



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 370**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01) **C12N 15/85** (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
C07C 243/38 (2006.01) **C07D 319/20** (2006.01)
C07D 307/79 (2006.01) **C07D 319/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99304444 .5**

86 Fecha de presentación : **08.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **0965644**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.1999**

54

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

30

Prioridad: **17.06.1998 US 89546 P**
02.05.1999 US 315451

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73

Titular/es: **Intrexon Corporation**
1872 Pratt Drive, Suite 1400
Blacksburg, Virginia 24060, US

72

Inventor/es: **Carlson, Glenn Richard;**
Cress, Dean Ervin;
Dhadialla, Tarlochan Singh;
Hormann, Robert Eugene y
Le, Dat Phat

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 296 370 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 La presente invención se refiere al uso de ligandos no esteroideos para inducir o suprimir la expresión de un gen exógeno en células animales y vegetales.

10 En el campo de la ingeniería genética, el control temporal preciso de la expresión génica, esto es, la capacidad para activar o suprimir un gen, es una herramienta valiosa para estudiar, manipular y controlar el desarrollo y otros procesos fisiológicos (véase, por ejemplo, Evans y No, solicitud internacional PCT WO 97/038117 y las referencias citadas allí). En sistemas de mamíferos, las aplicaciones incluyen la selección como dianas de genes inducibles, la sobreexpresión de genes tóxicos y teratogénicos, la expresión de ARN antisentido, y la terapia génica. En sistemas vegetales, las aplicaciones incluyen el control de rasgos de las plantas, la fertilidad masculina o femenina; la sobreexpresión de agentes protectores de la planta; y la producción de, o la modificación de, productos vegetales deseados, incluyendo materiales tanto naturales como no naturales. Tanto para animales como para plantas, la capacidad de inducción puede ser valiosa para la producción foránea de proteínas, por ejemplo proteínas terapéuticas, enzimas industriales, polímeros, y similares.

20 Es importante que el agente usado para controlar la expresión génica, que a menudo se denomina como un “interruptor génico”, sea aquel que está normalmente ausente en el organismo en el que reside el gen a controlar. Esto es para evitar la expresión o supresión inesperada del gen. Por ejemplo, se ha ideado y utilizado un sistema inducible regulado por tetraciclina en ratones transgénicos, con lo que se induce la actividad génica en ausencia del antibiótico, y se suprime en su presencia. Desafortunadamente, en este caso, la farmacocinética de la tetraciclina puede interferir con su uso como un interruptor génico de “encendido-apagado” eficiente.

25 La solicitud de patente internacional nº WO 96/037609 describe un receptor de esteroide de insecto aislado de *Heliothis virescens* (“HEcR”), que es capaz de actuar como un interruptor génico sensible tanto a inductores esteroideos (por ejemplo, 20-hidroxiecdisona y muristerona A) como a ciertos inductores no esteroideos. Los inductores no esteroideos tienen una clara ventaja con respecto a los esteroideos, en éste y en muchos otros sistemas que son sensibles tanto a inductores esteroideos como a inductores no esteroideos, por un número de razones, incluyendo, por ejemplo: coste más bajo de fabricación, estabilidad metabólica, ausencia de los insectos, plantas, o mamíferos, y aceptabilidad medioambiental. La solicitud PCT describe la utilidad de dos dibenzoilhidrazinas, 1,2-dibenzoil-1-*terc*-butil-hidrazina y tebufenocida (N-(4-etilbenzoil)-N’-(3,3’-dimetilbenzoil)-N’-*terc*-butil-hidrazina), como interruptores génicos para el sistema de HEcR, y sugiere que otras dibenzoilhidrazinas, tales como las descritas en la patente US nº 5.117.057, pueden también funcionar como interruptores génicos en el sistema. Aunque esto puede ser cierto, la actividad de estas dibenzoilhidrazinas es incierta. Específicamente, la patente nº 5.117.057 muestra una clase muy amplia de dibenzoilhidrazinas, muchas de las cuales parecen ser ineficaces como interruptores génicos. El documento WO 96/037609 indica que, cuando se ensayan 20 de tales dibenzoilhidrazinas, sólo 7 mostraron alguna actividad.

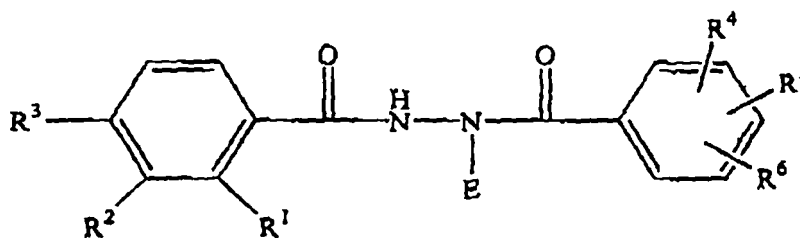
40 La solicitud de patente internacional nº WO 96/027673 describe el uso de tebufenocida como ligando químico para el receptor de ecdisona de *Drosophila melanogaster*. Este receptor se usa para controlar la expresión génica en plantas transgénicas, dando como resultado el control de diversos rasgos de importancia agronómica.

45 Desafortunadamente, incluso aunque los ligandos descritos en las referencias identificadas anteriormente muestran actividad de inducción de gen informador en células aisladas, no se hizo ninguna consideración para su uso en organismos completos, tales como plantas y animales intactos.

50 Por lo tanto, existe la necesidad continua de desarrollar ligandos no esteroideos con una actividad aumentada o consistente en comparación con los ligandos conocidos, y que demuestre esa actividad en plantas y animales intactos. Se ha descubierto un grupo limitado de derivados de dibenzoilhidrazina que no sólo muestran actividad de inducción de gen informador en células aisladas, sino también tiene ventajas con respecto a las diacilhidrazinas conocidas, 1,2-dibenzoil-1-*terc*-butil-hidrazina y tebufenocida, cuando se usan en plantas y en animales intactos, debido a sus propiedades de transporte y de distribución mejoradas, a su estabilidad metabólica, a su actividad residual, a su afinidad por el receptor, y a su falta de efectos adversos.

