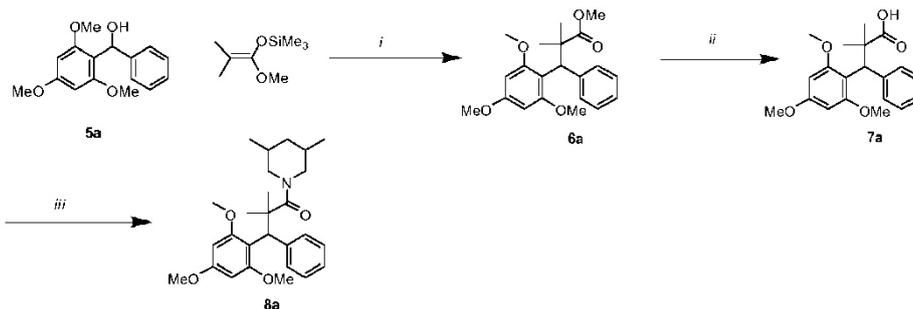
A una solución de **3a** (1,251 g, 3,81 mmol) en 10,0 ml de DMA se le añadieron sal monotartrato de 3,5-dimetilpiperidina (2,01 g, 7,62 mmol) y base de Hunig (2,46 g, 19,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante una noche. El disolvente se eliminó y el residuo se disolvió en 50 ml de DCM. La solución se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. (30 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con hexanos al 7-60 %/acetato de etilo para proporcionar amida 3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-*cis*-3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona (869 mg, 52 %) en forma de un sólido. Separación quiral por HPLC (Columna: IA Preparativa 5 cm x 50 cm; Tiempo de ejecución: 40 minutos; Caudal: 35 ml/min; Fase móvil: 60/40 de EtOH/Hexano; Detectores: DAD (220 y 254 nm)) dio **4k(-)** y **4k(+)**.

20 (-)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-*cis*-3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona (**4k(-)**): <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 60 °C) δ ppm 0,65-0,74 (m, 1H), 0,81 (d, 6H, *J* = 6,3 Hz), 1,20-1,38 (m, 2H), 1,64-1,74 (m, 1H), 1,80-1,94 (m, 1H), 2,34-2,50 (m, 1H), 2,92-3,20 (m, 2H), 3,67 (s, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,72-3,90 (m, 1H), 4,28-4,38 (m, 1H), 4,88 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz), 5,88-5,89 (m, 2H), 6,02-6,04 (m, 2H), 6,67-6,73 (m, 2H), 6,82 (s, 1H), 9,21 (s, 1H); LC/MS: Tiempo de retención *t* = 4,39 min; Pureza: UV<sub>220</sub>> 95 %, UV<sub>254</sub>> 95 %; (Columna: IA analítica, 0,46 cm x 25 cm; Tiempo de ejecución: 15 min; Caudal: 1 ml/min; Fase móvil: 60/40 de EtOH/Hexano; Detectores: DAD (220 y 254 nm) y detector quiral PDR); [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -129,1 (c 1,0, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (ESI): *m/z* calc. para C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> 442,2224, observado 442,2221.

### Compuesto 149 (Procedimiento B)

30

**1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-2,2-dimetil-3-fenil-3-(2,4,6-trimetoxifenil)propan-1-ona (8a) (NCGC00238416,149)**



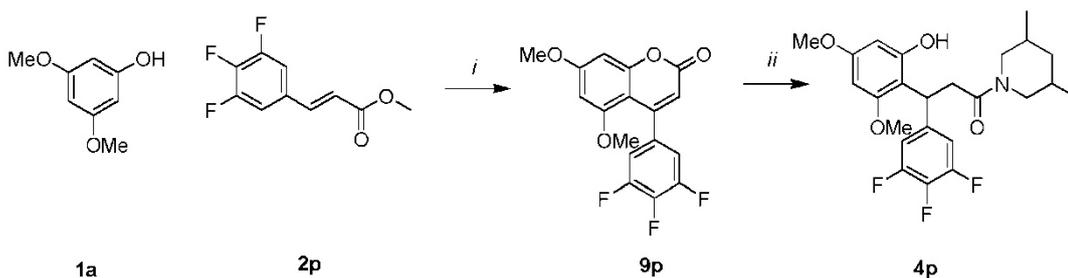
Condiciones de reacción: (i)  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ , 0 °C - t.a. 1-2 h; (ii) LiOH, THF/ $\text{H}_2\text{O}$ /MeOH, MW, 150 °C, 1 h; (iii) DMC, cis-3,5-dimetilpiperidina, Base de Hunig,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Se preparó siguiendo el procedimiento B: A una solución de **5a** (0,50 g, 1,82 mmol) y (1-metoxi-2-metilprop-1-eniloxi)trimetilsilano (0,477 g, 2,73 mmol) en 10 ml de DCM a 0 °C se le añadió  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  (0,388 g, 2,73 mmol) con agitación. La mezcla se calentó a t.a y la agitación continuó durante 2 h. Tras la finalización, se añadieron 20 ml de DCM y la capa orgánica se lavó con una solución sat. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10 ml) y agua (10 ml), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando DCM al 7-100 %/Hexanos para dar **6a** (0,312 g, 48 %). Una solución de **6a** (0,312 g, 0,87 mmol) y LiOH (0,21 g, 8,70 mmol) en una mezcla de disolventes (10 ml de THF, 5 ml de MeOH y 5 ml de agua) se calentó en un microondas a 150 °C durante 1 h. Tras la finalización, el disolvente se eliminó. El residuo se disolvió en 10 ml de agua y la solución se acidificó por HCl 1 M a pH = 2. La mezcla resultante se extrajo con DCM (3 x 30 ml). La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró para dar el ácido **7a** (0,256 g, 85 %). A una solución del ácido **7a** (0,236 g, 0,685 mmol) y base de Hunig (2,1 mmol) en DCM (15 ml) se le añadió cloruro de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolinio (174 mg, 1,03 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitarse durante 10 min, se añadió una solución de cis-3,5-dimetilpiperidina (116 mg, 1,03 mmol) en 5 ml de DMA. La mezcla resultante se agitó durante una noche. Después de concentrarse, el residuo se disolvió en 30 ml y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  sat. (15 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 7-60 %/hexanos para proporcionar **8a** (256 mg, 85 %) en forma de un sólido.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 80 °C)  $\delta$  ppm 0,50 - 0,70 (m, 1 H), 0,77 (m, 6 H), 0,85 (m, 1 H), 0,99 (m, 1 H), 1,09 (s, 3 H), 1,28 (s, 3 H), 1,60 (m, 1 H), 1,90 - 2,15 (m, 2 H), 3,58 (s, 6 H), 3,76 (s, 3 H), 4,17 - 4,38 (m, 2 H), 5,23 (s, 1 H); 6,21 (s, 2 H); 6,90 - 7,23 (m, 5 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  440,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R$  = 2,61 min,  $\text{UV}_{254}$  = 90 %; HRMS (ESI):  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{NO}_4$  440,2807, observado 440,2805.

### Compuesto 106 (Procedimiento C)

25

**1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3,4,5-trifluorofenil)propan-1-ona (NCGC00242635,109) (4p)**



Condiciones de reacción: (i) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 40 °C, 8 h; (ii) 3,5-dimetilpiperidina, MeOH,  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ , 10% Pd/C, 50 °C, 8 h

30

Se preparó siguiendo el procedimiento C: Una solución de 3-(3,4,5-trifluorofenil)acrilato de (E)-metilo (**2p**, 216 mg, 1 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,9 ml) se trató con fenol **1a** (154 mg, 1 mmol), TFA (2,7 ml) y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (15 mg, 0,069 mmol), y se agitó a 40 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad usando el evaporador Genevac y se usó en bruto en la siguiente etapa. El producto en bruto **9p** se disolvió en MeOH (1 ml), se trató con 3,5-dimetilpiperidina (2 mmol), Pd al 10 %/C (8 mg, 0,1 mmol) y formiato de amonio (67 mg, 1 mmol) y se calentó a 50 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH, se filtró a través de una columna de tior soportada sólida, y se concentró a

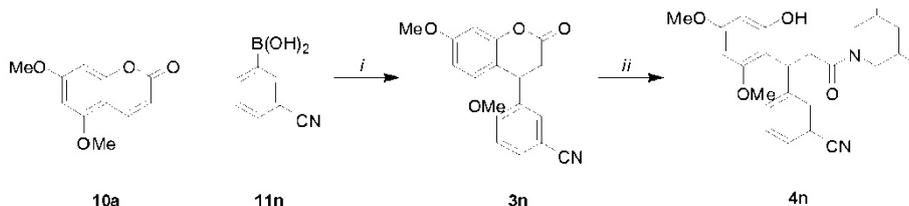
35

presión reducida. El material se purificó por HPLC para producir el compuesto **4p**.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 9,53 - 9,58 (m, 1 H) 6,99 - 7,09 (m, 2 H) 6,02-6,03 (m, 2 H) 4,88 - 4,95 (m, 1 H) 4,30 (d,  $J=12,32$  Hz, 1 H) 3,73 - 3,84 (m, 1 H) 3,67 - 3,70 (m, 3 H) 3,66 (d,  $J=0,78$  Hz, 3 H) 3,13 - 3,20 (m, 1 H) 3,05 (dd,  $J=15,36, 6,94$  Hz, 1 H) 2,97 (dd,  $J=16,24, 6,85$  Hz, 1 H) 2,36 - 2,46 (m, 1 H) 1,89 (t,  $J=12,03$  Hz, 1 H) 1,63 - 1,76 (m, 1 H) 1,19 - 1,29 (m, 2 H) 0,75 - 0,89 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  452,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R= 6,63$  min,  $\text{UV}_{254}= 99$  %.

### Compuesto 87 (Procedimiento D)

#### 3-(3-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-oxopropil)benzonitrilo (4n) (NCGC00242612,87)

10



Condiciones de reacción: (i)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , BIPY, AcOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , THF,  $60^\circ\text{C}$ , 8 h; (ii) 3,5-dimetilpiperidina, DMA,  $80^\circ\text{C}$ , 8 h

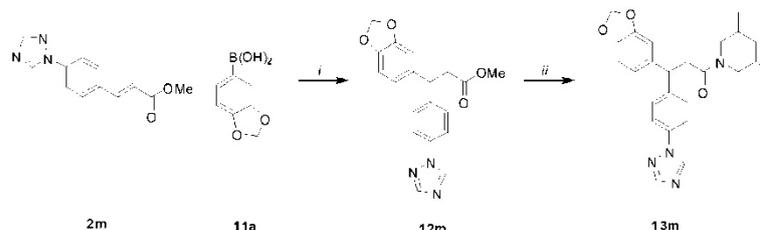
Se preparó siguiendo el procedimiento D: Una suspensión de cumarina **10a** (30 mg, 0,15 mmol), ácido borónico **11n** (64 mg, 0,4 mmol), BIPY (10 mg, 0,064 mmol), y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0,03 mmol) en AcOH (0,6 ml), THF (0,2 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 ml) se calentó a  $60^\circ\text{C}$  durante 8 h, y se concentró a sequedad en el evaporador Genevac para proporcionar **3** que se usó sin purificación en la siguiente etapa. La lactona en bruto **3n** se disolvió en DMF (0,8 ml), se trató con 3,5-dimetilpiperidina (0,1 ml, 0,75 mmol) y se calentó a  $80^\circ\text{C}$  durante 2 h punto en el que la reacción se completó de acuerdo con el análisis por LCMS. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH (~2 ml), se filtró a través de una columna de tior de soporte sólido y se purificó por HPLC para proporcionar **4n**.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 9,51 - 9,54 (m, 1 H) 7,60 (s, 1 H) 7,50 - 7,57 (m, 2 H) 7,40 (tt,  $J=7,70, 1,59$  Hz, 1 H) 6,03 (s, 1 H) 6,02 (s, 1 H) 4,99 (t,  $J=9,10$  Hz, 1 H) 4,30 (d,  $J=12,52$  Hz, 1 H) 3,77 (d,  $J=17,61$  Hz, 1 H) 3,68 (d,  $J=2,93$  Hz, 3 H) 3,65 (d,  $J=0,98$  Hz, 3 H) 3,23 (dd,  $J=15,94, 8,51$  Hz, 1 H) 3,06 (dd,  $J=15,65, 6,26$  Hz, 1 H) 2,93 (dd,  $J=15,26, 6,85$  Hz, 1 H) 2,40 - 2,46 (m, 1 H) 1,89 (t,  $J=11,93$  Hz, 1 H) 1,63 - 1,75 (m, 1 H) 1,18 - 1,31 (m, 2 H) 0,74 - 0,89 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  423,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R= 6,12$  min,  $\text{UV}_{254}= 90$  %.

25

### Compuesto 141 (Procedimiento E)

#### 3-(4-(1H-1,2,4-Triazol-1-il)fenil)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)propan-1-ona **13m** (NCGC00242637,141)

30



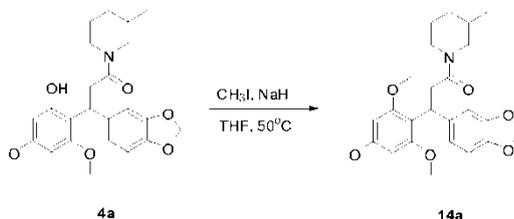
Condiciones de reacción: (i)  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , BIPY, AcOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , THF,  $60^\circ\text{C}$ , 8 h; (ii) 3,5-dimetilpiperidina, 2,3,4,6,7,8-hexahidro-1H-pirimido[1,2-a]pirimidina.  $70^\circ\text{C}$ , 8 h

Se preparó por el procedimiento E: Una suspensión de éster metílico cinnámico (**2m**, 224 mg, 0,97 mmol), ácido borónico **11a** (315 mg, 1,89 mmol), BIPY (30 mg, 0,192 mmol), y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (30 mg, 0,134 mmol) en AcOH (1,5 ml), THF (0,5 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (0,25 ml) se calentó a  $60^\circ\text{C}$  durante 8 h y se concentró a sequedad en el evaporador Genevac para proporcionar **12m** que se usó sin purificación en la siguiente etapa. El éster metílico en bruto se trató con 3,5-dimetilpiperidina (1,34 ml, 9,88 mmol) y 2,3,4,6,7,8-hexahidro-1H-pirimido[1,2-a]pirimidina (0,134 g, 0,96 mmol) y se calentó a  $70^\circ\text{C}$  durante 8 h, y la mezcla de reacción se purificó por HPLC para proporcionar la amida **13m**. LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  433,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R= 5,87$  min,  $\text{UV}_{254}= 99$  %.

40

**Compuesto 120 (Procedimiento F)****3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(3-metilpiperidin-1-il)-3-(2,4,6-trimetoxifenil)propan-1-ona****(14a)**

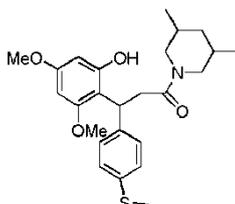
5



Se preparó por el procedimiento F: A una solución de **4a** (0,1 mmol, 43 mg) en THF seco (2 ml) se le añadió NaH (0,2 mmol, 5 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 0,5 h, se añadió MeI (56 mg, 0,4 mmol) y la mezcla se calentó a 60 °C durante 2 h. La solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron un par de gotas de agua y la mezcla se purificó por HPLC para dar el compuesto **14a**. LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  442,4 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$  = 2,35 min, UV<sub>254</sub> = 99 %.

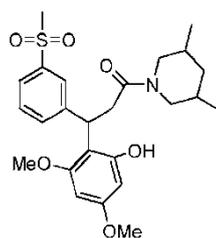
**Compuesto 105 (Procedimiento D)**

15

**1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(4-(metiltio)fenil)propan-1-ona**

20 Se preparó por el procedimiento D: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,38 (d,  $J$ =3,13 Hz, 1 H) 7,13 - 7,20 (m, 2 H) 7,06 - 7,13 (m, 2 H) 5,98 - 6,03 (m, 2 H) 4,87 - 4,92 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J$ =12,72 Hz, 1 H) 3,73 - 3,79 (m, 1 H) 3,67 (d,  $J$ =2,54 Hz, 3 H) 3,65 (s, 3 H) 3,24 - 3,28 (m, 1 H) 3,06 - 3,12 (m, 1 H) 2,92 (dd,  $J$ =15,36, 6,16 Hz, 1 H) 2,53 - 2,57 (m, 1 H) 2,40 (s, 3 H) 1,83 - 1,91 (m, 1 H) 1,62 - 1,72 (m, 1 H) 1,14 - 1,37 (m, 2 H) 0,73 - 0,85 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  444,2 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$  = 6,47 min, UV<sub>254</sub> = 99 %

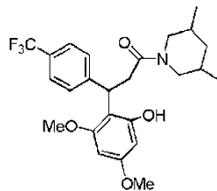
25

**Compuesto 83 (Procedimiento D)****1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3-(metilsulfonil)fenil)propan-1-ona**

30

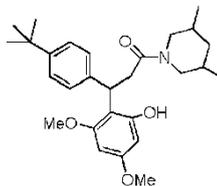
35 Se preparó por el procedimiento D: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,54 (d,  $J$ =9,19 Hz, 1 H) 7,77 (s, 1 H) 7,64 - 7,68 (m, 1 H) 7,51 - 7,56 (m, 1 H) 7,47 (t,  $J$ =7,73 Hz, 1 H) 5,99 - 6,06 (m, 2 H) 5,02 - 5,10 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J$ =13,11 Hz, 1 H) 3,74 - 3,82 (m, 1 H) 3,67 (d,  $J$ =1,76 Hz, 3 H) 3,65 (s, 3 H) 3,35 - 3,47 (m, 1 H) 3,19 - 3,26 (m, 1 H) 3,12 - 3,15 (m, 3 H) 2,99 - 3,10 (m, 1 H) 2,83 - 2,95 (m, 1 H) 1,84 - 1,93 (m, 1 H) 1,63 - 1,75 (m, 1 H) 1,13 - 1,35 (m, 2 H) 0,69 - 0,90 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  476,2 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$  = 5,63 min, UV<sub>254</sub> = 99 %

**Compuesto 86 (Procedimiento D)**

**1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(4-(trifluorometil)fenil)propan-1-ona**

5 Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 9,47 (d,  $J=3,91$  Hz, 1 H) 7,54 (d,  $J=6,65$  Hz, 2 H) 7,38 - 7,44 (m, 2 H) 6,03 (s, 1 H) 6,02 (s, 1 H) 5,03 (t,  $J=7,14$  Hz, 1 H) 4,31 (d,  $J=13,11$  Hz, 1 H) 3,77 (d,  $J=12,32$  Hz, 1 H) 3,67 (d,  $J=3,13$  Hz, 3 H) 3,65 (d,  $J=0,78$  Hz, 3 H) 3,25 (dd,  $J=15,45$ , 8,22 Hz, 1 H) 3,02 - 3,10 (m, 1 H) 2,92 (dd,  $J=15,06$ , 5,67 Hz, 1 H) 2,35 - 2,47 (m, 1 H) 1,89 (t,  $J=12,13$  Hz, 1 H) 1,63 - 1,73 (m, 1 H) 1,16 - 1,35 (m, 2 H) 0,71 - 0,89 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  466,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R=6,72$  min,  $\text{UV}_{254}=99\%$

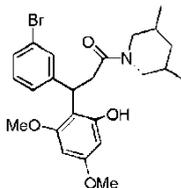
10

**Compuesto 89 (Procedimiento D)****3-(4-terc-Butilfenil)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona**

15

Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 9,32 - 9,38 (m, 1 H) 7,11 - 7,21 (m, 4 H) 5,97 - 6,04 (m, 2 H) 4,89 (dd,  $J=12,03$ , 7,92 Hz, 1 H) 4,31 (d,  $J=14,48$  Hz, 1 H) 3,75 (d,  $J=18,00$  Hz, 1 H) 3,68 (d,  $J=4,89$  Hz, 3 H) 3,64 - 3,66 (m, 3 H) 3,32 - 3,40 (m, 1 H) 3,11 (d,  $J=7,24$  Hz, 1 H) 2,87 (dd,  $J=14,18$ , 7,14 Hz, 1 H) 2,36 - 2,45 (m, 1 H) 1,86 (td,  $J=12,28$ , 5,77 Hz, 1 H) 1,65 (t,  $J=13,21$  Hz, 1 H) 1,27 - 1,38 (m, 2 H) 1,22 (d,  $J=1,76$  Hz, 9 H) 0,71 - 0,84 (m, 6 H) LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  454,3 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R=7,10$  min,  $\text{UV}_{254}=98\%$ .