55 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* para modular la expresión de genes exógenos, que comprende poner en contacto un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

- 60 a) un dominio de unión a ADN;
- b) un dominio de unión a ligando;
- c) un dominio de transactivación; y
- 65 d) un ligando de la fórmula:



en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

f) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R¹ es Me o Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

g) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurílico o dihidropirfílico;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me; y

h) cuando R² es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe; entonces R¹ es Et, R³ es H, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

ES 2 296 370 T3

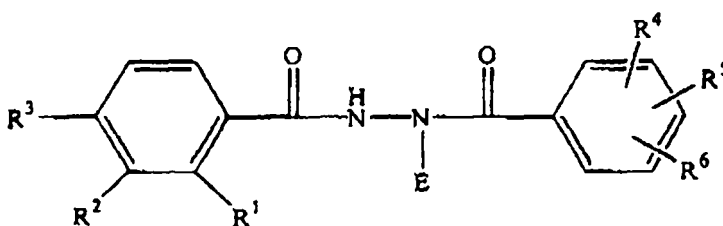
con un constructo de ADN, que comprende:

- a) el gen exógeno; y
- b) un elemento de respuesta;

en el que:

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para modular la expresión de uno o más genes exógenos en una planta, que comprende administrar a la planta una cantidad eficaz de un ligando de la fórmula:



en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

- a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

- b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

- c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

- i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

- ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

- d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

ES 2 296 370 T3

e) cuando R^3 es Et;

entonces R^2 es H, R^1 es F, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

5 f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

10 g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

15 h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

en el que las células de la planta contienen:

20 a) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

1) un dominio de unión a ADN;

25 2) un dominio de unión para el ligando; y

3) un dominio de transactivación; y

b) un constructo de ADN, que comprende:

30 1) el gen exógeno; y

2) un elemento de respuesta; y

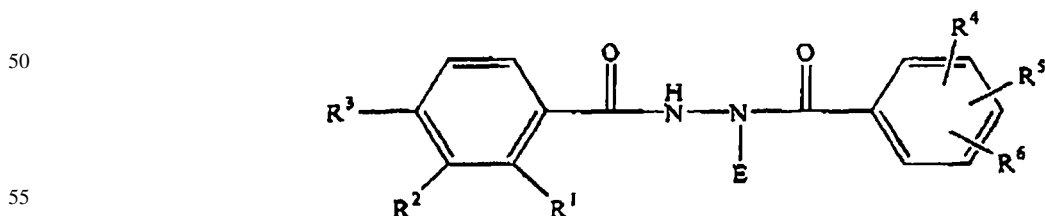
en el que:

35 a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y

40 b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o supresión del gen.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para producir un polipéptido, que comprende las etapas siguientes:

45 a) seleccionar una célula que es insensible a la exposición a un ligando de la fórmula:



en la que:

60 E es un alquilo (C_4-C_6) que contiene un carbono terciario;

R^1 es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

65 R^2 es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R^3 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

ES 2 296 370 T3

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

5 R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

10 a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

15 entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

20 entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

25 ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

30 e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

35 f) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

40 g) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me; y

45 h) cuando R² es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R¹ es Et, R³ es H, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

b) introducir en la célula:

50 1) un constructo de ADN, que comprende:

a) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y

55 b) un elemento de respuesta;

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

60 2) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

a) un dominio de unión a ADN;

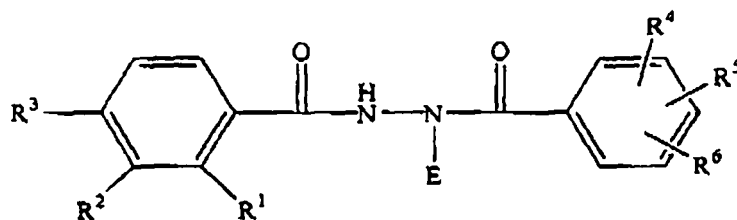
b) un dominio de unión para el ligando; y

65 c) un dominio de transactivación; y

c) exponer la célula al ligando de la etapa (a).

ES 2 296 370 T3

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para regular la expresión de genes endógenos o heterólogos en una planta transgénica, que comprende poner en contacto un ligando de la fórmula:



en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

f) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

g) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

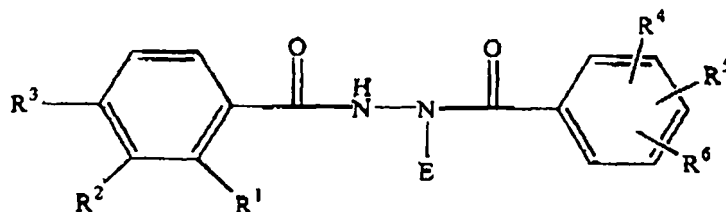
entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me; y

ES 2 296 370 T3

h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; con un complejo de receptor de ecdisona dentro de las células de la planta, en el que las células contienen además una secuencia de unión a ADN para el complejo de receptor de ecdisona cuando se encuentra en combinación con el ligando, y en el que la formación de un complejo del complejo de receptor de ecdisona con ligando y con la secuencia de unión a ADN induce la expresión del gen.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un ligando de la fórmula (I):



en la que:

E es un alquilo (C_4-C_6) que contiene un carbono terciario;

R^1 es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R^2 es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R^3 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirídico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R^3 es H, Et, o junto con R^2 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirídico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R^4 , R^5 , y R^6 son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH_2OH , CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R^1 es Me, y R^2 es OMe;

entonces R^3 es H; y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R^1 es Me, y R^2 es OEt;

entonces R^3 es H, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R^1 es Et, y R^2 es OMe u OEt;

entonces R^3 es H, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es;

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R^6 es H, R^4 es Me, y R^5 es Et, F, Cl, CH_2OH , CN, OMe, u OEt;

d) cuando R^1 es i-Pr;

entonces R^2 es OMe, u OEt; R^3 es H; y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

e) cuando R^3 es Et;

entonces R^2 es H, R^1 es F, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

ES 2 296 370 T3

g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

para modular *in vitro* la expresión de uno o más genes endógenos en una célula animal, en el que la célula contiene:

a) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

1) un dominio de unión a ADN;

2) un dominio de unión para el ligando; y

3) un dominio de transactivación; y

b) un constructo de ADN, que comprende:

1) el gen exógeno; y

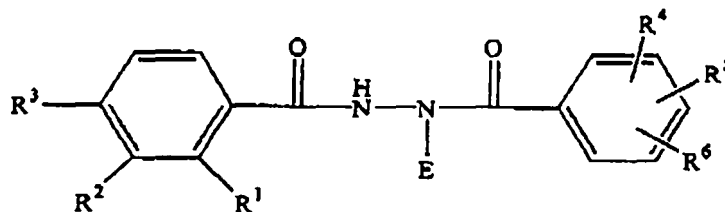
2) un elemento de respuesta; y

en la que:

a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y

b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o supresión del gen.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un ligando de la fórmula (I):



en la que:

E es un alquilo (C_4 - C_6) que contiene un carbono terciario;

R^1 es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R^2 es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R^3 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R^3 es H, Et, o junto con R^2 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R^4 , R^5 , y R^6 son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH_2OH , CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R^1 es Me, y R^2 es OMe;

entonces R^3 es H; y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

ES 2 296 370 T3

b) cuando R^1 es Me, y R^2 es OEt;

entonces R^3 es H, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R^1 es Et, y R^2 es OMe u OEt;

entonces R^3 es H, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R^6 es H, R^4 es Me, y R^5 es Et, F, Cl, CH_2OH , CN, OMe, u OEt;

d) cuando R^1 es i-Pr;

entonces R^2 es OMe, u OEt; R^3 es H; y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

e) cuando R^3 es Et;

entonces R^2 es H, R^1 es F, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurílico o dihidropirílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

en la preparación de un fármaco para modular la expresión de uno o más genes exógenos en un animal, en el que las células del animal contienen:

a) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

1) un dominio de unión a ADN;

2) un dominio de unión para el ligando; y

3) un dominio de transactivación; y

b) un constructo de ADN, que comprende:

1) el gen exógeno; y

2) un elemento de respuesta; y

en el que:

a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y

b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o supresión del gen.

Se describe en la presente memoria una mejora en un método para modular la expresión de genes exógenos, que comprende poner en contacto un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

a) un dominio de unión a ADN;

b) un dominio de unión a ligando;

c) un dominio de transactivación; y

d) un ligando;

ES 2 296 370 T3

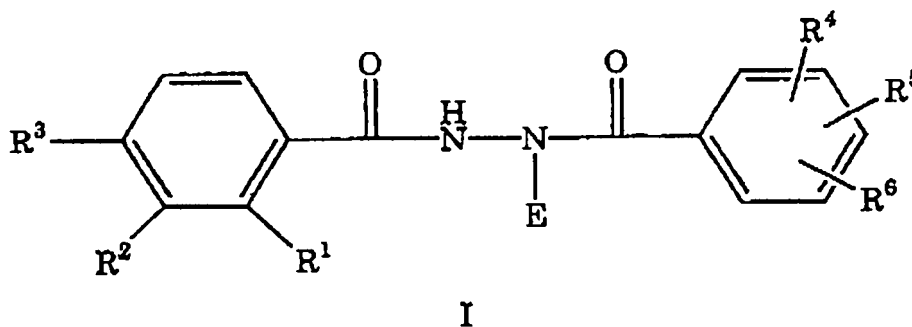
con un constructo de ADN, que comprende:

- a) el gen exógeno; y
- b) un elemento de respuesta;

en el que:

- a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y
- b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o supresión del gen; comprendiendo la mejora:

seleccionar el ligando a partir de un compuesto de fórmula I:



en la que:

E es un (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario, o un cianoalquilo (C₃-C₆) que contiene un carbono terciario

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, formilo, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, 1-propinilo, 2-propinilo, vinilo, OH, OMe, OEt, ciclopropilo, CF₂CF₃, CH=CHCN, alilo, azido, SCN, o SCHF₂;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, formilo, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C=CH, 1-propinilo, 2-propinilo, vinilo, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, O-n-Pr, OAc, NMe₂, NEt₂, SMe, SEt, SOCF₃, OCF₂CF₂H, COEt, ciclopropilo, CF₂CF₃, CH=CHCN, alilo, azido, OCF₃, OCHF₂, O-i-Pr, SCN, SCHF₂, SMe, NH-CN, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, Br, formilo, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CN, C≡CH, 1-propinilo, 2-propinilo, vinilo, OMe, OEt, SMe, o SEt;

con la condición de que:

- a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

- b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

- c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe o OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

- i) 3, 5-di-OMe-4-Me, 3, 5-di-Cl, 3, 5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Br-5-Me, 2-Cl, 2-Br, o 3-Me; o

ES 2 296 370 T3

ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, Br, formilo, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CN, C≡CH, 1-propinilo, 2-propinilo, vinilo, OMe, OEt, SMe, o SET;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, o OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F o Cl, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

f) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R¹ es Me o Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3, 5-di-Me;

g) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

h) cuando R¹ es formilo, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, 1-propinilo, 2-propinilo, vinilo, OH, ciclopropilo, CF₂CF₃, CH=CHCN, alilo, azido, SCN, o SCHF₂;

entonces R² es OMe o OEt, R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me; e

i) cuando R² es Me, Et, n-Pr, i-Pr, formilo, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, 1-propinilo, 2-propinilo, vinilo, Ac, F, Cl, OH, O-n-Pr, OAc, NMe₂, NEt₂, SMe, SET, SOCF₃, OCF₂CF₂H, COEt, ciclopropilo, CF₂CF₃, CH=CHCN, alilo, azido, OCF₃, OCHF₂, O-i-Pr, SCN, SCHF₂, SMe, o NH-CN;

entonces R¹ es Et, R³ es H, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me.

Se menciona en la presente memoria un método para modular la expresión de genes exógenos, que comprende poner en contacto un complejo de receptor de ecdisona que comprende:

a) un dominio de unión a ADN;

b) un dominio de unión a ligando;

c) un dominio de transactivación; y

d) un ligando que consiste en un compuesto de fórmula I:

con un constructo de ADN, que comprende:

a) el gen exógeno; y

b) un elemento de respuesta;

en el que

a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y

b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o la supresión del gen.