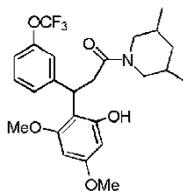
20

**Compuesto 85 (Procedimiento D)****25 3-(3-Bromofenil)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona**

Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 9,47 - 9,51 (m, 1 H) 7,38 (ddd,  $J=9,63$ , 1,71, 1,57 Hz, 1 H) 7,27 (dt,  $J=7,73$ , 1,03 Hz, 1 H) 7,19 - 7,23 (m, 1 H) 7,16 (d,  $J=7,83$  Hz, 1 H) 6,03 (t,  $J=2,18$  Hz, 1 H) 6,02 (t,  $J=2,18$  Hz, 1 H) 4,91 - 4,96 (m, 1 H) 4,27 - 4,35 (m, 1 H) 3,75 (d,  $J=15,65$  Hz, 1 H) 3,68 (d,  $J=4,30$  Hz, 3 H) 3,66 (s, 3 H) 3,17 (dd,  $J=14,97$ , 6,55 Hz, 1 H) 2,95 - 3,09 (m, 1 H) 2,75 - 2,88 (m, 1 H) 2,37 - 2,47 (m, 1 H) 1,88 (t,  $J=12,32$  Hz, 1 H) 1,62 - 1,75 (m, 1 H) 1,24 (s, 2 H) 0,74 - 0,86 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  478,1 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R=6,66$  min,  $\text{UV}_{254}=90\%$ .

35

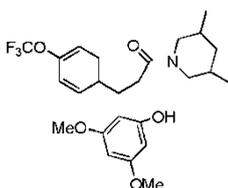
**Compuesto 93 (Procedimiento D)****1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3-(trifluorometoxi)fenil)propan-1-ona**



Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,50 (d,  $J=4,11$  Hz, 1 H) 7,31 (t,  $J=7,83$  Hz, 1 H) 7,22 (dd,  $J=8,12, 3,23$  Hz, 1 H) 7,17 (s a, 1 H) 7,06 (dd,  $J=8,12, 1,27$  Hz, 1 H) 6,00 - 6,03 (m, 2 H) 4,96 - 5,02 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J=12,32$  Hz, 1 H) 3,76 (d,  $J=14,28$  Hz, 1 H) 3,67 (d,  $J=3,52$  Hz, 3 H) 3,65 (s, 3 H) 3,20 (dd,  $J=15,06, 7,43$  Hz, 1 H) 3,05 (dd,  $J=15,85, 6,85$  Hz, 1 H) 2,87 (dd,  $J=15,94, 5,77$  Hz, 1 H) 2,37 - 2,46 (m, 1 H) 1,88 (td,  $J=12,62, 5,48$  Hz, 1 H) 1,63 - 1,74 (m, 1 H) 1,18 - 1,33 (m, 2 H) 0,71 - 0,90 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  482,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R= 6,79$  min,  $\text{UV}_{254}= 95$  %.

#### 10 Compuesto 96 (Procedimiento D)

##### 1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)propan-1-ona



15

Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,45 (s, 1 H) 7,32 (t,  $J=7,14$  Hz, 2 H) 7,17 (d,  $J=8,41$  Hz, 2 H) 6,02 (s, 1 H) 6,02 (s, 1 H) 4,96 (t,  $J=7,53$  Hz, 1 H) 4,31 (d,  $J=13,11$  Hz, 1 H) 3,75 (d,  $J=16,24$  Hz, 1 H) 3,68 (d,  $J=4,30$  Hz, 3 H) 3,65 (d,  $J=1,57$  Hz, 3 H) 3,19 (dd,  $J=15,45, 7,04$  Hz, 1 H) 3,06 (dd,  $J=15,65, 6,46$  Hz, 1 H) 2,89 (dd,  $J=14,97, 5,58$  Hz, 1 H) 2,36 - 2,44 (m, 1 H) 1,88 (t,  $J=11,25$  Hz, 1 H) 1,63 - 1,71 (m, 1 H) 1,18 - 1,35 (m, 2 H) 0,80 (dd,  $J=6,46, 1,57$  Hz, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  482,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R= 6,79$  min,  $\text{UV}_{254}= 95$  %.

20

#### Compuesto 101 (Procedimiento D)

##### Ácido 3-(3-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-oxopropil)benzoico

25



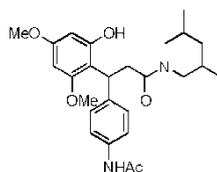
Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 12,73 (s a, 1 H) 9,44 - 9,48 (m, 1 H) 7,82 - 7,89 (m, 1 H) 7,65 (d,  $J=7,63$  Hz, 1 H) 7,46 (t,  $J=9,68$  Hz, 1 H) 7,27 - 7,33 (m, 1 H) 6,00 - 6,04 (m, 2 H) 4,97 - 5,03 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J=15,45$  Hz, 1 H) 3,73 - 3,81 (m, 1 H) 3,67 (d,  $J=4,69$  Hz, 3 H) 3,65 (s, 3 H) 3,12 - 3,24 (m, 1 H) 2,98 (dd,  $J=13,79, 7,92$  Hz, 1 H) 2,76 - 2,89 (m, 1 H) 2,37 - 2,47 (m, 1 H) 1,84 - 1,92 (m, 1 H) 1,62 - 1,74 (m, 1 H) 1,24 (s, 2 H) 0,71 - 0,91 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  442,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R= 5,51$  min,  $\text{UV}_{254}= 98$  %.

30

#### Compuesto 81 (Procedimiento D)

35

##### N-(4-(3-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-oxopropil)fenil)acetamida

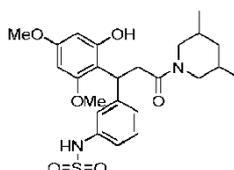


Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,74 (s, 1 H) 9,36 (d,  $J=2,35$  Hz, 1 H) 7,29 - 7,44 (m, 2 H) 7,07 (t,  $J=7,92$  Hz, 1 H) 6,93 (t,  $J=8,02$  Hz, 1 H) 5,99 - 6,03 (m, 2 H) 4,85 - 4,95 (m, 1 H) 4,32 (d,  $J=13,50$  Hz, 1 H) 3,72 - 3,78 (m, 1 H) 3,66 - 3,68 (m, 3 H) 3,65 (d,  $J=0,78$  Hz, 3 H) 2,90 - 3,02 (m, 1 H) 2,84 (dd,  $J=15,55$ , 6,16 Hz, 1 H) 2,71 (dd,  $J=12,91$ , 6,46 Hz, 1 H) 2,37 - 2,46 (m, 1 H) 1,98 (s, 3 H) 1,86 (t,  $J=13,21$  Hz, 1 H) 1,61 - 1,73 (m, 1 H) 1,11 - 1,25 (m, 2 H) 0,71 - 0,84 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  455,3 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R=$  5,45 min,  $\text{UV}_{254}=$  99 %.

**Compuesto 82 (Procedimiento D)**

10

**N-(3-(3-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-oxopropil)fenil)metanosulfonamida**

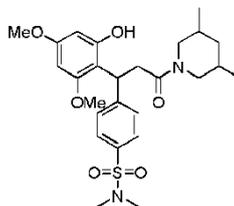


15 Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,38 (s, 1 H) 7,08 (t,  $J=7,83$  Hz, 1 H) 6,88 (d,  $J=14,87$  Hz, 1 H) 6,81 (d,  $J=6,65$  Hz, 1 H) 6,73 (dd,  $J=8,51$ , 1,86 Hz, 1 H) 6,01 (d,  $J=1,37$  Hz, 2 H) 5,00 (s, 1 H) 4,90 (t,  $J=7,63$  Hz, 1 H) 4,32 (d,  $J=12,72$  Hz, 1 H) 3,72 - 3,79 (m, 1 H) 3,62 - 3,68 (m, 6 H) 3,32 (s, 3 H) 3,28 (d,  $J=8,61$  Hz, 1 H) 3,10 (d,  $J=8,41$  Hz, 1 H) 2,91 (dd,  $J=15,06$ , 6,85 Hz, 1 H) 2,35 - 2,44 (m, 1 H) 1,86 (t,  $J=12,13$  Hz, 1 H) 1,61 - 1,70 (m, 1 H) 1,13 - 1,35 (m, 2 H) 0,71 - 0,84 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  491,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R=$  5,53 min,  $\text{UV}_{254}=$  85 %.

**Compuesto 84 (Procedimiento D)**

25

**4-(3-(3-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-oxopropil)-N,N-dimetilbencenosulfonamida**

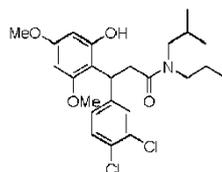


30 Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,48 (d,  $J=2,93$  Hz, 1 H) 7,54 (dd,  $J=8,31$ , 2,05 Hz, 2 H) 7,38 - 7,44 (m, 2 H) 6,00 (s, 1 H) 5,99 (s, 1 H) 4,98 - 5,03 (m, 1 H) 4,29 (d,  $J=15,85$  Hz, 1 H) 3,77 - 3,83 (m, 1 H) 3,63-3,62 (m, 6 H) 3,30 - 3,34 (m, 1 H) 3,18 (d,  $J=6,46$  Hz, 1 H) 3,04 (dd,  $J=15,75$ , 7,14 Hz, 1 H) 2,88 (dd,  $J=16,82$ , 5,67 Hz, 1 H) 2,52 - 2,57 (m, 6 H) 1,82 - 1,90 (m, 1 H) 1,60 - 1,70 (m, 1 H) 1,16 - 1,26 (m, 2 H) 0,67 - 0,86 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  505,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R=$  5,99 min,  $\text{UV}_{254}=$  85 %.

**Compuesto 88 (Procedimiento D)**

35

**3-(3,4-Diclorofenil)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona**

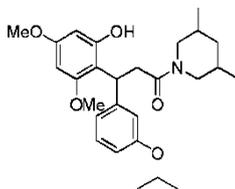


40 Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,53 (d,  $J=5,28$  Hz, 1 H) 7,41 - 7,46 (m, 1 H) 7,39 (t,  $J=1,66$  Hz, 1 H) 7,17 (dt,  $J=8,36$ , 1,59 Hz, 1 H) 6,00 - 6,04 (m, 2 H) 4,90 - 4,96 (m, 1 H) 4,30 (d,  $J=10,56$  Hz, 1 H) 3,77 (s, 1 H) 3,68 (d,  $J=2,74$  Hz, 3 H) 3,66 (s, 3 H) 3,19 (dd,  $J=14,97$ , 8,12 Hz, 1 H) 3,02 (dd,  $J=15,45$ , 6,65 Hz, 1 H) 2,87 (dd,  $J=14,67$ , 6,26 Hz, 1 H) 2,41-2,46 (m, 1 H) 1,89 (t,  $J=12,42$  Hz, 1 H) 1,63 - 1,75 (m, 1 H) 1,18 - 1,30 (m, 2

H) 0,74 - 0,90 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  466,1 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$ = 6,90 min, UV<sub>254</sub>= 99 %.

**Compuesto 94 (Procedimiento D)**

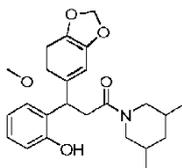
5 **1-(3,5-Dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3-isopropoxifenil)propan-1-ona**



Se preparó por el procedimiento D: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,38 (s, 1 H) 7,05 (t,  $J$ =8,12 Hz, 1 H) 6,73 - 6,80 (m, 2 H) 6,59 - 6,64 (m, 1 H) 5,99 - 6,04 (m, 2 H) 4,86 - 4,92 (m, 1 H) 4,44 - 4,51 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J$ =12,52 Hz, 1 H) 3,71 - 3,81 (m, 1 H) 3,67 (d,  $J$ =4,89 Hz, 3 H) 3,64 - 3,66 (m, 3 H) 3,28 (d,  $J$ =10,56 Hz, 1 H) 3,10 (d,  $J$ =9,00 Hz, 1 H) 2,88 (dd,  $J$ =16,24, 6,65 Hz, 1 H) 2,35 - 2,44 (m, 1 H) 1,82 - 1,90 (m, 1 H) 1,66 (d,  $J$ =14,87 Hz, 1 H) 1,14 - 1,29 (m, 6 H) 0,73 - 0,82 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  456,2 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$ = 6,61 min, UV<sub>254</sub>= 90 %.

15 **Compuesto 140 (Procedimiento D)**

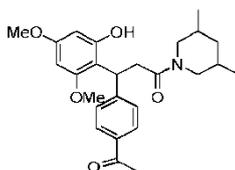
**3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-6-metoxifenil)propan-1-ona**



20 Se preparó por el procedimiento D: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,35 - 9,37 (m, 1 H) 6,93 (t,  $J$ =8,12 Hz, 1 H) 6,85 (d,  $J$ =16,04 Hz, 1 H) 6,71 (d,  $J$ =1,17 Hz, 2 H) 6,41 (d,  $J$ =8,22 Hz, 2 H) 5,88 - 5,91 (m, 2 H) 4,93 - 5,02 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J$ =13,11 Hz, 1 H) 3,75 - 3,79 (m, 1 H) 3,70 (d,  $J$ =0,98 Hz, 3 H) 3,13 (dd,  $J$ =15,85, 8,22 Hz, 1 H) 2,96 (dd,  $J$ =15,55, 6,94 Hz, 1 H) 2,83 - 2,91 (m, 1 H) 2,35 - 2,46 (m, 1 H) 1,82 - 1,90 (m, 1 H) 1,62 - 1,76 (m, 1 H) 1,15 - 1,34 (m, 2 H) 25 0,72 - 0,91 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  412,1 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$ = 6,11 min, UV<sub>254</sub>= 90 %.

**Compuesto 100 (Procedimiento D)**

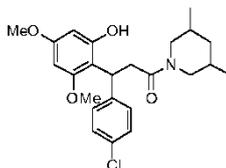
30 **3-(4-Acetilfenil)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona**



35 Se preparó por el procedimiento D: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,42 - 9,47 (m, 1 H) 7,78 (d,  $J$ =8,22 Hz, 2 H) 7,33 (d,  $J$ =8,22 Hz, 2 H) 5,98 - 6,05 (m, 2 H) 4,99 - 5,04 (m, 1 H) 4,31 (d,  $J$ =15,06 Hz, 1 H) 3,74 - 3,80 (m, 1 H) 3,62 - 3,70 (m, 6 H) 3,14 - 3,25 (m, 1 H) 3,09 (d,  $J$ =9,59 Hz, 1 H) 2,96 (d,  $J$ =9,00 Hz, 1 H) 2,55 (d,  $J$ =3,91 Hz, 1 H) 2,52 (s, 3 H) 1,85 - 1,94 (m, 1 H) 1,63 - 1,76 (m, 1 H) 1,20 - 1,28 (m, 2 H) 0,64 - 0,90 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  440,2 (MH)<sup>+</sup>; HPLC:  $t_R$ = 5,92 min, UV<sub>254</sub>= 90 %.

**Compuesto 78 (Procedimiento D)**

40 **3-(4-Clorofenil)-1-(3,5-dimetilpiperidin-1-il)-3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)propan-1-ona**



Se preparó por el procedimiento D:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 9,43 (d,  $J=4,30$  Hz, 1 H) 7,22 (d,  $J=3,72$  Hz, 4 H) 5,99 - 6,03 (m, 2 H) 4,90 - 4,95 (m, 1 H) 4,30 (d,  $J=11,93$  Hz, 1 H) 3,73- 3,77 (m, 1 H) 3,63 - 3,69 (m, 6 H) 3,11 - 3,18 (m, 1 H) 2,97 - 3,08 (m, 1H) 2,56 (s a, 1 H), 2,38- 2,46 (m, 1 H) 1,86 (d,  $J=11,74$  Hz, 1 H) 1,61 - 1,75 (m, 1 H) 1,15 - 1,27 (m, 2 H) 0,69 - 0,92 (m, 6 H); LCMS: (electronebulización +ve),  $m/z$  432,2 (MH) $^+$ ; HPLC:  $t_R$ = 6,62 min,  $\text{UV}_{254}$ = 99 %.