A fin de lograr un balance óptimo entre a) la unión al ligando y la actividad de interruptor génico resultante, y b) el transporte, la sistemicidad, la toxicidad y la estabilidad metabólica en plantas y en animales intactos, son importantes la posición y el tamaño de los grupos sustituyentes del compuesto de fórmula I. El balance óptimo de propiedades parece que ocurre cuando E es t-butilo, R¹ es etilo, R² es etoxi, R³ es hidrógeno, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-dimetilo. La composición de cada uno de estos grupos "R" puede variar considerablemente. Sin embargo, las variaciones que conduzcan a cambios significativos en el tamaño, la forma y la polaridad global del compuesto de fórmula I tenderán a reducir el balance óptimo y, en consecuencia, las propiedades mejoradas del compuesto. Por esta razón, cuando se cambia la composición de uno cualquiera de los grupos R particulares con respecto a la óptima, se deben de limitar las variaciones en la composición de los restantes grupos R.

Preferentemente, R es alquilo (C₄-C₅). Más preferentemente E es t-butilo.

ES 2 296 370 T3

Preferentemente, R¹ es Me, Et, i-Pr, F, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, o CF₂CF₃. Más preferentemente, R¹ es Me, Et, i-Pr, F, CF₃, CHF₂, CH₂F, CH₂OMe, CH₂CN, C≡CH, o CF₂CF₃. Incluso más preferentemente, R¹ es Me, Et, i-Pr, o F. Más preferentemente, R¹ es Me o Et.

5 Preferentemente, R² es Et, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, OH, OMe, OEt, O-n-Pr, CF₂CF₃, azido, OCF₃, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico. Más preferentemente, R² es Et, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, OH, OMe, OEt, CF₂CF₃, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi o un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico. Incluso más preferentemente, R² es OH, OMe, OEt, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi o un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico. Más preferentemente, R² es OMe o OEt.

15 Preferentemente, R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico. Más preferentemente, R³ es H, Et o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico. Incluso más preferentemente, R³ es junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico.

25 Preferentemente, R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente Me, F, Cl, CH₂OH, o OMe. Más preferentemente, R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente Me, F, Cl, CH₂OH, o OMe. Incluso más preferentemente, R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente Me, F, o Cl. Aún más preferentemente, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3, 5-di-Cl, o 3, 5-di-F. Más preferentemente, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me.

30 Los términos “Me”, “Et”, “n-Pr”, “i-Pr”, y “Ac” significan metilo, etilo, propilo normal, isopropilo, y acetilo, respectivamente. Cuando se refiere a R⁴, R⁵, y R⁶, el término “2,4”, “2,5”, “3,5”, y similares, se refiere a las posiciones relativas sobre el anillo fenílico al que están unidos los grupos.

El término “halo” significa fluoro, cloro, bromo, o yodo.

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

La expresión “gen exógeno” significa un gen ajeno al sujeto, esto es, un gen que es introducido en el sujeto a través de un proceso de transformación, o una versión no mutada de un gen mutado endógeno. El método de transformación no es crítico, y puede ser cualquier método adecuado para el sujeto, conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, las plantas transgénicas se obtienen mediante regeneración a partir de células transformadas. En la bibliografía se conocen numerosos procedimientos de transformación, tales como la agroinfección usando *Agrobacterium tumefaciens* o su plásmido T₁, la electroporación, la microinyección de células vegetales y protoplastos, y la transformación con microproyectiles. Se conocen técnicas complementarias para la transformación de células animales y la regeneración de tales células transformadas en animales transgénicos. Los genes exógenos pueden ser genes naturales o sintéticos y genes terapéuticos, que se introducen en el sujeto en forma de ADN o ARN que puede funcionar a través de un intermedio de ADN, tal como mediante transcriptasa inversa. Tales genes se pueden introducir en células diana, introduciéndose directamente en el sujeto, o introduciéndose indirectamente en el sujeto mediante la transferencia de células transformadas. La expresión “gen terapéutico” significa un gen que proporciona una función beneficiosa a la célula hospedante en la que se expresa tal gen. Los genes terapéuticos no se encuentran de forma natural en las células hospedantes.

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

Un complejo de receptor de ecdiesteroides se puede activar mediante un ligando activo de ecdiesteroides o mediante un ligando no esteroideo, unido a una de las proteínas del complejo, incluyendo EcR, pero sin excluir otras proteínas del complejo.

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

La expresión “elemento de respuesta” (“RE”) significa uno o más elementos de ADN que actúan en cis, los cuales confieren sensibilidad a un promotor a través de la interacción con los dominios de unión a ADN del complejo de receptor de ecdisona. Este elemento de ADN puede tener una secuencia palindrómica (perfecta o imperfecta), o puede estar compuesto de motivos de secuencias o semisitios separados por un número variable de nucleótidos. Los semisitios pueden ser similares o idénticos, y pueden estar dispuestos como repeticiones directas o invertidas. El complejo de receptor de ecdisona se une, en presencia o ausencia de un ligando, a la secuencia de ADN de un RE, para iniciar o suprimir la transcripción de un gen o genes en dirección 3’ bajo la regulación de este elemento de respuesta. Los ejemplos de secuencias de ADN para RE del receptor natural de ecdisona incluyen: RRGG/TTCANTGAC/ACY (véase Cherbas L., *et al.*, (1991), *Genes Dev.* 5, 120-131); AGGTCAN_(n)AGGTC, en la que N_(n) puede ser uno o más nucleótidos espaciadores (véase D’Avino PP., *et al.*, (1995), *Mol. Cell. Endocrinol.* 113, 1-9); y GGGTTGAATGAATTT (véase Antoniewski C., *et al.*, (1994). *Mol. Cell Biol.* 14, 4465-4474).