### Desarrollo de un ensayo de cribado de alto rendimiento

10

**Procedimientos:** La línea celular de S2 de *Drosophila* se adquirió originalmente en Invitrogen y se mantuvo en medio de Schneider complementado con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10 % y antibióticos (Invitrogen). El dominio de unión a ADN de Gal4 (G4DBD) correspondiente a los aminoácidos 1 a 147 de la proteína Gal4 se amplificó por PCR para hacer una construcción de fusión con RORyt de ratón (aminoácidos 79 al extremo carboxilo terminal) que carecía de su dominio de unión a ADN. El gen quimérico resultante se subclonó en el vector pMT/V5-His A inducible por cobre (disponible en Invitrogen). De manera similar, las construcciones de fusión de Gal4 se prepararon con ROR $\alpha$  de ratón (aminoácidos 142 hasta el extremo) o DHR3 de *Drosophila* (aminoácidos 120 hasta el extremo). Las secuencias codificantes para luciferasa de luciérnaga (disponibles en Promega) se amplificaron por PCR y se subclonaron en el vector pUAST que contenía secuencias potenciadoras de unión a Gal4. pUAST es un vector de *Drosophila* utilizado comúnmente por expertos en la técnica y se ha descrito por Brand y col. (Development 118(2):401-415, 1993).

La construcción de luciferasa de Renilla bajo el promotor polIII se obtuvo del laboratorio del Dr. Dasgupta (centro médico de la Universidad de Nueva York). Para generar líneas celulares estables, las células se cotransfectaron con pMT-G4DBD-RORyt, pMT-G4DBD-ROR $\alpha$ , pMT-G4DBD-DHR3, o pMT-G4DBDVP16 y plásmidos de pHigro (Invitrogen) y se cribaron para detectar colonias resistentes en presencia de higromicina (0,3 mg/ml). Más de 150 clones estables de RORy independientes con indicadores de luciferasa (pMt-RORy\_luc) se ensayaron para determinar su idoneidad para el cribado de alto rendimiento (HTS) basándose en los siguientes criterios: alta relación señal-fondo en placas de 384 y 1.536 pocillos, su alta tasa de inducción tras la adición de cobre, y la especificidad de RORy/yt sondada por la supresión mediada por antagonistas de dsRORy o RORy/yt. Los clones positivos se transfectaron adicionalmente con luciferasa de luciérnaga pUAST, luciferasa de polIII-Renilla y pCoPuro (Iwaki, Figuera y col. 2003) («Rapid selection of *Drosophila* S2 cells with the puromycin resistance gene.» Biotechniques 35(3): 482-4, 486.) y se seleccionaron con puromicina (2,5 ug/ml). Finalmente se seleccionaron siete clones, y uno de ellos (clon estable n.º 25) se usó posteriormente para el HTS a gran escala. Usando procedimientos similares, se generaron clones estables con integración genómica de los indicadores de luciferasa y otros indicadores, tales como pMT-ROR $\alpha$ \_luc, pMT-DHR3\_luc, o pMT-VP16\_luc.

**Resultados y análisis:** Se desarrolló un sistema de ensayo basado en la actividad que permite el cribado de alto rendimiento (HTS) para los moduladores químicos de la actividad transcripcional RORyt. Dado que RORyt se encuentra exclusivamente en los núcleos celulares, incluso cuando se introducen mutaciones en la bolsa de unión del ligando putativo, la activación transcripcional dependiente de RORyt, en lugar del citoplasma inducido por el ligando utilizado a menudo con respecto a la translocación del núcleo del receptor hormonal, sirvió como una mejor lectura. Se usó un ensayo basado en células para eliminar las moléculas tóxicas e impermeables a las células y para realizar una selección en un entorno biológicamente relevante. El sistema empleado proporcionó una alta relación señal-ruído y fue capaz de manejar una criba a gran escala, además de ser rentable. Las células S2 se derivaron de embriones de *Drosophila melanogaster* de etapa tardía con morfología de tipo hemocitos y perfiles de expresión génica (Schneider, I. J Embryol Exp Morphol, 1972, 27, 353-65). Crecieron a temperatura ambiente como una monocapa semiadherente sin necesidad de  $\text{CO}_2$ , lo que facilita la aplicación de grandes conjuntos de pequeñas moléculas químicas y la transferencia de células sin tratamiento con tripsina.

50

Al igual que otros receptores hormonales, RORyt contiene un dominio de unión a ADN (DBD) y un dominio de unión a ligando (LBD). El DBD se reemplazó con el DBD GAL4 de levadura heterólogo, debido a que los sitios de unión al ADN endógeno para RORyt están peor caracterizados.

55 La construcción de fusión GAL4-RORyt se colocó bajo el control de un promotor inducible por cobre, y se generaron

líneas de células S2 estables con integración genómica de esta construcción. El promotor inducible por cobre garantiza una regulación estricta de la expresión de GAL4-RORyt y permite que las moléculas pequeñas entren en las células antes de su inducción, lo que aumenta sus efectos sobre GAL4-RORyt. Las células indicadoras también portaban el indicador de luciferasa de luciérnaga, cuya expresión está regulada por cinco copias del potenciador del sitio de unión a GAL4 (UAS) y un promotor de choque térmico constitutivo, junto con un plásmido de control, luciferasa de Renilla impulsada por pol III. Se demostró previamente que la luciferasa de Pol III-Renilla sirve como un excelente control de la transfección y la viabilidad celular en el sistema de células S2. El uso de la luciferasa de Pol III-Renilla permitió la normalización de la actividad de luciferasa de luciérnaga impulsada por RORyt y redujo los efectos citotóxicos y corrigió la posible imprecisión de células en el medio de cultivo (Armknrecht, S. y col. *Methods Enzymol*, 2005, 392, 55-73).

5 Cuando se añadió Cu<sup>++</sup>, la relación de luciferasa de luciérnaga y luciferasa de Renilla (relación de FR) en estas células aumentó más de 100 veces en comparación con las células de control que carecen de GAL4-RORyt (aumento de ~34 veces en comparación con las células GAL4-RORyt tratadas con dsROR). RORyt induce una activación transcripcional robusta en células S2 de *Drosophila* en placas de 384 pocillos. Para la prueba con transfección transitoria, el indicador de luciérnaga en los sitios de unión a GAL4 y los plásmidos de control Pol III-Renilla se transfirieron transitoriamente

10 junto con ARNs (75 ng), dirigidos a EYFP o RORy, tanto en el control como en las líneas celulares S2 estables pMT-GAL4-RORyt (10.000 células/pocillo). Después de tres días, se añadió cobre para inducir GAL4-RORyt, y se midió la actividad de luciferasa dual después de la incubación durante una noche. El aumento también se observó cuando el experimento se realizó en placas de 384 pocillos, lo que demuestra que se puede adoptar como una criba de alto rendimiento. La cotransfección de ARNs que se dirige a RORyt suprimió la inducción de luciferasa de luciérnaga

15 mediada por ROR, lo que demuestra que esta actividad es dependiente de ROR.

Con el fin de confirmar que la función de RORyt en células S2 era fisiológicamente relevante, primero se confirmó que *Drosophila* tiene un homólogo de RORyt. El ratón codifica tres proteínas ROR diferentes, ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  y ROR $\gamma$ . RORy y RORyt son dos isoformas que difieren en las secuencias de ARNm N-terminal no traducidas. De hecho, *Drosophila*

25 tiene un homólogo de ROR, el receptor hormonal de *Drosophila* 3 (DHR3) (King-Jones, K. & Thummel, C. S. *Nat Rev Genet*, 2005, 6, 311-23). El alineamiento basado en la estructura utilizando BLAST reveló una identidad de aminoácidos del 48 % entre DHR3 y RORyt.

A continuación, se confirmó que los ligandos de RORyt están probablemente presentes en las células S2 de

30 *Drosophila*. Dado que se encuentra que muchos ligandos para los receptores de hormonas nucleares son esteroides o sus derivados, se intentó el crecimiento de células en un medio que carece de FBS (suero bovino fetal) o un medio complementado con suero extraído de ácidos grasos (tratado con carbón vegetal). Solo se detectó una pequeña disminución de la relación de FR en las células cultivadas en esta condición, y los resultados no fueron concluyentes. Estudios anteriores han demostrado que la introducción de un solo aminoácido dentro de la bolsa de unión al ligando

35 de ROR $\beta$  anula su función como activador transcripcional, lo que sugiere que ROR $\beta$  es un receptor hormonal dependiente de ligando. La estructura cristalina de la proteína sugirió fuertemente que el reemplazo de la alanina 269 con aminoácidos que llevan cadenas laterales más voluminosas, tal como valina y fenilalanina, evitaría la unión de ligandos endógenos sin afectar el correcto plegamiento del dominio de unión a ligando (Stehlin, C. y col. *Embo J*, 2001, 20, 5822-31). Cuando el resto de alanina correspondiente en la bolsa de unión a ligando putativo de RORyt se

40 reemplazó con fenilalanina, la proteína mutante ya no era suficiente para inducir la diferenciación de las células Th17 cuando se transduce en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón, consistente con la presencia de ligando o ligandos de RORyt análogos en estas células. La mutación de Ala en Phe en RORyt también anuló completamente la activación transcripcional de la expresión de luciferasa de luciérnaga sin afectar a la transcripción de la luciferasa de Renilla de control, lo que sugiere que el ligando RORyt está presente en el sistema de ensayo de *Drosophila*. De hecho, la

45 introducción de la mutación de alanina en fenilalanina (F) en un bolsillo de unión a ligando putativo anula la actividad de RORyt en este sistema. Como se confirmó mediante inmunotransferencia, la mutación de alanina en fenilalanina no afectó, sin embargo, a la estabilidad de la proteína.

DHR3 se regula transcripcionalmente por 20-hidroxiecisona (20E) y es esencial para el desarrollo de larvas de mosca

50 (King-Jones, anteriormente). Se ha demostrado que E75, otro receptor de hormona nuclear de mosca dependiente de 20E, regula negativamente la función de DHR3 (White, K. P., Hurban, P., Watanabe, T. & Hogness, D. S. *Science*, 1997, 276, 114-17; Reinking, J. y col. *Cell*, 2005, 122, 195-207. De hecho, la coexpresión de E75a o E75b (dos isoformas de *Drosophila* E75) disminuyó el nivel de activación transcripcional mediada por DHR3 de una manera dependiente de la dosis. E75 es un receptor hormonal que tiene actividades antagonistas de DHR3 y RORyt. La transfección de una cantidad aumentada de E75a o E75b dio como resultado una reducción concomitante de la

55 relación de FR. Cada pocillo recibió la misma cantidad de ADN en la mezcla de transfección. Estos genes de mosca también funcionan como reguladores negativos dependientes de la dosis para la actividad de RORyt de ratón en células S2, sin afectar a las funciones de un activador transcripcional irrelevante VP16, lo que sugiere en gran medida que el mecanismo regulador central de ROR/DHR3 se conserva entre los sistemas ratón y mosca. En conjunto, estos

60 datos confirman la exactitud y la relevancia del enfoque anterior utiliza el sistema heterólogo de células S2 para

identificar agonistas o antagonistas químicos del receptor de hormona de ratón ROR $\gamma$ t.

#### Medición de la actividad de la luciferasa.

5 Procedimientos: El sistema Promega Dual-Glo se usa ampliamente para HTS como sustratos de luciferasa. El medio de cultivo celular se redujo al volumen final de 10  $\mu$ l o menos y se añadieron 10  $\mu$ l de Dual-glo y 10  $\mu$ l de sustratos de luciferasa Stop-glo de forma secuencial (Promega). La actividad de luciferasa de luciérnaga y Renilla se determinó midiendo las señales de luminiscencia utilizando un lector de placas automático de 384 pocillos equipado con múltiples unidades de apilamiento (tal como los lectores de placas Analyst GT o Envision).

10

Resultados y análisis: El sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo de Promega facilitó la medición de la actividad luciferasa en HTS. Primero, no requería una etapa de lavado, y las actividades de luciferasa tanto de la luciérnaga como de la Renilla se podían medir en el mismo pocillo, una detrás de la otra. En segundo lugar, las señales que produjo permanecieron estables durante más de dos horas, lo que hace posible medir la actividad de muchas placas diferentes para un experimento dado. Dado que los reactivos son costosos, el volumen de medio se redujo a un tercio antes de añadir sustratos de luciferasa, de modo que se usaron menos sustratos. Sin embargo, cuando minimizar el coste es una prioridad secundaria, los sustratos de luciferasa utilizados en el ensayo primario pueden añadirse directamente a las células sin pasar por esta etapa adicional.

#### 20 HTS para la identificación de antagonistas de ROR $\gamma$ /yt utilizando líneas celulares estables ROR $\gamma$ /yt-luc

Procedimientos: Se distribuyeron 600 células indicadoras G4DBD-ROR $\gamma$ /yt-luc (n.º 25) o indicadoras G4DBD-VP16-luc en cada pocillo de placas de fondo blanco de 1.536 pocillos en 4  $\mu$ l de volumen de cultivo de células S2 que contenía higromicina (300  $\mu$ g/ml) y puromicina (2  $\mu$ g/ml). Un robot transfirió a través de alfileres (23 nl) compuestos pequeños en siete concentraciones diferentes de 46  $\mu$ M a 1,7 nM (Inglese y col., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:11473-8). Después de una hora de incubación, se añadieron a cada pocillo 1  $\mu$ l de solución de medio de cultivo que contenía sulfato de cobre (hasta 0,7 mM final) y antagonistas ROR $\gamma$ /yt 10  $\mu$ M. Después de 20 horas de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 1,5  $\mu$ l de la mezcla de detección de luciferasa de luciérnaga y las actividades de luciferasa se midieron en 10 min. Se utilizaron luminómetros ViewLux para medir la señal de luciferasa.

30

Resultados y análisis: A pesar de que se usaron con éxito células G4BD-ROR $\gamma$ t estables con transfección transitoria de dos construcciones de luciferasa para el cribado a pequeña escala y llevaron a los presentes inventores a identificar antagonistas específicos de ROR $\gamma$ /yt en Harvard LCCB, se volvió problemático aplicar el mismo procedimiento para cribas de mayor escala con bibliotecas químicas que incluían más de 250.000 compuestos. Primero, el procedimiento de transfección transitoria a menudo produjo una variación entre pocillos debido a la mezcla incompleta y la distribución desigual de la mezcla de transfección. También hay variaciones diarias en la preparación de la mezcla de transfección maestra. Segundo, para ahorrar reactivo y manejar grandes cantidades de químicos, fue necesario hacer la criba con un número reducido de células en un volumen de cultivo más pequeño. Además, realizar la criba con placas de 1.536 pocillos es más eficiente que realizar la criba con placas de 384 pocillos. Por lo tanto, se desarrollaron nuevas células estables indicadoras ROR $\gamma$ /yt-luc para eliminar la necesidad de transfección repetida y lograr una mayor consistencia entre pocillos. Cuando se ensayó en una placa de 384 pocillos, incluso un pequeño número de células (400 células/pozo) dieron una señal alta de luciferasa de luciérnaga (por lo tanto, una alta actividad de ROR $\gamma$ /yt), que se suprime (reducción de 22 veces cuando se usan 400 células) por adición de un antagonista de ROR $\gamma$ /yt. Los nuevos sistemas de líneas celulares estables también resultaron adecuados para HTS en placas de 1.536 pocillos, porque el valor de z es 0,75 cuando se usan 600 células por pocillo con 10  $\mu$ l de volumen de cultivo celular total.

45

Usando líneas indicadoras ROR $\gamma$ /yt-luc, la criba piloto con la genoteca LOPAC (Sigma) se realizó a través de un programa de hoja de ruta NIH para identificar compuestos antagonistas de ROR $\gamma$ /yt. LOPAC contiene 1.280 compuestos farmacológicamente activos. Entre estos, se encontraron aproximadamente 40 compuestos como aciertos iniciales (~0,3 %). Estos aciertos se ensayaron frente a cribas de validación para identificar compuestos específicos de ROR $\gamma$ /yt. Para facilitar una validación a gran escala, se desarrollaron líneas celulares indicadoras VP16-luc con integraciones genómicas de G4BD-VP16, UAS $\beta$ -fluc y pIII-Rluc como se ha analizado anteriormente. Estas células también mostraron una actividad de VP16 robusta y consistente en placas de 1.536 pocillos (datos no mostrados) y, por lo tanto, pueden usarse como un buen indicador de control para eliminar los compuestos que inhiben la transcripción general, la función del dominio de unión al ADN de GAL4, y una importación nuclear de proteínas quiméricas GAL4. De hecho, muchos compuestos se identificaron como aciertos iniciales para reducir la actividad de ROR $\gamma$ /yt de la criba piloto de LOPAC, pero a continuación se encontró que eran inhibidores no específicos, porque redujeron las actividades tanto de ROR $\gamma$ /yt como de VP16. Curiosamente, los antagonistas específicos de ROR $\gamma$ /yt identificados previamente mediante HTS a pequeña escala, también inhibieron selectivamente la actividad de ROR $\gamma$ /yt sin afectar a VP16, lo que confirma su especificidad en ROR $\gamma$ /yt. Se realizó una criba a gran escala que incluía más

60

de 250.000 compuestos contra los sistemas indicadores ROR $\gamma$ / $\gamma$ t-luc y VP16-luc en paralelo para identificar antagonistas específicos de ROR $\gamma$ / $\gamma$ t de una manera sistemática.

Los ensayos secundarios dirigidos hacia la evaluación de la capacidad de tales compuestos para suprimir la diferenciación de células Th17 de ratón o humanas también se incluyen en el presente documento. Los ensayos secundarios ejemplares que sirven para confirmar los inhibidores genuinos de ROR $\gamma$  incluyen, sin limitación:

#### **Listas de cribado secundarias**

- 10 1) Sistema indicador de células S2: Los aciertos identificados de HTS se criban adicionalmente y su especificidad se confirma mediante pruebas contra las líneas celulares S2 indicadoras ROR $\gamma$ -luc, VP16-luc, ROR $\alpha$ -luc y DHR3-luc. Los compuestos que no tienen actividad en VP16, ROR $\alpha$  y DHR3 o que tienen valores de  $CI_{50}$  diez veces más altos en dichos indicadores se seleccionan para ensayos adicionales.
- 15 2) La citocina indujo la diferenciación de células Th17 de ratón. Los efectos sobre ROR $\gamma$ t endógeno de ratón en un entorno fisiológico relevante se determinaron ensayando compuestos en el ensayo de diferenciación de células Th17. Se predice que los compuestos que tienen actividad inhibitoria de ROR $\gamma$ t suprimen la diferenciación de células Th17. Se usó la diferenciación de células Th1 o linfocitos T reguladores como un procedimiento de cribado por recuento para seleccionar compuestos específicos que solo afectan la diferenciación de células Th17 sin tener efectos pleiotróficos en la proliferación de linfocitos T generales o en la producción de citocinas.
- 20 3) Diferenciación de células Th17 dependiente de ROR. Los compuestos se ensayaron de nuevo, examinando sus efectos en los linfocitos T que expresan ROR $\alpha$  o ROR $\gamma$ . Se espera que los compuestos que inhiben directamente ROR $\gamma$  inhiban la diferenciación de Th17 dependiente de ROR $\gamma$  pero no de ROR $\alpha$ . Sin embargo, se espera que los compuestos que afectan a la producción de IL17a o las rutas reguladoras de ROR inhiban ambas.
- 25 4) Diferenciación de células Th17 humanas. Los efectos de los compuestos en ROR $\gamma$ t humano se ensayarán tratando los linfocitos T CD4 de sangre de cordón umbilical con compuestos selectos para determinar si dichos compuestos alteran la diferenciación en linajes de Th17.