Las secuencias de ADN que forman el gen exógeno, el elemento de respuesta y el complejo de receptor de ecdisona se pueden incorporar en células procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, u otras enterobacterias. Sin embargo, debido a que muchas de las proteínas expresadas por el gen se procesan incorrectamente en bacterias, se prefieren las células eucariotas. Las secuencias nucleotídicas para el gen exógeno, el elemento de respuesta y el complejo de receptor también se pueden incorporar como moléculas de ARN, preferentemente en forma de ARN víricos funcionales, tales como el virus del mosaico del tabaco. De las células eucariotas, se prefieren las células de vertebrados, debido a que carecen de forma natural de las moléculas que confieren respuestas a los ligandos para el receptor de ecdisona. Como resultado, son insensibles a los ligandos descritos en la presente memoria. De este modo, los ligandos descritos en la presente memoria tendrán efectos fisiológicos insignificantes u otros efectos sobre células transformadas, o sobre el organismo completo. Por lo tanto, las células pueden hacer crecer y expresar el producto deseado, sustancialmente sin que se vean afectadas por la presencia del propio ligando.

El término “sujeto” significa una planta o animal intactos, o una célula procedente de una planta o animal. También se anticipa que los ligandos funcionarán igualmente bien cuando el sujeto es un hongo o una levadura. Cuando el sujeto es un animal intacto, preferentemente el animal es un vertebrado, más preferentemente un mamífero.

Los ligandos descritos en la presente memoria, cuando se usan con el complejo de receptor de ecdisona que a su vez está unido al elemento de respuesta ligado a un gen exógeno, proporcionan los medios para la regulación temporal externa de la expresión del gen exógeno. El orden en el que se unen los diversos componentes entre sí, esto es, ligando a complejo de receptor, y complejo de receptor a elemento de respuesta, no es crítico. Típicamente, la modulación de la expresión del gen exógeno se produce en respuesta a la unión del complejo de receptor de ecdisona a un elemento de ADN de control, o regulador, específico. La proteína del receptor de ecdisona, al igual que otros miembros de la familia de receptores de esteroides, presenta al menos tres dominios, un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN, y un dominio de unión a ligando. Este receptor, al igual que un conjunto de la familia de receptores de esteroides, también presenta regiones menos bien definidas, responsables de las propiedades de heterodimerización. La unión del ligando al dominio de unión a ligando de la proteína del receptor de ecdisona, después de la heterodimerización con USP o con la proteína RXR, permite que los dominios de unión a ADN de las proteínas heterodiméricas se unan al elemento de respuesta en forma activada, dando como resultado de este modo la expresión o supresión del gen exógeno. Este mecanismo no excluye la unión potencial a ligando a EcR o USP, ni la formación resultante de complejos homodiméricos activos (por ejemplo EcR + EcR o USP + USP). Preferentemente, se pueden variar uno o más de los dominios del receptor, produciendo un interruptor génico quimérico. Típicamente, uno o más de los tres dominios se pueden escoger a partir de una fuente diferente u organismo escogido, para la actividad transactivante, para la unión complementaria del ligando, y para el reconocimiento de un elemento de respuesta específico. Además, el propio elemento de respuesta se puede modificar o sustituir con elementos de respuesta para otros dominios proteínicos de unión a ADN, tales como la proteína GAL-4 de levadura (véase Sadowski, *et al.* (1988) *Nature*, 335, 563-564), o la proteína LexA de *E. coli* (véase Brent y Ptashne (1985), *Cell*, 43, 729-736), para acomodar complejos de receptor de ecdisona quiméricos. Otra ventaja de los sistemas quiméricos es que permiten elegir un promotor usado para conducir el gen exógeno según un resultado final deseado. Tal control doble puede ser particularmente importante en áreas de terapia génica, especialmente cuando se producen proteínas citotóxicas, debido a que se pueden controlar tanto el tiempo de expresión así como también las células en las que se produce la expresión. El término “promotor” significa una secuencia nucleotídica específica, reconocida por ARN polimerasa. La secuencia es el sitio en el que se puede iniciar específicamente la transcripción bajo las condiciones apropiadas. Cuando se introducen genes exógenos, ligados operativamente a un promotor adecuado, en las células del sujeto, la expresión de los genes exógenos está controlada por la presencia del ligando descrito en la presente memoria. Los promotores pueden estar regulados constitutiva o induciblemente, o pueden ser específicos de tejidos (esto es, se expresan sólo en un tipo particular de células), o pueden ser específicos para ciertas etapas de desarrollo del organismo.

ES 2 296 370 T3

Otro aspecto descrito en la presente memoria es un método para modular la expresión de uno o más genes exógenos en un organismo, que comprende administrar al organismo una cantidad eficaz, esto es, la cantidad requerida para provocar la expresión o supresión génica deseada, de un ligando que comprende un compuesto de fórmula I, y en el que las células del organismo contienen:

- 5
- a) un complejo de receptor de ecdisona que comprende:
 - 1) un dominio de unión a ADN;
 - 10 2) un dominio de unión para el ligando; y
 - 3) un dominio de transactivación; y
 - b) un constructo de ADN que comprende:
 - 15 1) el gen exógeno; y
 - 2) un elemento de respuesta; y
- 20 en el que:
- a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y
 - b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado
25 la activación o supresión del gen.

Un aspecto relacionado descrito en la presente memoria es un método para regular la expresión de un gen endógeno o heterólogo en un organismo transgénico, que comprende poner en contacto un ligando que comprende un compuesto de fórmula I con un receptor de ecdisona dentro de las células del organismo, en el que las células contienen una
30 secuencia de unión a ADN para el receptor de ecdisona, y en el que la formación de un complejo de receptor de ecdisona con ligando y con la secuencia de unión a ADN induce la expresión del gen.

Un cuarto aspecto descrito en la presente memoria es un método para producir un polipéptido, que comprende las etapas siguientes:

- 35
- a) seleccionar una célula que es sustancialmente insensible a la exposición a un ligando que comprende un compuesto de fórmula I;
 - b) introducir en la célula:
 - 40 1) un constructo de ADN que comprende:
 - a) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y
 - 45 b) un elemento de respuesta;
 - en el que el gen está bajo el control del elemento de respuesta; y
 - 2) un complejo de receptor de ecdisona que comprende:
 - 50 a) un dominio de unión a ADN;
 - b) un dominio de unión para el ligando; y
 - 55 c) un dominio de transactivación; y
 - c) exponer la célula al ligando.

Así como la ventaja de controlar temporalmente la producción de polipéptidos por la célula, este aspecto proporciona una ventaja adicional, en aquellos casos cuando la acumulación de tal péptido puede dañar la célula, por cuanto la expresión del polipéptido puede estar limitada a períodos cortos. Tal control es particularmente importante cuando el gen exógeno es un gen terapéutico. Los genes terapéuticos pueden ser requeridos para producir polipéptidos que controlan funciones necesarias, tales como la producción de insulina en pacientes diabéticos. También se pueden usar para producir proteínas dañinas o incluso letales, tales como aquellas letales para las células cancerígenas. Tal control
65 también puede ser importante cuando los niveles de proteína producidos pueden constituir una pérdida metabólica en el crecimiento o reproducción, tal como en plantas transgénicas.

ES 2 296 370 T3

En la técnica se conocen bien numerosas secuencias de ácidos nucleicos genómicas y de ADNc que codifican una variedad de polipéptidos. El material genético exógeno útil con los ligandos descritos en la presente memoria incluye genes que codifican proteínas de interés biológicamente activas, tales como, por ejemplo, proteínas secretoras que se pueden liberar a partir de una célula; enzimas que pueden metabolizar un sustrato de una sustancia tóxica a una sustancia no tóxica, o de una sustancia inactiva a una sustancia activa; proteínas reguladoras; receptores de la superficie celular; y similares. Los genes útiles también incluyen genes que codifican factores de coagulación de la sangre, hormonas tales como insulina, hormona paratiroidea, factor de liberación de hormona luteinizante, inhibinas alfa y beta seminales, y hormona del crecimiento humano; genes que codifican proteínas tales como enzimas, cuya ausencia conduce a la aparición de un estado anormal; genes que codifican citoquinas o linfocinas tales como interferones, el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, el factor 1 estimulante de colonias, el factor de necrosis tumoral, y eritropoyetina; genes que codifican sustancias inhibitorias tales como alfa-antitripsina; genes que codifican sustancias que funcionan como fármacos, tales como las toxinas de la difteria y del cólera; y similares. Los genes útiles también incluyen aquellos útiles para terapias contra el cáncer, y para tratar trastornos genéticos. Los expertos en la materia tienen acceso a información de secuencias de ácidos nucleicos para virtualmente todos los genes conocidos, y pueden obtener la molécula de ácido nucleico directamente de un depósito público, de la institución que publicó la secuencia, o puede utilizar métodos normales para preparar la molécula.

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

Las rutas adecuadas para administrar las preparaciones farmacéuticas incluyen la oral, rectal, tópica (incluyendo la dérmica, bucal y sublingual), la vaginal, la parenteral (incluyendo la subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), y mediante tubo nasogástrico. Los expertos en la materia entenderán que la ruta preferida de administración dependerá de la afección tratada, y puede variar con factores tales como el estado del receptor.

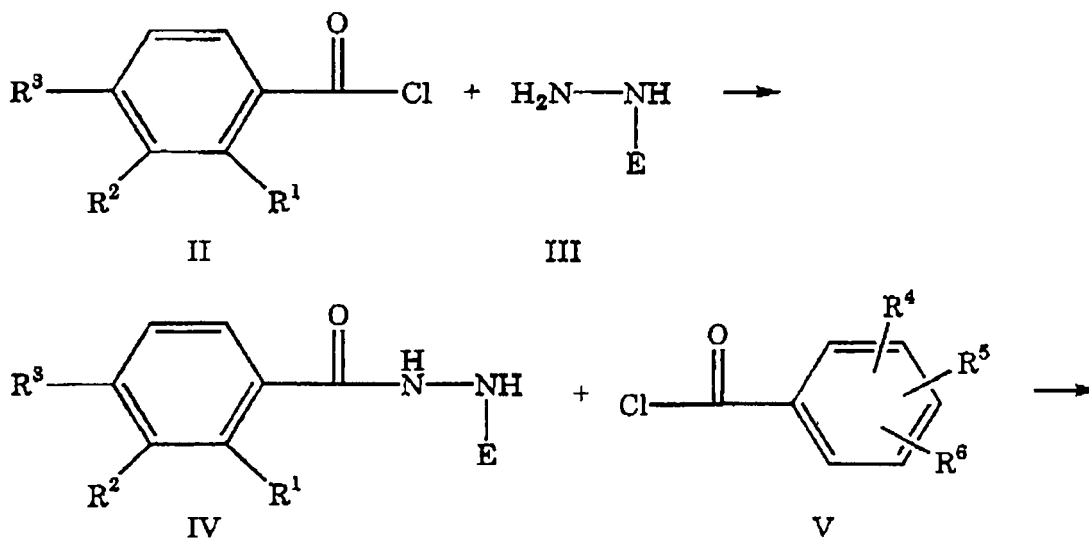
Los ligandos descritos en la presente memoria también se pueden administrar conjuntamente con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los expertos en la materia entenderán que los compuestos farmacéuticamente activos a usar en combinación con los ligandos descritos en la presente memoria se seleccionarán a fin de evitar efectos adversos sobre el receptor, o interacciones indeseables entre los compuestos. Los ejemplos de otros compuestos farmacéuticamente activos que se pueden usar en combinación con los ligandos incluyen, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos contra el SIDA, derivados de aminoácidos, analgésicos, anestésicos, productos anorrectales, antiácidos y antiflatulentos, antibióticos, anticoagulantes, antídotos, agentes antifibrinolíticos, antihistaminas, agentes antiinflamatorios, antineoplásicos, antiparasitarios, antiprotozoicos, antipiréticos, antisépticos, antiespasmódicos, y anticolinérgicos, antivíricos, supresores del apetito, medicaciones contra la artritis, modificadores de la respuesta biológica, reguladores del metabolismo óseo, agentes para la evacuación del intestino, agentes cardiovasculares, estimulantes del sistema nervioso central, potenciadores metabólicos cerebrales, cerumenolíticos, inhibidores de colinesterasa, preparaciones contra el resfriado y la tos, factores estimulantes de colonias, anticonceptivos, agentes citoprotectores, preparaciones dentales, desodorantes, productos dermatológicos, agentes destoxicantes, agentes contra la diabetes, agentes de diagnóstico, medicaciones contra la diarrea, agonistas del receptor de dopamina, electrolitos, enzimas y digestivos, preparaciones de ergot, agentes de fertilidad, suplementos de fibra, agentes antifúngicos, inhibidores de galactorrea, inhibidores de la secreción de ácido gástrico, agentes procinéticos gastrointestinales, inhibidores de gonadotropina, estimulantes del crecimiento del cabello, hematínicos, agentes hemorreológicos, hemostáticos, antagonistas del receptor H₂ de la histamina, hormonas, agentes hiperglucémicos, hipolipidémicos, inmunosupresores, laxantes, leprostáticos, auxiliares de la leucaféresis, tensioactivos pulmonares, preparaciones contra la migraña, mucolíticos, antagonistas relajantes del músculo, relajantes musculares, antagonistas narcóticos, pulverizaciones nasales, medicaciones contra las náuseas, análogos nucleosídicos, suplementos nutricionales, preparaciones contra la osteoporosis, oxitócicos, parasimpatolíticos, parasimpatomiméticos, fármacos contra el parkinsonismo, auxiliares de la penicilina, fosfolípidos, inhibidores de plaquetas, agentes de porfiria, análogos de prostaglandinas, prostaglandinas, inhibidores de la bomba de protones, medicaciones contra el prurito, psicotrópicos, quinolonas, estimulantes de la respiración, estimulantes salivares, sustitutos salinos, agentes esclerosantes, preparaciones contra heridas de la piel, auxiliares para dejar el tabaquismo, sulfonamidas, simpatolíticos, trombolíticos, agentes contra el síndrome de Tourette, preparaciones contra el temblor, preparaciones contra la tuberculosis, agentes uricosúricos, agentes para el aparato urinario, agentes que contraen el útero, relajantes uterinos, preparaciones vaginales, agentes contra el vértigo, análogos de la vitamina D, vitaminas, y medios de contraste para formación de imágenes médicas. En algunos casos, los ligandos pueden ser útiles como un auxiliar para la terapia farmacéutica, por ejemplo para “apagar” un gen que produce una enzima que metaboliza un fármaco particular.