Con aspectos de la invención reivindicada que ahora se describen en general, estos se entenderán más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos.

30

#### **EJEMPLOS**

Como se ha detallado anteriormente, con el fin de identificar moléculas pequeñas para antagonizar la actividad transcripcional de ROR $\gamma$ / $\gamma$ t, los presentes inventores desarrollaron sistemas indicadores basados en líneas celulares de insecto, que expresan ROR $\gamma$ / $\gamma$ t murino o activadores transcripcionales estrechamente relacionados. Dado que sus sitios de unión a ADN análogos no estaban bien caracterizados, los dominios de unión a ADN (DBD) de ROR $\gamma$ / $\gamma$ t, ROR $\alpha$  (homólogo de ratón para POP $\gamma$ ) y DHR3 (ortólogo de *Drosophila* para proteínas de la familia ROR) se reemplazaron con el DBD GAL4 de levadura heterólogo. El dominio transcripcionalmente activo del activador transcripcional general VP16 también se fusionó con DBD GAL4. Las construcciones de fusión de GAL4 se colocaron bajo el control de un promotor inducible por cobre, y se generaron líneas celulares S2 estables con integración genómica de estas cuatro construcciones indicadoras. El promotor inducible por cobre garantiza una regulación estricta de la expresión de la proteína de fusión GAL4 y permite que las moléculas pequeñas entren en las células antes de la inducción de proteínas, lo que aumenta sus efectos en los indicadores de GAL4. Las líneas celulares indicadoras estables también codifican el indicador de luciferasa de luciérnaga, cuya expresión está regulada por cinco copias del potenciador del sitio de unión a GAL4 (UAS), junto con el indicador de luciferasa de Renilla dirigido por pol III. La luciferasa Pol III-Renilla se incluyó para servir como control de la viabilidad celular en el sistema de células S2 (Armknecht, S. y col. *Methods Enzymol* 392, 55-73 (2005)).

A partir del cribado de una biblioteca de compuestos químicos que consiste en 4.812 compuestos, incluidas las colecciones conocidas de Bioactives y Prestwick, se identificaron varios compuestos como inhibidores de moléculas pequeñas para la actividad transcripcional de ROR $\gamma$ / $\gamma$ t.

#### **Determinaciones de $CI_{50}$**

55 Se usó un ensayo indicador basado en células para detectar la actividad mediada por ROR $\gamma$ t. Este ensayo, llamado ROR $\gamma$ t empleó células de *Drosophila* Schneider que se transfectaron de manera estable con dos vectores: un gen que expresa una fusión del dominio de unión al ADN de Gal4 y el dominio de transactivación de ROR $\gamma$ t bajo el control del promotor de metalotionina y un indicador de luciferasa de *Photinus* regulado por el potenciador del sitio de unión a Gal4, UAS. La adición de cobre al medio indujo la expresión de la fusión Gal4-ROR $\gamma$ t, que posteriormente indujo la expresión del indicador UAS-luciferasa. Los inhibidores de moléculas pequeñas de la actividad de ROR $\gamma$ t se

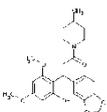
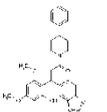
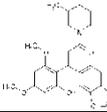
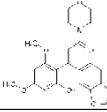
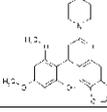
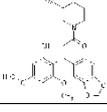
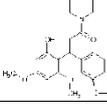
60

detectaron por una disminución en la actividad del indicador de luciferasa. Las células (600/pocillo) se dispensaron en placas de 1536 pocillos de sólido blanco (Greiner) usando un dispensador a base de solenoide. Después de la transferencia de compuesto 23 nl o vehículo DMSO mediante una herramienta de alfiler, las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y se añadió 1 ul/pocillo de sulfato de cobre (concentración final de 700 uM). Las 5 placas se centrifugaron durante 15 s a 1000 RPM y se incubaron durante 20 h a temperatura ambiente. Después de la adición de 1,5 ul de reactivo de detección de luciferasa *Photinus*, las placas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y a continuación se leyeron con un ViewLux (Perkin Elmer) para detectar la luminiscencia. Los datos de concentración-respuesta se ajustaron utilizando un algoritmo indicado (Wang, Y. y col. Current Chemical Genomics, 2010, 57-66). La eficacia se expresa como % de la respuesta máxima del inhibidor de control (Digoxina), 10 establecido en 100 %. La  $CI_{50}$  es la concentración a la que el compuesto presenta una eficacia máxima media.

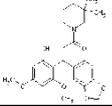
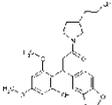
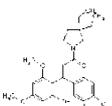
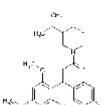
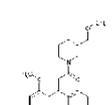
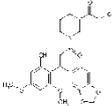
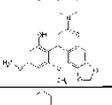
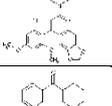
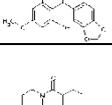
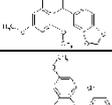
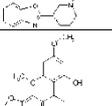
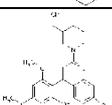
Varios compuestos amido representativos de esta invención se ensayaron o pueden ensayarse para determinar su actividad inhibidora. Los compuestos amido de la invención junto con sus valores de  $CI_{50}$  y de eficacia, conforme se determinaron utilizando procedimientos convencionales para los expertos en la técnica, se enumeran a continuación 15 en la Tabla 1. Para el propósito de la Tabla 1, los valores de  $CI_{50}$  se expresan como se indica a continuación:

- ++++ El compuesto presentaba  $CI_{50} < 1 \mu M$
- +++ El compuesto presentaba  $CI_{50}$  de 1-10  $\mu M$
- ++ El compuesto presentaba  $CI_{50}$  de 11-50  $\mu M$
- 20 + El compuesto presentaba  $CI_{50} > 50 \mu M$

**Tabla 1: Valores de  $CI_{50}$  para compuestos ejemplares y de referencia**

ID de la muestra	Comp. N.º	Estructura	PM (Calc.)	PM (Observ.)	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	Eficacia (%)
NCGC00188324	1*		427,50	428,20	++	-96,67
NCGC00188325	2*		489,57	490,20	+	n/a
NCGC00188327	3		427,50	428,20	+++	-98,75
NCGC00188328	4*		415,45	416,10	++	-20,23
NCGC00188329	5*		413,47	414,20	++	-90,41
NCGC00189101	6		438,48	439,20	++	-65,95
NCGC00189102	7		441,53	442,20	+++	-96,23

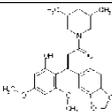
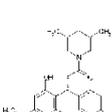
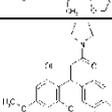
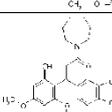
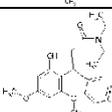
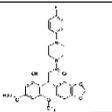
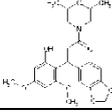
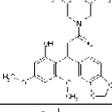
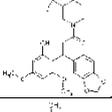
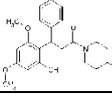
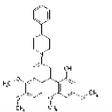
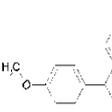
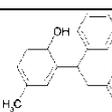
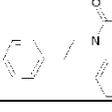
ES 2 703 176 T3

NCGC00189103	8		441,53	442,20	+++	-107,46
NCGC00189104	9*		441,53	442,40	++	-63,49
NCGC00189105	10*		455,56	456,20	++	-89,04
NCGC00189106	11		455,56	456,20	++	-101,75
NCGC00189107	12		457,53	458,20	++	-90,38
NCGC00189108	13		469,54	470,20	+	n/a
NCGC00189109	14		489,57	490,20	++	-70,08
NCGC00189110	15		510,64	511,30	+	n/a
NCGC00189111	16		517,58	518,20	+	n/a
NCGC00189112	17		524,62	525,20	+	n/a
NCGC00189113	18		530,58	531,20	++	-90,58
NCGC00189114	19		537,59	538,20	++	-47,46
NCGC00189173	20		443,50	444,10	++	-44,69

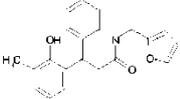
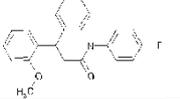
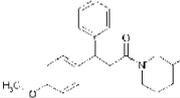
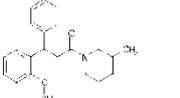
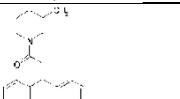
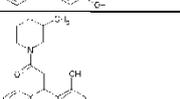
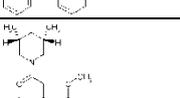
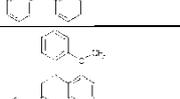
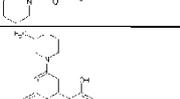
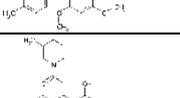
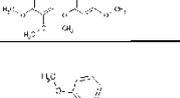
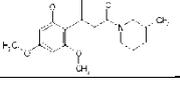
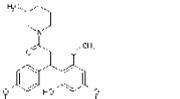
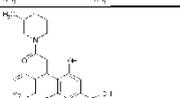
ES 2 703 176 T3

NCGC00189174	21*		435,48	436,10	+	n/a
NCGC00189175	22		441,53	442,20	++++	-97,67
NCGC00189176	23*		441,53	442,20	++	-76,84
NCGC00189177	24*		441,53	442,20	+	n/a
NCGC00189178	25*		401,46	402,20	++	-108,30
NCGC00189179	26*		475,55	476,20	+	n/a
NCGC00189180	27*		461,52	462,20	++	-80,73
NCGC00189209	28*		449,51	450,10	+	n/a
NCGC00189210	29*		435,48	436,10	+	n/a
NCGC00189211	30*		427,50	428,10	++	-91,31
NCGC00189212	31*		471,51	472,10	+	n/a
NCGC00189213	32*		447,49	448,10	+	n/a
NCGC00238400	33*		525,61	526,30	+	n/a
NCGC00238401	34*		449,51	450,30	+	n/a

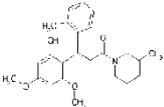
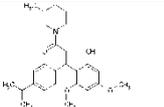
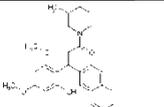
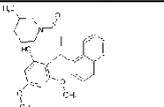
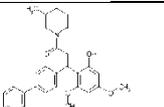
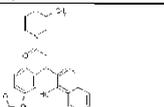
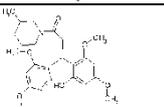
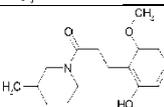
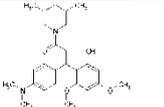
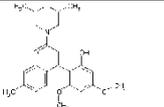
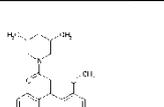
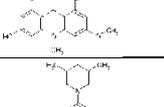
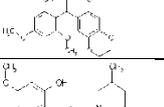
ES 2 703 176 T3

NCGC00238427	35**1		441,53	442,20	++++	-90,97
NCGC00238428	36**1		441,53	442,10	++	-91,02
NCGC00238438	37*		399,45	400,10	++	-27,06
NCGC00238439	38*		427,50	428,20	++	-96,25
NCGC00238440	39*		401,46	402,20	++	-64,87
NCGC00238441	40*		508,55	509,20	+	nulo
NCGC00238447	41		443,50	444,20	++++	-91,47
NCGC00238448	42*		442,52	443,20	+	n/a
NCGC00238449	43		481,47	482,10	+++	-92,48
NCGC00188314	44*		473,62	474,30	+	n/a
NCGC00188319	45*		505,62	506,30	+	n/a
NCGC00189181	46*		349,41	350,10	+	n/a
NCGC00189194	47*		337,47	338,10	+	n/a
NCGC00189195	48*		359,47	360,10	+	n/a

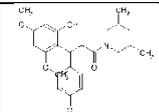
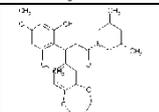
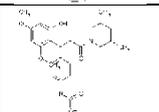
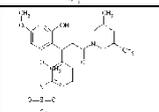
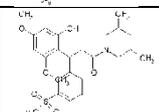
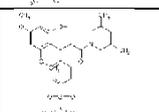
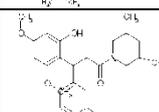
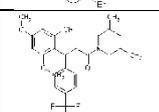
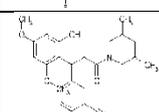
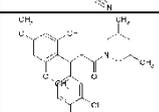
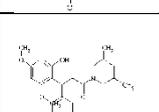
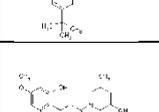
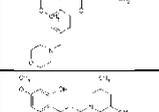
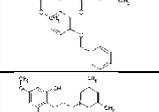
ES 2 703 176 T3

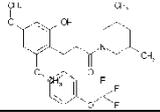
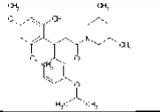
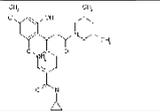
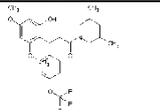
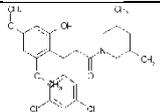
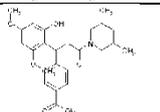
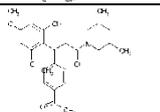
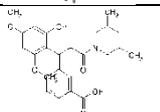
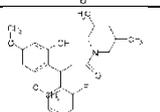
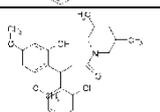
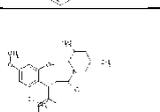
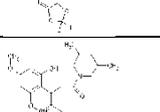
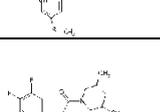
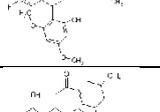
NCGC00189196	49*		335,41	336,10	+	n/a
NCGC00189206	50*		349,41	350,10	+	n/a
NCGC00189207	51*		337,47	338,20	+	n/a
NCGC00189208	52*		337,47	338,20	+	n/a
NCGC00189217	53*		323,44	324,10	+	n/a
NCGC00189218	54*		323,44	324,10	+	n/a
NCGC00238397	55*		351,49	352,30	+	n/a
NCGC00238398	56*		323,44	324,30	+++	-30,48
NCGC00188315	57		397,52	398,20	+++	-96,95
NCGC00188321	58		443,54	444,20	++	-98,17
NCGC00189186	59		413,52	414,20	+	n/a
NCGC00189187	60		413,52	414,20	+++	-91,66
NCGC00189189	61		383,49	384,20	+++	-95,44
NCGC00189190	62		427,55	428,20	+++	-100,12

ES 2 703 176 T3

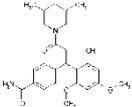
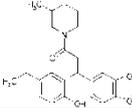
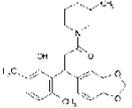
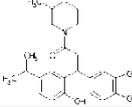
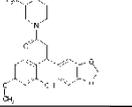
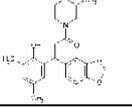
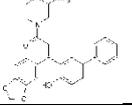
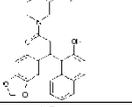
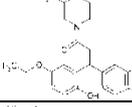
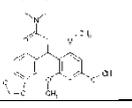
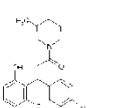
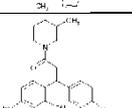
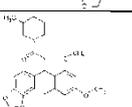
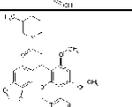
NCGC00189197	63		397,52	398,20	+++	-93,48
NCGC00189198	64		425,57	426,30	+++	-99,32
NCGC00189199	65		433,55	434,30	+++	-92,44
NCGC00189200	66		433,55	434,30	++	-51,96
NCGC00189201	67		459,59	460,30	++	-71,98
NCGC00189203	68*		417,51	418,20	+	nulo
NCGC00189205	69		443,54	444,30	++	-45,58
NCGC00238412	71*		307,39	308,20	+	nulo
NCGC00238415	72		440,59	441,40	+++	-96,81
NCGC00238435	73		411,55	412,20	++++	-93,64
NCGC00238436	74		427,55	428,20	+++	-94,10
NCGC00238437	75		413,52	414,20	+++	-93,76
NCGC00238443	76		455,56	456,20	++++	-95,37
NCGC00242601	77		427,55	428,30	+++	-97,81

ES 2 703 176 T3

NCGC00242602	78		431,96	432,20	+++	-98,04
NCGC00242604	80		469,58	470,30	++++	-93,97
NCGC00242605	81		454,57	455,30	++++	-96,35
NCGC00242607	82		490,62	491,20	++++	-95,39
NCGC00242608	83		475,61	476,20	+++	-93,79
NCGC00242609	84		504,65	505,20	++	-102,71
NCGC00242610	85		476,42	478,10	+++	-103,27
NCGC00242611	86		465,52	466,20	++++	-92,28
NCGC00242612	87		422,53	423,20	++++	-96,62
NCGC00242613	88		466,41	466,10	+++	-97,24
NCGC00242614	89		453,63	454,30	+++	-95,41
NCGC00242615	90		496,65	497,30	+++	-99,10
NCGC00242616	91		503,64	504,20	+++	-92,60
NCGC00242617	92		503,64	504,20	+++	-94,56

NCGC00242618	93		481,52	482,20	+++	-93,26
NCGC00242619	94		455,60	456,20	+++	-90,55
NCGC00242620	95		480,61	481,20	+++	-93,06
NCGC00242621	96		481,52	482,20	+++	-94,77
NCGC00242622	97		466,41	466,10	++	-61,47
NCGC00242624	99		441,53	442,20	+++	-92,59
NCGC00242625	100		439,56	440,20	++++	-93,60
NCGC00242626	101		441,53	442,20	+++	-88,72
NCGC00242627	102		415,51	416,20	+++	-99,94
NCGC00242628	103		431,96	432,20	+++	-95,80
NCGC00242629	104		477,51	478,20	+++	-97,26
NCGC00242630	105		443,61	444,20	++++	-94,73
NCGC00242635	109		451,49	452,20	+++	-97,27
NCGC00242617	110		503,64	504,30	+++	-94,56

ES 2 703 176 T3

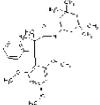
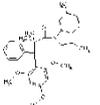
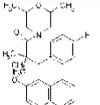
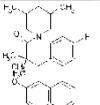
NCGC00242606	111		440,54	441,20	+++	-96,74
NCGC00189182	112*		395,50	396,20	++	-106,12
NCGC00189183	113		395,50	395,20	++	-81,47
NCGC00189184	114*		409,53	410,20	++	-87,26
NCGC00189188	115*		397,48	398,20	++	-91,54
NCGC00189191	116*		395,50	396,20	++	-48,18
NCGC00189192	117*		443,55	444,20	+++	-94,40
NCGC00189193	118*		417,51	418,20	+++	-94,94
NCGC00189202	119*		411,50	412,20	++	-94,28
NCGC00189204	120		441,53	442,40	+++	-92,99
NCGC00189214	121		397,48	398,20	+++	-97,51
NCGC00189215	122*		383,45	384,20	+	n/a
NCGC00238395	123		465,55	466,30	+++	-98,01
NCGC00238399	124		517,63	518,30	+++	-94,09

ES 2 703 176 T3

NCGC00238402	125*		381,48	382,30	++	-51,65
NCGC00238403	126		381,48	382,30	++	-43,47
NCGC00238404	127		401,89	402,20	++	-27,07
NCGC00238405	128		447,54	448,30	++	-80,02
NCGC00238406	129*		447,54	448,30	++	-76,87
NCGC00238407	130		411,50	412,30	++	-77,49
NCGC00238408	131*		493,35	494,20	++	-33,22
NCGC00238409	132*		385,44	386,30	+++	-30,37
NCGC00238410	133*		438,53	453,30	+++	-103,21
NCGC00238442	134		455,56	456,20	+++	-96,39
NCGC00238444	135		485,58	486,30	+++	-96,55
NCGC00238445	136		480,57	481,20	+++	-90,05
NCGC00238446	137		498,58	499,30	++	-98,51

ES 2 703 176 T3

NCGC00238450	138*		431,54	432,20	+++	-94,57
NCGC00242631	139		451,52	452,20	++++	-94,52
NCGC00242636	140		411,50	412,10	++++	-96,47
NCGC00242637	141*		432,53	433,20	++	-105,50
NCGC00242639	143*		399,47	400,10	++	-86,36
NCGC00242640	144*		399,47	400,10	++	-97,33
NCGC00242641	145*		399,47	400,10	+++	-79,73
NCGC00242642	146*		432,52	433,10	+++	-94,07
NCGC00242648	147*		403,48	404,20	++	-88,07
NCGC00238416	149		439,60	440,30	+++	-93,79
NCGC00242649	150		441,57	442,20	+++	-91,61
NCGC00242650	151*		477,65	478,20	+	-118,13
NCGC00242652	152*		423,56	424,20	++	-50,66
NCGC00242653	153*		423,56	424,20	+++	-36,52

NCGC00242654	154*		481,68	482,30	+	n/a
NCGC00242655	155*		481,68	482,20	+	n/a
NCGC00242656	156*		449,57	450,20	++	-99,89
NCGC00242657	157*		447,60	448,20	+++	-94,44
*representa un Compuesto de Referencia						
**1La estereoquímica no está confirmada.						

**Ensayo de Th17**

Efectos de derivados de compuestos a diversas concentraciones sobre la polarización de Th17 de ratón. El porcentaje de células productoras de IL-17a tratadas con DMSO se estableció en 100. Los linfocitos T CD4 de ratón (CD25<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, y CD44<sup>int-high</sup>) se clasificaron y se cultivaron con anticuerpos estimuladores CD3/CD28 en presencia de TGFβ (0,1 ng/ml) e IL6 (20 ng/ml). Los compuestos se añadieron el Día 1 y las células se analizaron el Día 4. Para la tinción de citocinas intracelulares, las células se incubaron durante 5 h con forbol éster (50 ng/ml; Sigma), ionomicina (500 ng/ml; Sigma) y GolgiStop (BD). Cuando fue necesario, las superficies se tiñeron mediante incubación durante 15 minutos en hielo con CD4 conjugado con PECy7 (BD Biosciences). El conjunto de tampón Cytotfix/Cytoperm (BD) se usó para la tinción intracelular. Las células se fijaron y se hicieron permeables durante 30 minutos en hielo y se tiñeron durante 30 minutos en hielo en tampón de permeabilización con anti-IL17 conjugado con Alexa647 (eBioscience) y anti-IFNγ conjugado con PE (eBioscience). Se utilizaron un software LSR II (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star) para la citometría de flujo. El valor de CI<sub>50</sub> de RORγ adquirido a partir del ensayo indicador de células S2 se incluye para fines comparativos.

Varios compuestos amido representativos de esta invención se ensayaron o pueden ensayarse para determinar su actividad inhibidora de Th17. Los compuestos amido ejemplares de la invención junto con sus valores de CI<sub>50</sub> de Th17 y S2 RORγ, conforme se determinaron usando procedimientos convencionales para los expertos en la técnica, se enumeran a continuación en la Tabla 2. Para el propósito de la Tabla 2, los valores de CI<sub>50</sub> se expresan como se indica a continuación:

- ++++ El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de TH17 <1 μM
- +++ El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de TH17 de 1-10 μM
- 25 ++ El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de TH17 de 11-20 μM
- + El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de TH17 >20 μM
- \*\*\*\* El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de RORγ <1 μM
- \*\*\* El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de RORγ de 1-10 μM
- \*\* El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de RORγ de 11-20 μM
- 30 \* El compuesto presentó una CI<sub>50</sub> de RORγ de >20 μM

**Tabla 2: Valores de CI<sub>50</sub> de las células Th17 y RORγ S2 para los compuestos ejemplares y de referencia**

ID	Comp. ID	CI <sub>50</sub> de Th17 μM	CI <sub>50</sub> de RORγ de células S2 μM
NCGC00188324	1*	+	**
NCGC00189103	8	+++	***
NCGC00189175	22	++++	****
NCGC00238427	35	++++	****
NCGC00238447	41	++++	****
NCGC00238448	42*	+	*
NCGC00238449	43	+++	***

NCGC00238397	55*		*
NCGC00188315	57	+++	***
NCGC00189186	59		*
NCGC00189187	60	+++	***
NCGC00189189	61	+	***
NCGC00189197	63	+	***
NCGC00189198	64		***
NCGC00189199	65		***
NCGC00189200	66		**
NCGC00189201	67		**
NCGC00189205	69	+	*
NCGC00238415	72	++++	***
NCGC00238435	73	++++	****
NCGC00238436	74	++++	***
NCGC00238437	75	++++	***
NCGC00238443	76	++++	***
NCGC00189188	115*	+	*
NCGC00189192	117*		***
NCGC00189193	118*		***
NCGC00189202	119*		**
NCGC00189204	120	+++	***
NCGC00189214	121	+	***
NCGC00238399	124		***
NCGC00238442	134	++++	***
NCGC00238444	135	+++	***
NCGC00238445	136	+++	***
NCGC00238446	137	+	**
NCGC00238450	138*	+++	***
NCGC00238416	149		***
* representa un Compuesto de Referencia			

Las estructuras químicas de tres compuestos relacionados que se identificaron como agonistas inversos de ROR $\gamma$ /ROR $\gamma$ t que utilizan el cribado químico indicador ROR $\gamma$  de células S2 se muestran en la Figura 1.

- 5 La Figura 3 muestra un análisis gráfico de FACS que demuestra que los compuestos inhibidores de ROR $\gamma$  NCGC00166547 y NCGC00166488 (20  $\mu$ M) suprimen la diferenciación de células Th17 de ratón, de acuerdo con se mide por la producción de IL17a, cuando se compara con células tratadas con DMSO. Los linfocitos T CD4 (CD25<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, y CD44<sup>int-high</sup>) se clasificaron y se cultivaron con anticuerpos estimuladores CD3/CD28 en presencia de TGF $\beta$  (0,1 ng/ml) e IL6 (20 ng/ml). Los compuestos se añadieron el Día 1 y las células se analizaron el Día 4. Para la tinción de citocinas intracelulares, las células se incubaron durante 5 h con forbol éster (50 ng/ml; Sigma), ionomicina (500 ng/ml; Sigma) y GolgiStop (BD). Cuando fue necesario, las superficies se tiñeron mediante incubación durante 15 minutos en hielo con CD4 conjugado con PECy7 (BD Biosciences). Se usaron el conjunto de tampón Cytotfix/Cytoperm (BD) o el kit de tinción FoxP3 (eBioscience) para la tinción intracelular. Las células se fijaron y se hicieron permeables durante 30 minutos en hielo y se tiñeron durante 30 minutos en hielo en tampón de permeabilización con anti-IL17 conjugado con Alexa647 (eBioscience), anti-IFN $\gamma$  conjugado con PE (eBioscience) y/o anti-FoxP3 conjugado con PE (eBioscience). Se utilizaron un software LSR II (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star) para la citometría de flujo.

- La Figura 4 muestra un análisis gráfico de FACS que demuestra que el tratamiento con NCGC00166547 20  $\mu$ M no inhibe la diferenciación de Th1, de acuerdo con se mide por la producción de IFN $\gamma$ , de linfocitos T CD4 sin tratar. Estos resultados sugieren que NCGC00166547 no inhibe la proliferación general de linfocitos T o la producción de citocinas. Para la diferenciación de Th1, se añadieron IL12 (10 ng/ml) e IL2 (10U) a cultivos de linfocitos T CD4 sin tratar en lugar de TGF $\beta$  e IL6.

- Como se muestra en la Figura 5, los compuestos 166547 y 166488 inhiben la producción de IL17a dependiente de la sobreexpresión de ROR $\gamma$ , pero no dependiente de ROR $\alpha$ , en linfocitos T CD4 humanos. Estos hallazgos demuestran su especificidad para la inhibición de la actividad de ROR $\gamma$ . Brevemente, se aislaron linfocitos T humanos sin tratar CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> de sangre periférica derivada de donantes sanos. Los linfocitos T sin tratar se cultivaron en medio XIVO durante 7 días en presencia de los anticuerpos IL2 y estimuladores CD3 y CD28. Las células se

infectaron con lentivirus que codifican ROR $\alpha$  o ROR $\gamma$  humanos y se añadieron compuestos o DMSO el día 2. El análisis gráfico de FACS se muestra después de la selección de células que expresan GFP (infectadas por virus).

La figura 6 muestra gráficos de FAC que revelan que el Compuesto NCGC00238427 inhibe selectivamente la polarización de Th17 inducida por ROR $\gamma$ t humano. Véase la Figura 6A. Los resultados representan la citometría de flujo de la producción de IL-17a e IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD4<sup>+</sup>T sin tratar de de sangre de cordón umbilical (CD45RO<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) transducidos con RORad-IRES-GFP humano o ROR $\gamma$ t-IRES-GFP humano el día 1 y analizados el día 6. Las células que expresaban GFP se clasificaron para el análisis. Se añadió DMSO o NCGC00238427 (3  $\mu$ M) 6-8 h después de la transducción viral. Como se muestra en la Figura 6B, el Compuesto NCGC00238427 inhibe la diferenciación de células Th17 humanas a un nivel de tan solo 1  $\mu$ M. Los resultados representan la citometría de flujo de la producción de IL-17a e IFN- $\gamma$  por linfocitos T sin tratar de sangre de cordón umbilical humanos (CD45RO<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>), que se cultivaron durante seis días en presencia de IL2, IL23 e IL1 $\beta$ , y con diversas concentraciones de TGF $\beta$  (ng/ml). Se añadieron DMSO o NCGC00238427 16 horas después de la adición de citocinas. Se usaron IL-17a-APC (eBio64CAP17 eBioscience) e IFN- $\gamma$ -PECy7 (45.B3 eBioscience) para el análisis.

La Figura 7 muestra que NCGC00238427 inhibe la expresión de células de memoria de células Th17 humanas de IL-17a y, por lo tanto, es importante para el mantenimiento de células Th17 humanas. Las células de memoria humanas (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>) se purificaron a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos y se cultivaron en presencia de IL-1 $\beta$ , IL-23 e IL-2 durante 6 días con o sin NCGC00238427 (3  $\mu$ M). Tinción intracelular para IFN- $\gamma$  o IL-17a en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria, evaluada el día 6. Cada símbolo (n = 11 o 9, respectivamente) indica un donante separado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student no pareada de dos colas; IL-17a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, no significativo e IL-17a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, p = 0,02.

Los ensayos de competición *in vitro* han demostrado, además, que los compuestos descritos en el presente documento, tales como NCGC00166547, se unen directamente a ROR $\gamma$ t humano. Para demostrar esta propiedad de unión, el LBD de ROR $\gamma$  humano recombinante se cargó con 25-hidroxicolesterol marcado con fluorescencia en presencia de diversas concentraciones de NCGC00166547, y se midió la polarización de la fluorescencia. La presencia de concentraciones crecientes de NCGC00166547 se correlacionó con el desplazamiento del 25-hidroxicolesterol marcado con fluorescencia del LBD.

Los nombres químicos de los compuestos de la invención dados en esta solicitud se generan utilizando la herramienta de nomenclatura Lexichem de Open Eye Software, Reaction Planner de Symyx Renaissance Software o la herramienta ISIS Draw Autonom Software de MDL y no se han verificado. Preferiblemente, en caso de inconsistencia, tiene prioridad la estructura representada.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Littman, Dan  
 40 Huh, Jun R.  
 Huang, Ruili  
 Huang, Wenwei  
 Englund, Erika Elaine  
 <120> Compuestos amido como moduladores de ROR $\gamma$  y usos de los mismos  
 45 <130> 1049-1-135PCT  
 <140> Sin asignar  
 <141> 11/03/2011  
 <150>61/339.974  
 <151> 11/03/2010  
 50 <160> 8  
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0  
 <210> 1  
 <211> 1695  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ADN que codifica la proteína de fusión GAL4/ROR $\gamma$   
 <400> 1  
 60

ES 2 703 176 T3

```

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120
tctccaaaa ccaaaaggtc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg 180
ctagaaagac tggaaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt 240
ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat 300
aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta 360
acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaaggt 420
caaagacagt tgactgtatc ggctgtcaag tttggccgaa tgtccaagaa gcagagggac 480
agtctacatg cagaagtgca gaaacaactg caacagcagc agcaacagga acaagtggcc 540
aagactcctc cagctgggag ccgcgagca gacacactta catacacttt agggctctca 600
gatgggcagc taccactggg cgcctcacct gacctaccg aggcctctgc ttgtccccct 660
ggcctcctga gagcctcagg ctctggccca ccatattcca ataccttggc caaaacagag 720
gtccaggggg cctcctgcca ccttgagtat agtccagaac gaggcaaagc tgaaggcaga 780
gacagcatct atagcactga cggccaactt actcctggaa gatgtggact tcgttttgag 840
gaaaccaggc atcctgaact tgggaacca gaacagggtc cagacagcca ctgcattccc 900
agtttctgca gtgccccaga ggtaccatat gcctctctga cagacataga gtacctggt 960
cagaatgtct gcaagtctt cagagagaca tgccagctgc gactggagga ccttctacgg 1020
cagcgacca acctctttc acgggaggag gtgaccagct accagaggaa gtcaatgtgg 1080
gagatgtggg agcgtgtgct ccaccacctc actgaggcca ttcagtatgt ggtggagttt 1140
gccaagcggc tttcaggctt catggagctc tgccagaatg accagatcat actactgaaa 1200
gcaggagcaa tggaaagtcgt cctagtcaga atgtgcaggg cctacaatgc caacaaccac 1260
acagtctttt ttgaaggcaa atacggtggt gtggagctgt ttcgagcctt gggctgcagc 1320
gagctcatca gctccatatt tgacttttcc cacttctca gcgcctgtg ttttctgag 1380
gatgagattg cctctacac gcccttggtt ctcatcaatg ccaaccgtcc tgggctccaa 1440
gagaagagga gagtgaaca tctgcaatac aatttggaac tggctttcca tcatcatctc 1500
tgcaagactc atcgacaagg cctcctagcc aagctgccac ccaaaggaaa actccggagc 1560
ctgtgcagcc aacatgtgga aaagctgcag atcttcagc acctccacc catcgtggtc 1620
caagccgcct tcctccact ctataaggaa ctcttcagca ctgatgttga atcccctgag 1680
ggctgtcaa agtga

```

<210> 2

<211> 564

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión GAL4/RORgamma

10 <400> 2

ES 2 703 176 T3

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu  
1 5 10 15  
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu  
20 25 30  
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro  
35 40 45  
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu  
50 55 60  
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile  
65 70 75 80  
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu  
85 90 95  
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala  
100 105 110  
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser  
115 120 125  
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu  
130 135 140  
Thr Val Ser Ala Val Lys Phe Gly Arg Met Ser Lys Lys Gln Arg Asp  
145 150 155 160  
Ser Leu His Ala Glu Val Gln Lys Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln  
165 170 175  
Glu Gln Val Ala Lys Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Gly Ala Asp Thr  
180 185 190  
Leu Thr Tyr Thr Leu Gly Leu Ser Asp Gly Gln Leu Pro Leu Gly Ala  
195 200 205  
Ser Pro Asp Leu Pro Glu Ala Ser Ala Cys Pro Pro Gly Leu Leu Arg  
210 215 220  
Ala Ser Gly Ser Gly Pro Pro Tyr Ser Asn Thr Leu Ala Lys Thr Glu  
225 230 235 240  
Val Gln Gly Ala Ser Cys His Leu Glu Tyr Ser Pro Glu Arg Gly Lys  
245 250 255  
Ala Glu Gly Arg Asp Ser Ile Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Leu Thr Leu  
260 265 270  
Gly Arg Cys Gly Leu Arg Phe Glu Thr Arg His Pro Glu Leu Gly  
275 280 285  
Glu Pro Glu Gln Gly Pro Asp Ser His Cys Ile Pro Ser Phe Cys Ser  
290 295 300  
Ala Pro Glu Val Pro Tyr Ala Ser Leu Thr Asp Ile Glu Tyr Leu Val  
305 310 315 320  
Gln Asn Val Cys Lys Ser Phe Arg Glu Thr Cys Gln Leu Arg Leu Glu  
325 330 335  
Asp Leu Leu Arg Gln Arg Thr Asn Leu Phe Ser Arg Glu Glu Val Thr  
340 345 350  
Ser Tyr Gln Arg Lys Ser Met Trp Glu Met Trp Glu Arg Cys Ala His  
355 360 365  
His Leu Thr Glu Ala Ile Gln Tyr Val Val Glu Phe Ala Lys Arg Leu  
370 375 380  
Ser Gly Phe Met Glu Leu Cys Gln Asn Asp Gln Ile Ile Leu Leu Lys  
385 390 395 400  
Ala Gly Ala Met Glu Val Val Leu Val Arg Met Cys Arg Ala Tyr Asn  
405 410 415  
Ala Asn Asn His Thr Val Phe Phe Glu Gly Lys Tyr Gly Gly Val Glu  
420 425 430