Para aplicaciones en agricultura, además de las aplicaciones descritas anteriormente, los ligandos descritos en la presente memoria también se pueden usar para controlar la expresión de proteínas plaguicidas, tales como la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tal expresión puede ser específica de tejidos o de la planta. Además, particularmente cuando también se necesita el control de plagas de las plantas, se puede combinar uno o más plaguicidas con los ligandos descritos en la presente memoria, proporcionando de ese modo ventajas y eficacia adicionales, incluyendo menores aplicaciones totales que si los plaguicidas se aplicasen separadamente. Cuando se utilizan mezclas de plaguicidas, las proporciones relativas de cada componente en la composición dependerá de la eficacia relativa y de la tasa

de aplicación deseada de cada plaguicida con respecto a las cosechas, plagas, y/o malas hierbas a tratar. Los expertos en la materia reconocerán que las mezclas de plaguicidas pueden proporcionar ventajas, tales como un espectro más amplio de actividad, que si se usase un solo plaguicida. Los ejemplos de plaguicidas que se pueden combinar en composiciones con los ligandos descritos en la presente memoria incluyen fungicidas, herbicidas, insecticidas, miticidas y biocidas.

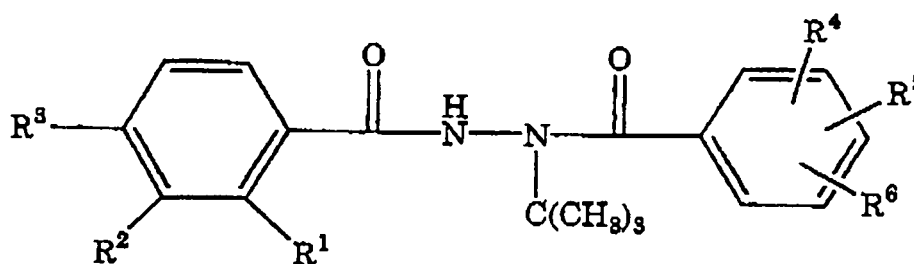
Los ligandos descritos en la presente memoria se pueden aplicar al follaje de las plantas como pulverizaciones acuosas mediante métodos utilizados normalmente, tales como pulverizaciones hidráulicas de gran capacidad convencionales, pulverizaciones de baja capacidad, chorro de aire, y pulverizaciones aéreas. La dilución y la tasa de aplicación dependerá del tipo de equipo utilizado, del método y la frecuencia de aplicación deseados, y de la tasa de aplicación del ligando. Puede ser deseable incluir adyuvantes adicionales en el tanque de pulverización. Tales adyuvantes incluyen tensioactivos, dispersantes, agentes expendedores, agentes de pegajosidad, agentes antiespumantes, emulsionantes, y otros materiales similares descritos en McCutcheon's Emulsifiers and Detergents, McCutcheon's Emulsifiers and Detergents/Functional Materials, y McCutcheon's Functional Materials, todas ellas publicadas anualmente por McCutcheon Division en MC Publishing Company (New Jersey). Los ligandos también se pueden mezclar con fertilizantes o materiales fertilizantes, antes de su aplicación. Los ligandos y el material fertilizante sólido también se pueden mezclar en un equipo de mezclamiento o de amasado, o se pueden incorporar con fertilizantes en formulaciones granulares. Se puede usar cualquier proporción relativa de fertilizante que sea adecuada para las cosechas y malas hierbas a tratar. Los ligandos descritos en la presente memoria comprenderán habitualmente de 5% hasta 50% de la composición fertilizante. Estas composiciones proporcionan materiales fertilizantes que promueven el crecimiento rápido de plantas deseadas, y al mismo tiempo controlan la expresión génica.

Los ligandos descritos en la presente memoria son compuestos conocidos, o se preparan fácilmente por el experto en la materia, adaptando los procedimientos descritos en las patentes US n° 5.117.057, n° 5.530.028, y n° 5.378.726. Típicamente se usa un proceso de dos etapas. En la primera etapa, se combina un cloruro de ácido benzoico sustituido, de fórmula II, con una hidrazina sustituida de fórmula III, para dar una monoacilhidrazina de fórmula IV. La monoacilhidrazina de fórmula IV se combina, en una segunda etapa, con otro cloruro de ácido benzoico de fórmula V, dando como resultado la formación de un compuesto de fórmula I.