ES 2 703 176 T3

Leu Phe Arg Ala Leu Gly Cys Ser Glu Leu Ile Ser Ser Ile Phe Asp  
 435 440 445  
 Phe Ser His Phe Leu Ser Ala Leu Cys Phe Ser Glu Asp Glu Ile Ala  
 450 455 460  
 Leu Tyr Thr Ala Leu Val Leu Ile Asn Ala Asn Arg Pro Gly Leu Gln  
 465 470 475 480  
 Glu Lys Arg Arg Val Glu His Leu Gln Tyr Asn Leu Glu Leu Ala Phe  
 485 490 495  
 His His His Leu Cys Lys Thr His Arg Gln Gly Leu Leu Ala Lys Leu  
 500 505 510  
 Pro Pro Lys Gly Lys Leu Arg Ser Leu Cys Ser Gln His Val Glu Lys  
 515 520 525  
 Leu Gln Ile Phe Gln His Leu His Pro Ile Val Val Gln Ala Ala Phe  
 530 535 540  
 Pro Pro Leu Tyr Lys Glu Leu Phe Ser Thr Asp Val Glu Ser Pro Glu  
 545 550 555 560  
 Gly Leu Ser Lys

- <210> 3
- <211> 1590
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ADN que codifica la proteína de fusión GAL4/RORalfa

10 <400> 3

```

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120
tctccaaaa 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 taacaaaggt 420
caaagacagt tgactgtatc ggctgtcaag tttggtcgga tgtccaagaa gcagagagac 480
agcttgtagc cggaggtgca gaagcaccgg atgcagcagc agcagcgaga ccaccagcag 540
cagcctgggg aggcggagcc gctgaogccc acctacaaca tctcagccaa tgggctgacg 600
gaactgcatg atgacctcag cacctatatg gatgggcaca cccccgaggg cagcaaggcc 660
gactcagccg tcagcagctt ctacctggac atccagccct ccccagacca gtcgggattg 720
gacatcaatg ggatcaaacc cgaaccata tgtgactaca caccagcatc tggcttcttc 780
ccctactggt ccttcaccaa cggagagact tccccaacg tgtccatggc agaactagaa 840
caccttgccc agaacatatc caaatccac ctggaaacct gccagtactt gcgggaagag 900
ctccagcaga taactgtgca gaccttctg caggaggaga ttgaaaacta ccagaacaag 960
cagagagagg tgatgtggca gctgtgtgcc atcaagatta cagaagctat ccagtatgtg 1020
gtggagtttg ccaaacgcat tgatggattt atggagctgt gtcaaaatga tcaaatgtg 1080
cttctaaaag caggctcgtt agaggtggtg tttattagga tgtgccgtgc ctttgactct 1140
cagaacaaca ccgtgtactt tgacgggaag tatgcgagcc ccgatgtctt caagtcccta 1200
ggttgtgaag acttcatcag ctttgtgttt gaatttggga agagtttgtg ttctatgcac 1260
ctgaccgaag acgaaatcgc gttatcttct gcattcgtac tgatgtcagc ggatcgctcg 1320
tggcttcagg aaaaggtaaa aatagaaaag ctgcaacaga aaattcagct ggcccttcag 1380
cacgtcctac agaagaacca ccgagaagat ggaattctaa ccaagctaat atgcaaggtg 1440
tctacgtaa gagccctatg tggacgacat acggaaaagc taatggcatt taaagcaata 1500
taccagaca ttgtgcgact ccattttcct ccattataca aggaattgtt cacttcagaa 1560
tttgagccag ccatgcaaat cgatgggtaa 1590
    
```

- <210> 4
- 15 <211> 529
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión GAL4/RORalfa
- 20
- <400> 4

ES 2 703 176 T3

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu  
1 5 10 15  
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu  
20 25 30  
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro  
35 40 45  
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu  
50 55 60  
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile  
65 70 75 80  
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu  
85 90 95  
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala  
100 105 110  
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser  
115 120 125  
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu  
130 135 140  
Thr Val Ser Ala Val Lys Phe Gly Arg Met Ser Lys Lys Gln Arg Asp  
145 150 155 160  
Ser Leu Tyr Ala Glu Val Gln Lys His Arg Met Gln Gln Gln Gln Arg  
165 170 175  
Asp His Gln Gln Gln Pro Gly Glu Ala Glu Pro Leu Thr Pro Thr Tyr  
180 185 190  
Asn Ile Ser Ala Asn Gly Leu Thr Glu Leu His Asp Asp Leu Ser Thr  
195 200 205  
Tyr Met Asp Gly His Thr Pro Glu Gly Ser Lys Ala Asp Ser Ala Val  
210 215 220  
Ser Ser Phe Tyr Leu Asp Ile Gln Pro Ser Pro Asp Gln Ser Gly Leu  
225 230 235 240  
Asp Ile Asn Gly Ile Lys Pro Glu Pro Ile Cys Asp Tyr Thr Pro Ala  
245 250 255  
Ser Gly Phe Phe Pro Tyr Cys Ser Phe Thr Asn Gly Glu Thr Ser Pro  
260 265 270  
Thr Val Ser Met Ala Glu Leu Glu His Leu Ala Gln Asn Ile Ser Lys  
275 280 285  
Ser His Leu Glu Thr Cys Gln Tyr Leu Arg Glu Glu Leu Gln Gln Ile  
290 295 300  
Thr Trp Gln Thr Phe Leu Gln Glu Glu Ile Glu Asn Tyr Gln Asn Lys  
305 310 315 320  
Gln Arg Glu Val Met Trp Gln Leu Cys Ala Ile Lys Ile Thr Glu Ala  
325 330 335  
Ile Gln Tyr Val Val Glu Phe Ala Lys Arg Ile Asp Gly Phe Met Glu  
340 345 350  
Leu Cys Gln Asn Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ala Gly Ser Leu Glu  
355 360 365  
Val Val Phe Ile Arg Met Cys Arg Ala Phe Asp Ser Gln Asn Asn Thr  
370 375 380  
Val Tyr Phe Asp Gly Lys Tyr Ala Ser Pro Asp Val Phe Lys Ser Leu  
385 390 395 400  
Gly Cys Glu Asp Phe Ile Ser Phe Val Phe Glu Phe Gly Lys Ser Leu  
405 410 415  
Cys Ser Met His Leu Thr Glu Asp Glu Ile Ala Leu Phe Ser Ala Phe  
420 425 430  
Val Leu Met Ser Ala Asp Arg Ser Trp Leu Gln Glu Lys Val Lys Ile  
435 440 445  
Glu Lys Leu Gln Gln Lys Ile Gln Leu Ala Leu Gln His Val Leu Gln  
450 455 460  
Lys Asn His Arg Glu Asp Gly Ile Leu Thr Lys Leu Ile Cys Lys Val  
465 470 475 480

ES 2 703 176 T3

Ser Thr Leu Arg Ala Leu Cys Gly Arg His Thr Glu Lys Leu Met Ala  
 485 490 495  
 Phe Lys Ala Ile Tyr Pro Asp Ile Val Arg Leu His Phe Pro Pro Leu  
 500 505 510  
 Tyr Lys Glu Leu Phe Thr Ser Glu Phe Glu Pro Ala Met Gln Ile Asp  
 515 520 525  
 Gly

- <210> 5
- <211> 1542
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ADN que codifica la proteína de fusión GAL4/DHR3

10 <400> 5

```

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120
tctcccaaaa ccaaaaggct tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg 180
ctagaaagac tggaaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt 240
ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat 300
aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta 360
acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaaggt 420
caaagacagt tgactgtatc ggctgtaaag ttccggcagga tgtccaagaa gcagcgcgag 480
aaggtcgagg acgaggtacg cttccatcgg gccagatgc gggcacaag cgacgcggca 540
cgggatagct ccgtatacga cacacagacg ccctcgagca gcgaccagct gcatcacaac 600
aattacaaca gggcgggcta ctccaacaac gaggtgggct acggcagtc ctacggatac 660
tcggcctccg tgaccccaca gcagaccatg cagtacgaca tctcggcgga ctacgtggac 720
agcaccacct acgagcccg cagtacaata atcgatcccg aatttattag tcacgcggat 780
ggcgatataa acgatgtgct gatcaagacg ctggcgagg cgcatgcaa cacaaatacc 840
aaactggaag ctgtgcacga catgttccga aagcagccgg atgtgtcac cattctctac 900
tacaagaatc tgggccaaga ggaactctgg ctggactcgc ctgagaagct tacacaaatg 960
atacagaaca taatcgaatt tgctaagctc ataccgggat tcatgcgcct gactcaggac 1020
gatcagatat tactgtgaa gacgggctcc tttgagctgg cgattgttcg catgtccaga 1080
ctgcttgatc tctcacagaa cggggttctc tacggcgacg tgatgctgcc ccaggaggcg 1140
ttctacacat ccgactcgga agagatgcgt ctgggtgtcg gcattctcca aacggccaag 1200
tcgatagccg aactcaaact gactgaaacc gaactggcgc tgtatcagag cttagtgtcg 1260
ctctggccag aacgcaatgg agtgcgtggt aatacggaaa tacagaggct tttcaatctg 1320
agcatgaatg cgatccggca ggagctggaa acgaatcatg cgccgctcaa gggcgatgct 1380
accgtgctgg acacactgct gaacaatata cccaatttcc gcgatatttc catcttgac 1440
atggaatcgc tgagcaagtt caagctgcag caccgcaatg tcgtttttcc ggcgctgtac 1500
aaggagctgt tctcgataga ttcgcagcag gacctgacat aa 1542
    
```

- <210> 6
- 15 <211> 513
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína de fusión GAL4/DHR3

20

<400> 6

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu  
 20 25 30  
 Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro  
 35 40 45  
 Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu  
 50 55 60

ES 2 703 176 T3

Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile  
65 70 75 80  
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu  
85 90 95  
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala  
100 105 110  
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser  
115 120 125  
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu  
130 135 140  
Thr Val Ser Ala Val Lys Phe Gly Arg Met Ser Lys Lys Gln Arg Glu  
145 150 155 160  
Lys Val Glu Asp Glu Val Arg Phe His Arg Ala Gln Met Arg Ala Gln  
165 170 175  
Ser Asp Ala Ala Pro Asp Ser Ser Val Tyr Asp Thr Gln Thr Pro Ser  
180 185 190  
Ser Ser Asp Gln Leu His His Asn Asn Tyr Asn Ser Gly Tyr Ser  
195 200 205  
Asn Asn Glu Val Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Gly Tyr Ser Ala Ser Val  
210 215 220  
Thr Pro Gln Gln Thr Met Gln Tyr Asp Ile Ser Ala Asp Tyr Val Asp  
225 230 235 240  
Ser Thr Thr Tyr Glu Pro Arg Ser Thr Ile Ile Asp Pro Glu Phe Ile  
245 250 255  
Ser His Ala Asp Gly Asp Ile Asn Asp Val Leu Ile Lys Thr Leu Ala  
260 265 270  
Glu Ala His Ala Asn Thr Asn Thr Lys Leu Glu Ala Val His Asp Met  
275 280 285  
Phe Arg Lys Gln Pro Asp Val Ser Arg Ile Leu Tyr Tyr Lys Asn Leu  
290 295 300  
Gly Gln Glu Glu Leu Trp Leu Asp Cys Ala Glu Lys Leu Thr Gln Met  
305 310 315 320  
Ile Gln Asn Ile Ile Glu Phe Ala Lys Leu Ile Pro Gly Phe Met Arg  
325 330 335  
Leu Ser Gln Asp Asp Gln Ile Leu Leu Lys Thr Gly Ser Phe Glu  
340 345 350  
Leu Ala Ile Val Arg Met Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ser Gln Asn Ala  
355 360 365  
Val Leu Tyr Gly Asp Val Met Leu Pro Gln Glu Ala Phe Tyr Thr Ser  
370 375 380  
Asp Ser Glu Glu Met Arg Leu Val Ser Arg Ile Phe Gln Thr Ala Lys  
385 390 395 400  
Ser Ile Ala Glu Leu Lys Leu Thr Glu Thr Glu Leu Ala Leu Tyr Gln  
405 410 415  
Ser Leu Val Leu Leu Trp Pro Glu Arg Asn Gly Val Arg Gly Asn Thr  
420 425 430  
Glu Ile Gln Arg Leu Phe Asn Leu Ser Met Asn Ala Ile Arg Gln Glu  
435 440 445  
Leu Glu Thr Asn His Ala Pro Leu Lys Gly Asp Val Thr Val Leu Asp  
450 455 460  
Thr Leu Leu Asn Asn Ile Pro Asn Phe Arg Asp Ile Ser Ile Leu His  
465 470 475 480  
Met Glu Ser Leu Ser Lys Phe Lys Leu Gln His Pro Asn Val Val Phe  
485 490 495  
Pro Ala Leu Tyr Lys Glu Leu Phe Ser Ile Asp Ser Gln Gln Asp Leu  
500 505 510  
Thr

<210> 7

<211> 696

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica la proteína de fusión GAL4/VP16

ES 2 703 176 T3

<400> 7

```

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120
tctcccaaaa ccaaagggtc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg 180
ctagaagac  tggaacagct atttctactg attttcctc gagaagacct tgacatgatt 240
ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat 300
aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta 360
acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaaggt 420
caaagacagt tgactgtatc gggaattccc ggggatctgg cccccccgac cgatgtcagc 480
ctgggggacg agctccactt agacggcgag gacgtggcga tggcgcatgc cgacgcgcta 540
gacgatttcg atctggacat gttgggggac ggggattccc cggggccggg atttaccccc 600
cacgactccg cccctacgg  cgctctggat acggccgact tcgagtttga gcagatgttt 660
accgatgccc ttggaattga cgagtacggt gggtag 696
    
```

5 <210> 8

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión GAL4/VP16

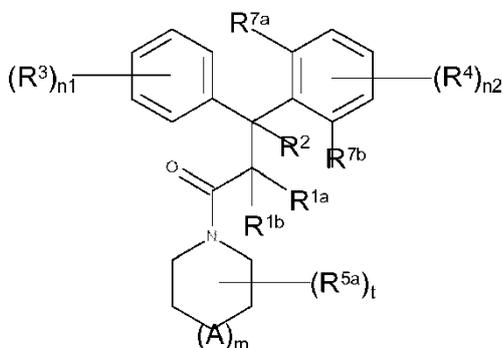
<400> 8

```

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

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula III:



5

III

donde

A es CH<sub>2</sub>, u O; m es 1;

10 n<sub>1</sub> es 1, 2, 3, 4 o 5; n<sub>2</sub> es 1, 2, o 3;

cada R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o sin sustituir o CN;

o R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> unidos entre sí forman un anillo de cicloalquilo;

R<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o sin sustituir, o arilo;

15 o uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> está unido al C de CR<sup>2</sup> para formar un anillo de ciclopropilo; o R<sup>2</sup> está unido al C de CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup> para formar un anillo de ciclopropilo;

20 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se selecciona independientemente de H, OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, acilo sustituido o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio sustituido o sin sustituir, alcoxycarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir, arialquilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinito sustituido, sulfanilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, dialquilamino sustituido o sin sustituir, halo, nitro, y tío; o dos cualesquiera grupos R<sup>3</sup> adyacentes, o dos cualquiera grupos R<sup>4</sup> adyacentes pueden unirse para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico sustituido o sin sustituir;

25 cada R<sup>5a</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, halo, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, CN, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), amido, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido; y t es 0, 1, 2, o 3;

30 cada uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> es independientemente OH, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi sustituido o sin sustituir, acilo sustituido o sin sustituir, acilamino sustituido o sin sustituir, alquilamino sustituido o sin sustituir, alquiltio sustituido o sin sustituir, alcoxycarbonilo sustituido o sin sustituir, alquilarilamino sustituido o sin sustituir, amino sustituido o sin sustituir, arialquilo sustituido o sin sustituir, sulfo, sulfo sustituido, sulfonilo sustituido, sulfinito sustituido, sulfanilo sustituido, aminosulfonilo sustituido o sin sustituir, alquilsulfonilo sustituido o sin sustituir, arilsulfonilo sustituido o sin sustituir, azido, carbamoilo sustituido o sin sustituir, carboxilo, ciano, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, dialquilamino sustituido o sin sustituir, halo, nitro, y tío;

35 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y estereoisómeros, variantes isotópicas y tautómeros del mismo; con la condición de que

40 i) cuando t sea 1, A sea CH<sub>2</sub> cada uno de R<sup>1a</sup>, R<sup>1b</sup> y R<sup>2</sup> sea H, R<sup>4</sup> sea 4-OMe, y uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> sea OH y el otro sea OMe, entonces R<sup>5a</sup> sea distinto de 2-Me;

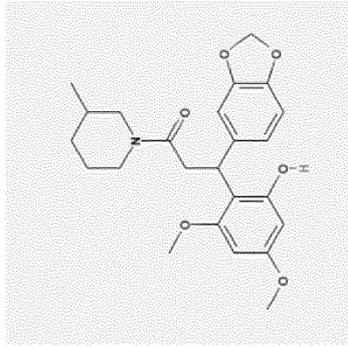
ii) cuando t sea 0, cada uno de R<sup>1a</sup>, R<sup>1b</sup> y R<sup>2</sup> sea H, R<sup>4</sup> sea 4-OMe o 4-Me, y uno de R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> sea OH y el otro sea OMe o Me; entonces R<sup>3</sup> sea distinto de 4-OMe, 4-NMe<sub>2</sub>, o 3,4-metilendioxi; o

iii) el grupo (R<sup>3</sup>)<sub>n1</sub>-Ph- sea distinto de benzopirano sustituido o sin sustituir.

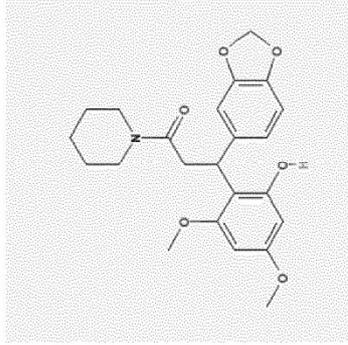
45 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde, en el compuesto de fórmula (III), A representa CH<sub>2</sub>.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde, en el compuesto de fórmula (III), cada uno de  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  es independientemente Cl, F, Me,  $CF_3$ , CN, OH, u OMe.
- 5 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde, en el compuesto de fórmula (III), cada uno de  $R^{7a}$  y  $R^{7b}$  es OH o alcoxi.
5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde, en el compuesto de fórmula (III),  $R^{1a}$  y  $R^{1b}$  son H.
- 10 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde, en el compuesto de fórmula (III),  $n_2$  es 1 y  $R^4$  es 4-Cl, 4-F, 4-Me, 4-Et, 4-i-Pr, 4-OMe, 4- $CF_3$ , 4-CN o 4-OH.
7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde, en el compuesto de fórmula (III),  $R^4$  es H, Cl, F, Me,  $CF_3$ , CN, OH y OMe.
- 15 8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde, en el compuesto de fórmula (III),  $R^4$  es 4-OMe.
- 20 9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde  $n_1$  es 1, 2 o 3.
10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, donde  $n_1$  es 1.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde  $R^2$  es H.
- 25 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde cada  $R^3$  se selecciona independientemente de H, OH, ciano, aminosulfonilo sin sustituir, carbamoilo sin sustituir y  $-SO_2R^{63}$  donde  $R^{63}$  se selecciona de H, alquilo  $C_{1-6}$ , arilo y heteroarilo.
- 30 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde cada  $R^3$  se selecciona independientemente de halo, alquilo  $C_{1-6}$  sustituido o sin sustituir, CN, OH, y alcoxi  $C_{1-6}$  sustituido o sin sustituir.
14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, donde  $n_1$  es 1 y  $R^3$  es CN.
- 35 15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, donde  $n_1$  es 1 y  $R^3$  es aminosulfonilo sin sustituir.
16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, donde  $n_1$  es 1 y  $R^3$  es carbamoilo sin sustituir.
- 40 17. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde t es 2 y un  $R^{5a}$  es 3-Me y el otro es 5-Me.
18. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 45 19. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, que está formulada para administración oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica o intranasal.
20. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso como un
- 50 producto farmacéutico.
21. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso en la prevención, tratamiento o mejora en un mamífero de una enfermedad o afección seleccionada de enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria, artritis, diabetes, esclerosis múltiple, uveítis, artritis reumatoide, psoriasis, asma, bronquitis, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aterosclerosis, infecciones por *H. pylori*, úlceras resultantes de dicha infección, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esprúe y alergias alimentarias.
- 55

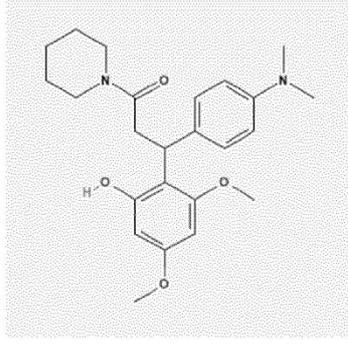
**Figura 1**  
**Compuestos específicos de RORg con actividad agonista inversa**



NCGC00166547-01  
(or NCGC00188327-01 )



NCGC00166488-01  
(or NCGC00188329-01)



NCGC00166426-01

Figura 2

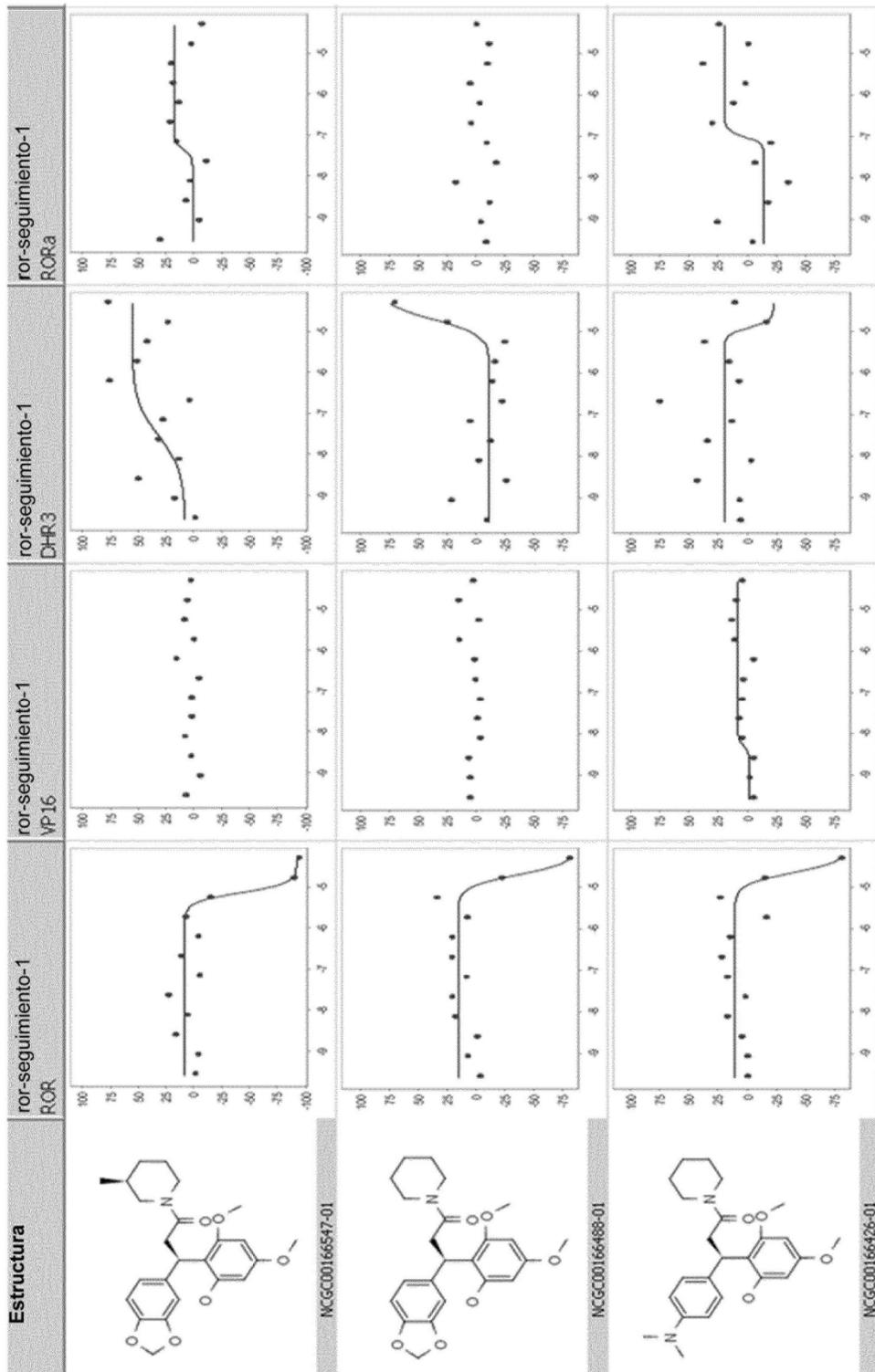


Figura 2 cont.

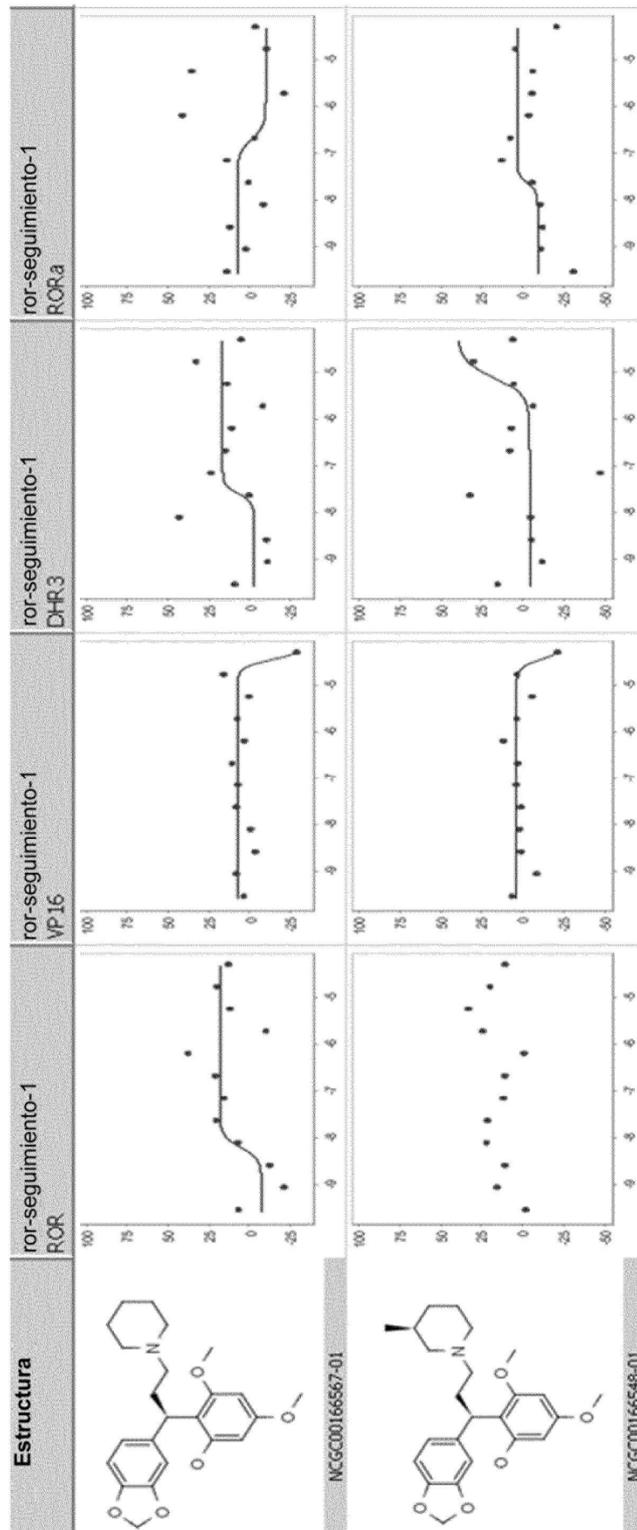


Figura 2 cont.

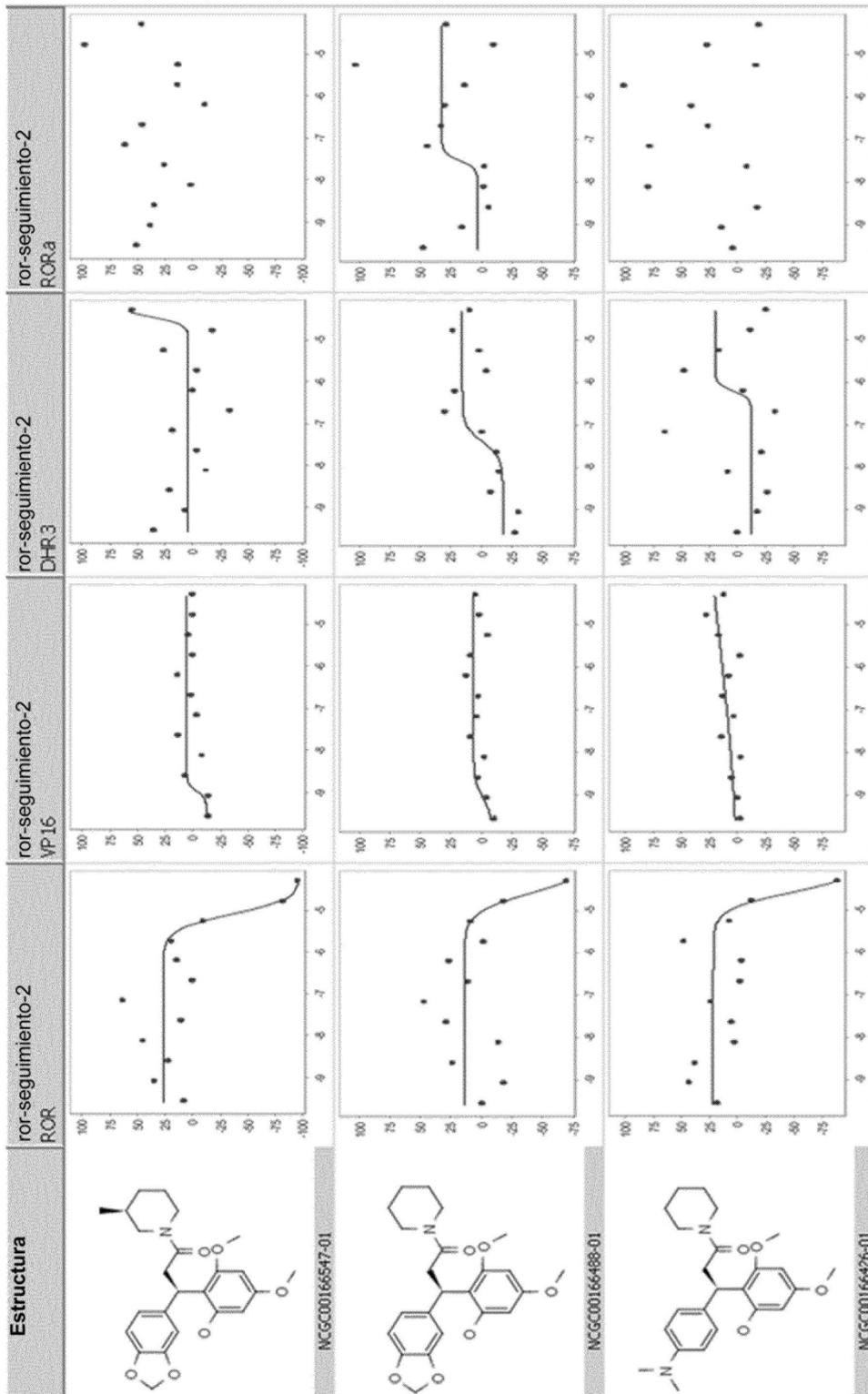


Figura 2 cont.

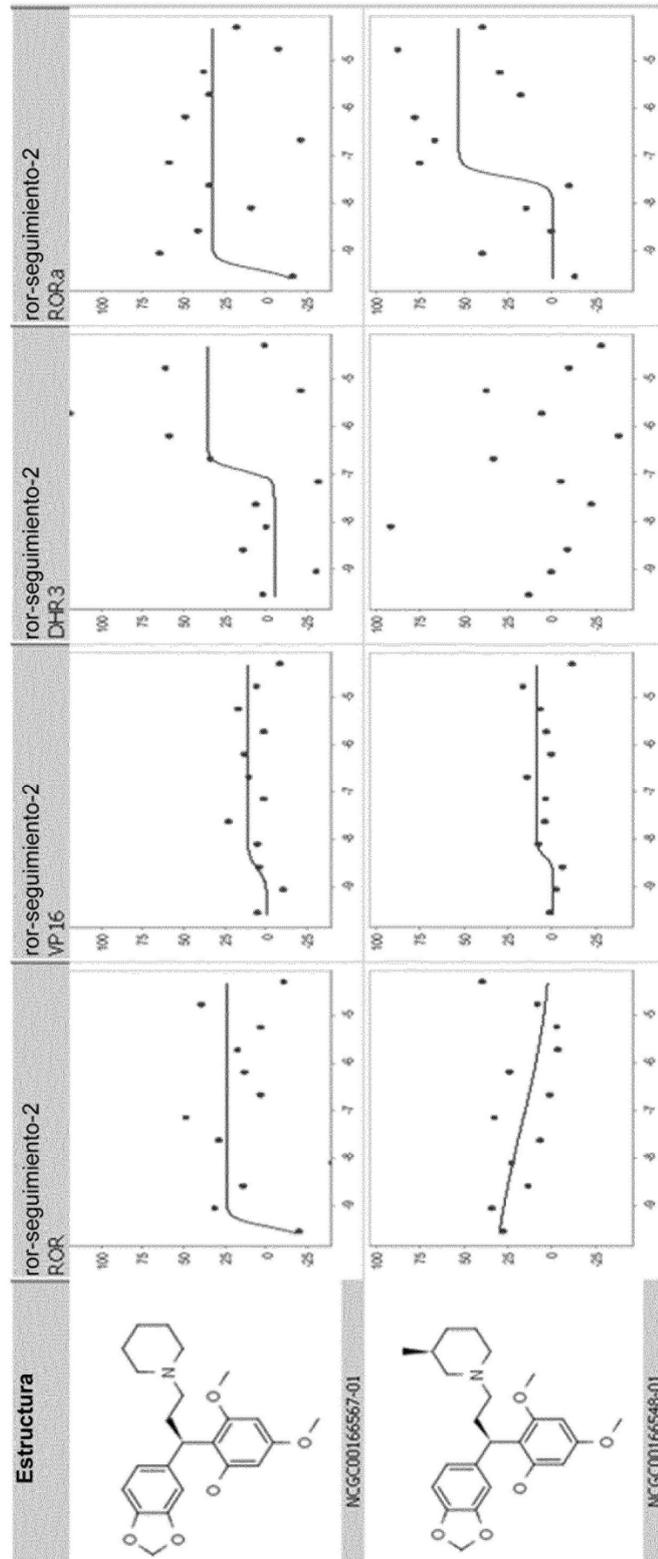
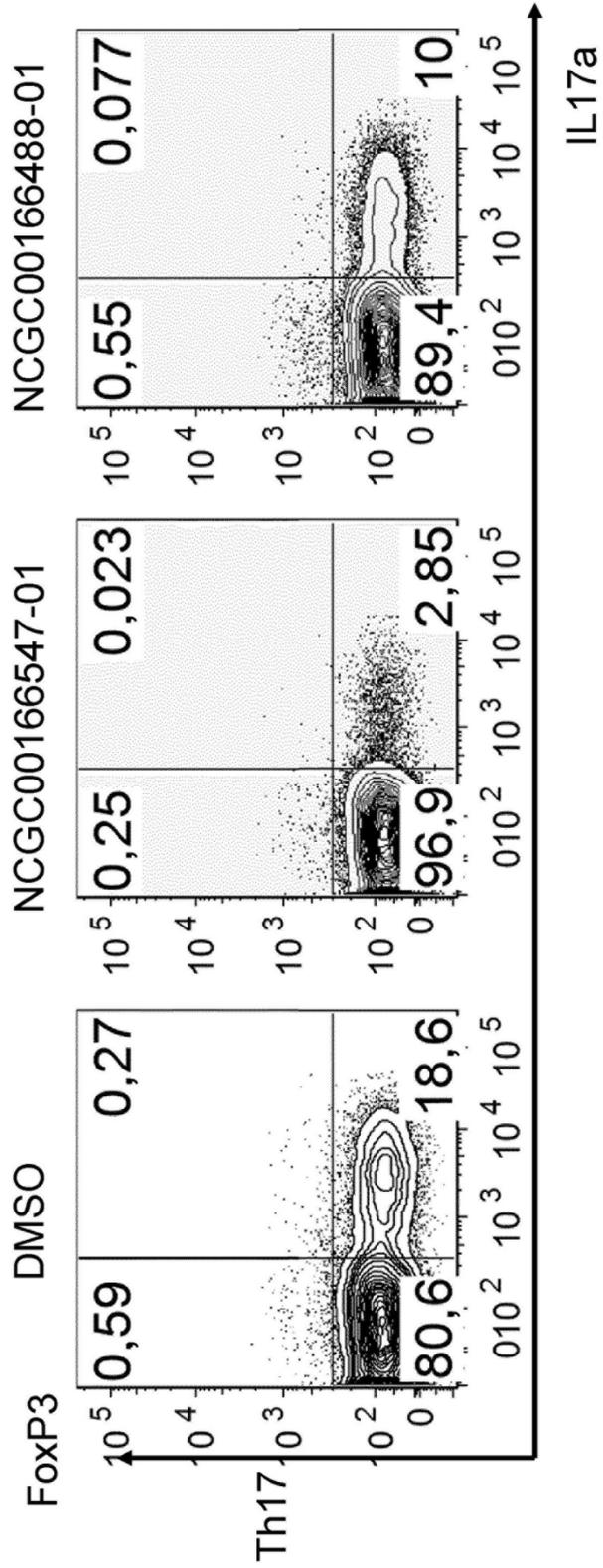


Figura 3  
Los compuestos NCGC00166547 y NCGC00166488 suprimen la diferenciación de Th17  
Compuestos a 20 20 uM



**Los compuestos NCGC00166547 no inhiben la diferenciación de Th1**  
 Compuestos a 20  $\mu$ M

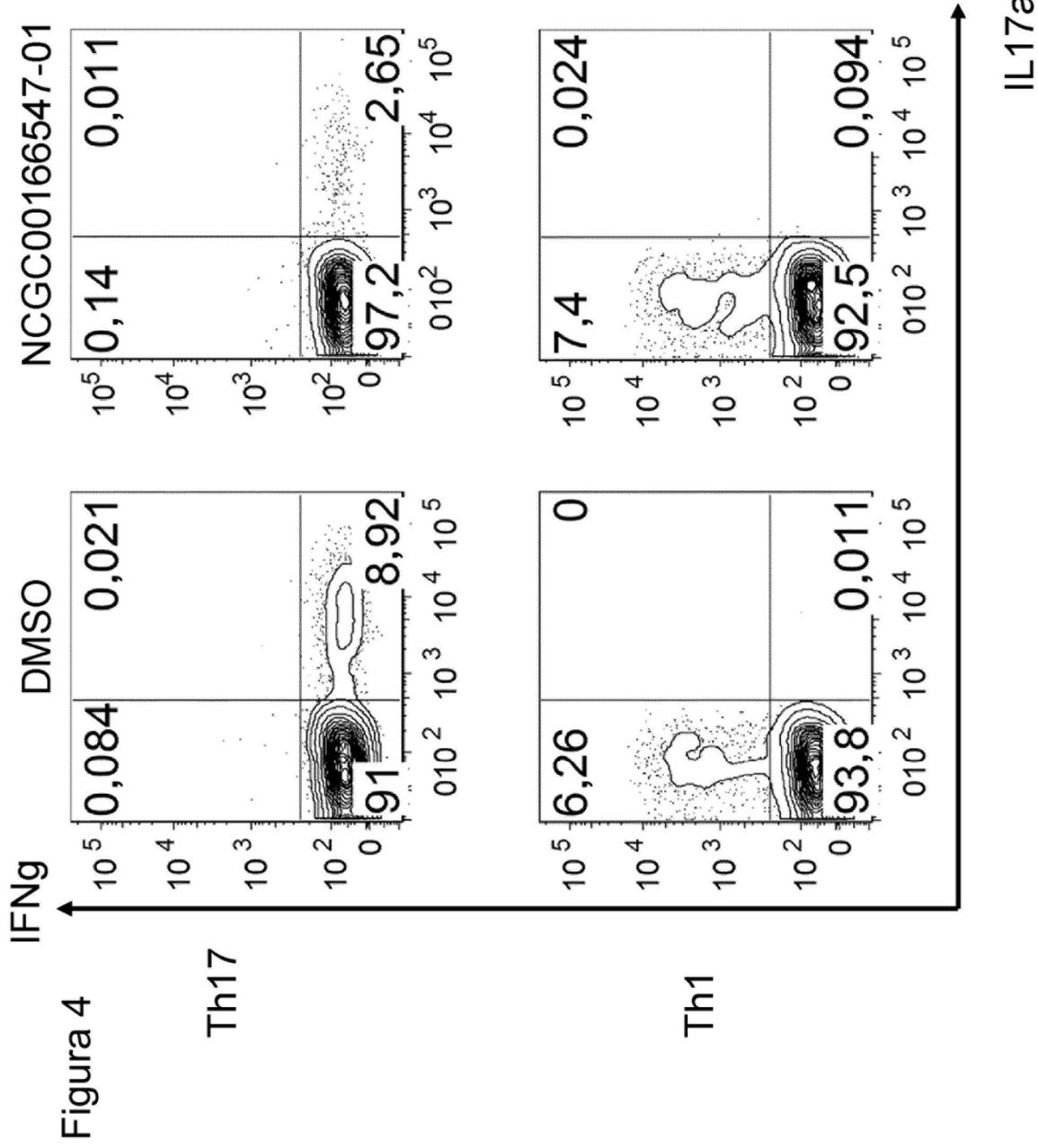
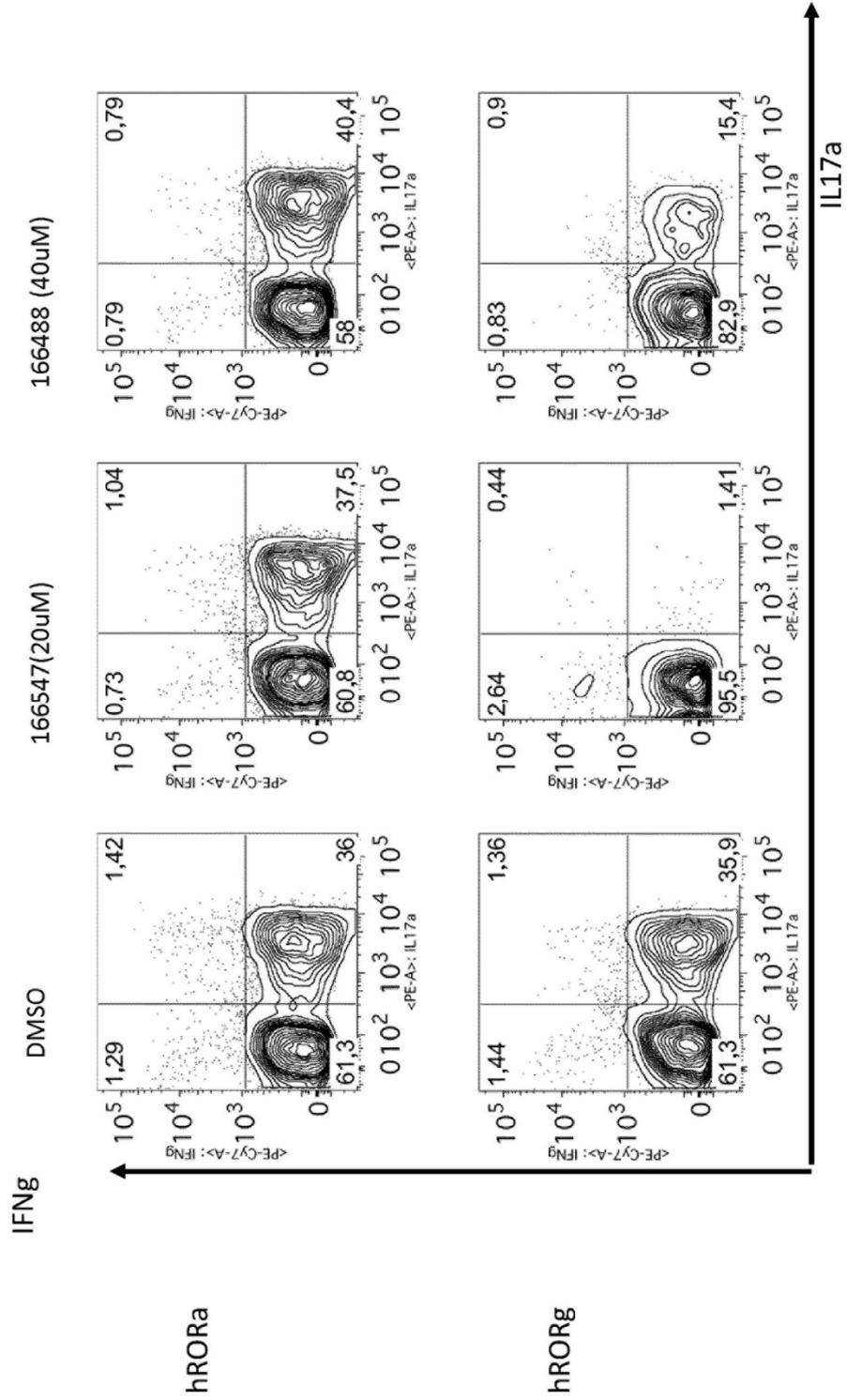


Figura 5



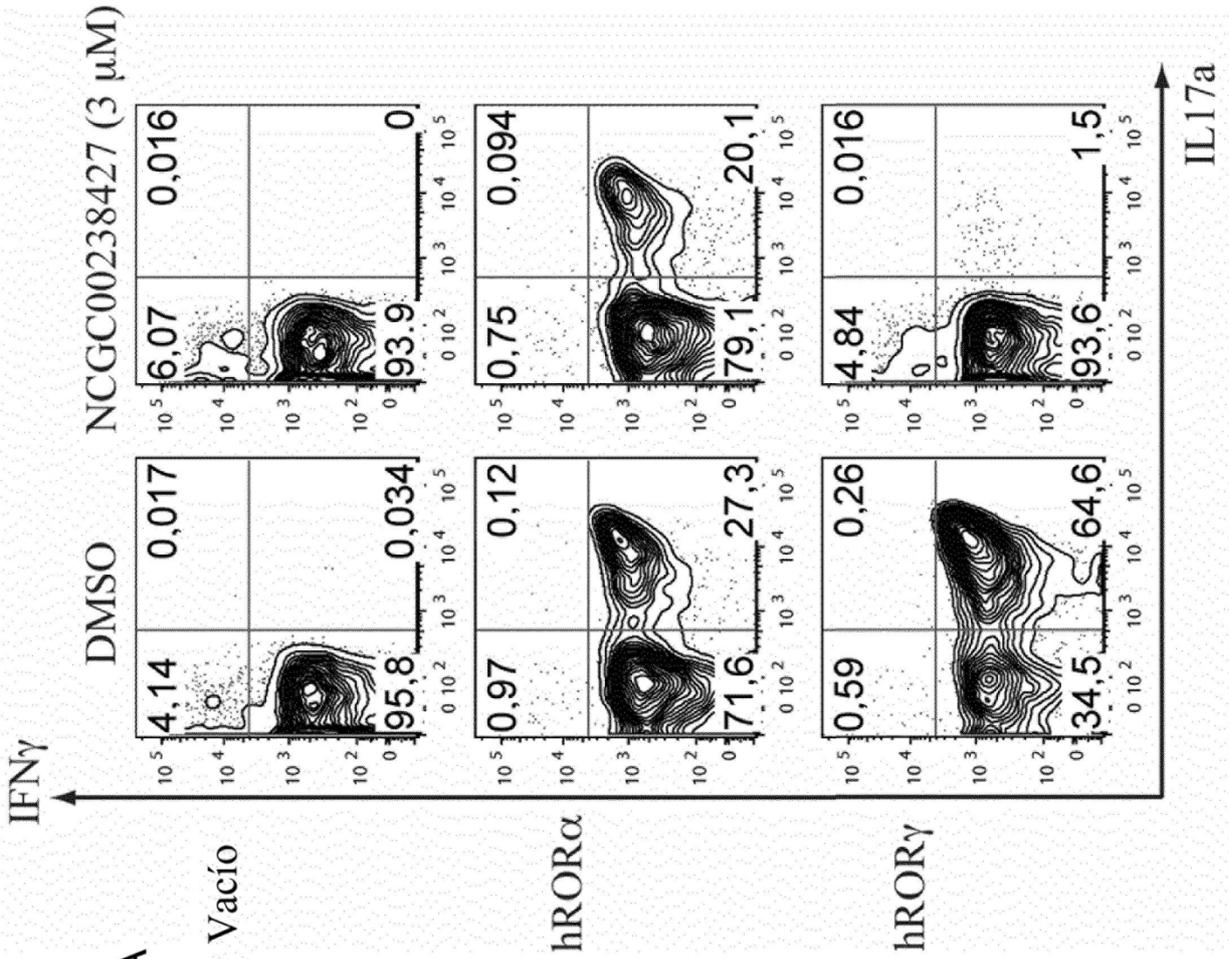


Figura 6A

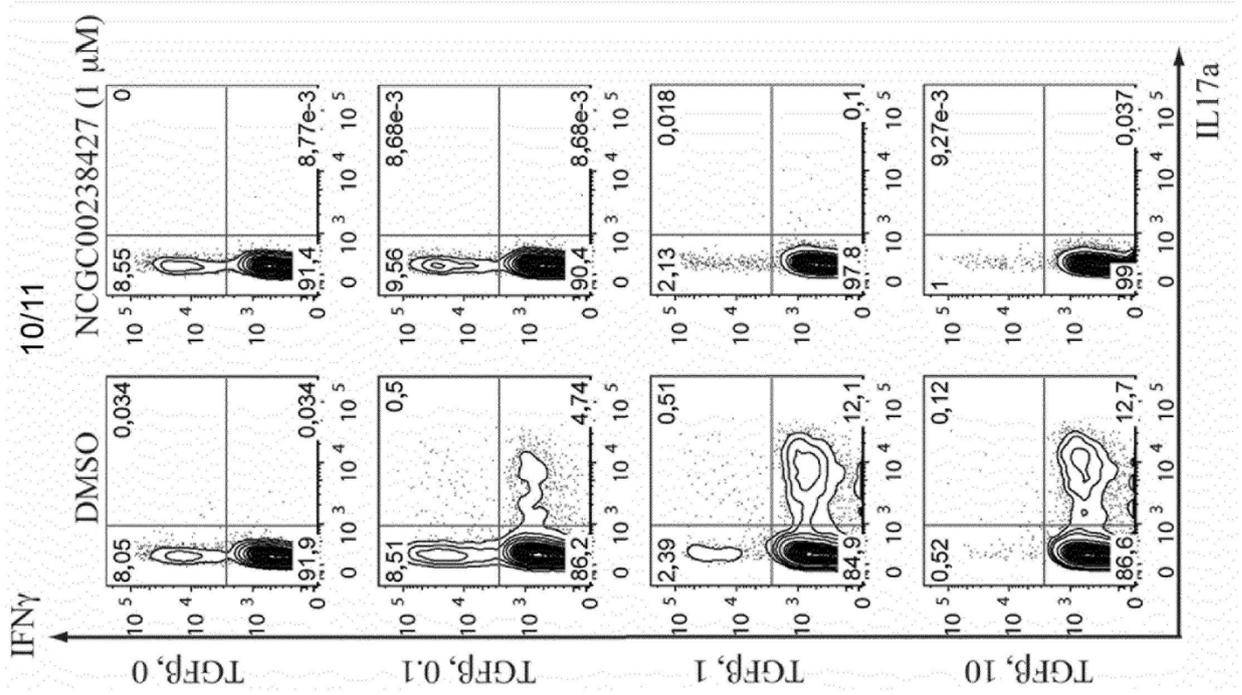


Figura 6B

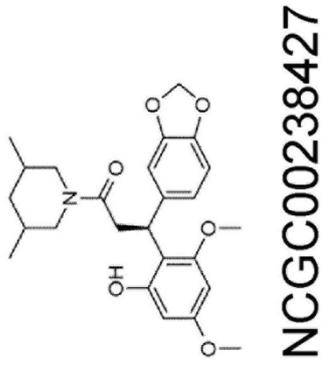


Figura 7A

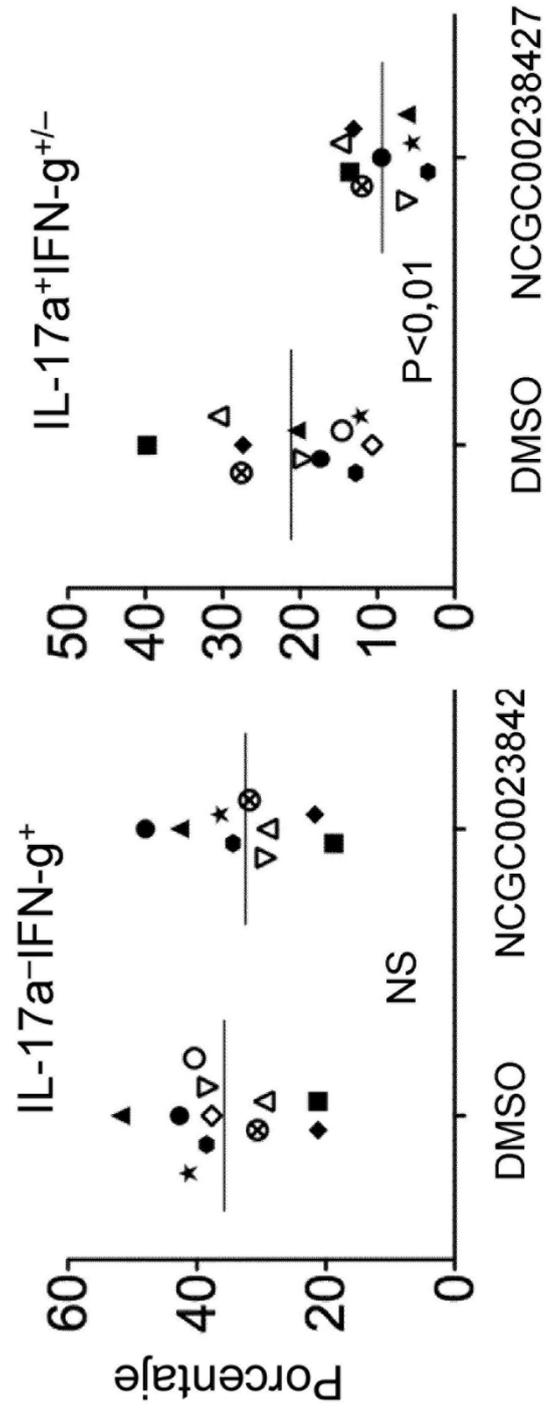


Figura 7B