Los siguientes ejemplos demuestran la actividad de los ligandos descritos en la presente memoria.

Se evaluaron los siguientes ligandos y ligandos comparativos:



ES 2 296 370 T3

Ligando	R1	R2	R3	3-R4	5-R5	4-r6
CE-1	H	H	Me	Me	Me	
CE-2	H	H	H	H	H	
CE-3						
1	Et	OMe	H	OMe	H	
2	Me	-OCH ₂ CH ₂ O-		Me	Me	
3	Me	OMe	H	Me	Me	
4	Et	OMe	H	F	F	
5	Et	OMe	H	Me	Me	
6	Me	OEt	H	Me	Me	
7	Et	-OCH ₂ CH ₂ O-		Me	Me	
8	Et	-CH ₂ CH ₂ O-		Me	Me	
9	Me	OMe	H	Cl	Cl	
10	Et	OMe	H	Cl	Me	
11	i-Pr	OMe	H	Me	Me	
12	Et	OEt	H	Me	Me	
13	Et	OMe	H	Cl	Cl	
14	Me	OH	H	Me	Me	
15	Me	OH	H	Me	CH ₂ OH	
17	F	Et	Et	Me	Me	
18	Me	OMe	H	OMe	OMe	Me

CE-1 = tebufenozida
 CE-2 = 1,2-dibenzoil-1-*terc*-butil-hidrazina
 CE-3 = muristerona A

35 *Constructos génicos*

pVgRXR (Invitrogen Corp., Carlsbad, California) es un plásmido de 8728 kb que expresa tanto VgEcR como RXR para formar un receptor nuclear heterodimérico modificado (véase No, D., *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 3346-3351). El receptor de ecdisona (VgEcR) deriva del receptor natural de ecdisona de *Drosophila*, y se modificó para que contuviese el dominio de transactivación VP16 (véase Cress, W. D., y Triezenberg, S.J. (1991), Science 251, 87-90; Sadowski, I., *et al.* (1988) Nature 335, 563-564; Triezenberg, S. *Jet al.*, (1988), Genes Dev 2, 718-729; Triezenberg, S.J., *et al.*, (1988), Genes Dev 2, 730-742). RXR es el homólogo mamífero de USP (ultraespiráculo), el compañero natural del receptor de ecdisona de *Drosophila* (véase Yao, T.-P., *et al.*, (1993), Nature 366, 476-479; Yao, T.-P., *et al.*, (1992), Cell 71, 63-72). La región de la caja P del dominio de unión a ADN de VgEcR se modificó para reconocer el elemento de respuesta de ecdisona híbrido, que consiste en un semisitio a partir del elemento de respuesta de glucocorticoides (véase Umesono, K., y Evans, R. M. (1989), Cell 57, 1139-1146), y un semisitio procedente del elemento natural de respuesta de ecdisona. Este elemento de respuesta híbrido reduce cualquier posible interacción con el receptor X de farsenoide, que se puede unir al elemento natural sensible a ecdisona (EcRE). El potenciador-promotor de citomegalovirus conduce la expresión de VgEcR, y el promotor del virus del sarcoma de Rous conduce la expresión de RXR. El vector pIND (Invitrogen Corp.) es un vector de 5024 pb basado en pcDNA3.1. Contiene cinco E/GRE híbridos reconocidos por el receptor de ecdisona modificado expresado a partir de pVgRXR, y un promotor de choque térmico mínimo (véase Yao, T. P., *et al.*, (1993), Nature, 366, 476-479). El pIND/lacZ (Invitrogen Corp.) es un plásmido de 8170 pb que contiene el gen de β -galactosidasa como enzima informadora. La cotransfección de pIND/lacZ y pVgRXR, da como resultado la inducción de la expresión de β -galactosidasa al añadir agonistas de ecdisona tales como muristerona A. El plásmido informador pIND/luc se construyó subclonando el gen de luciferasa de luciérnaga a partir de pGL3 (Promega/E1741) como un fragmento de Nhe I-BamHI en pIND, también digerido con Nhe I y BamHI.

60 *Mantenimiento de estirpes celulares de mamíferos y transfección*

Células CHO (ATCC # CCL-61) se mantuvieron en mezcla nutriente F-12 (medio de Ham) (Gibco/BRL, 11765-054) enriquecido con suero fetal bovino al 10% (FBS, medio completo; Gibco/BRL, 16000-036). Estas células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ en 95% de aire atmosférico.

65 Las células CHO se sembraron en placas de cultivo de tejidos, de 12 pocillos, a una concentración de 0,5 X 10⁵ células por ml por pocillo. El lípido Pfx-8 (Invitrogen, T930-18) se usó para transfectar transitoriamente el sistema de expresión inducible de ecdisona (número de catálogo de Invitrogen K1000-01). El sistema de expresión inducible

ES 2 296 370 T3

de ecdisona consiste en pVgRXR, que codifica las subunidades receptoras, y pIND/lacZ o pIND/luc, que contienen el elemento de respuesta y un gen formador que codifica β -galactosidasa o luciferasa, respectivamente. Veinticuatro horas después de sembrar las células, la disolución de lípido/ADN se preparó mediante 0,5 mg/ml de VgRXR, y 0,5 mg/ml de ADN de pIND/lacZ o pIND/luc, en agua estéril. Se diluyeron sesenta y seis μ l de Pfx-8 en un tubo de poliestireno estéril de 17 x 100 mm, que contiene 1,5 ml de medio Opti-MEM (Gibco/BRL, 31985). Se mezclaron seis μ l del ADN plasmídico con 1,5 ml de medio Opti-MEM, en otro tubo de poliestireno. Las disoluciones de ADN y de lípido se combinaron para obtener 3 ml de una disolución de transfección (suficiente para un conjunto de muestras por triplicado). Las células se lavaron con disolución tamponada con fosfato (PBS; Gibco/BRL, 14190-144), tres veces, aspirando medio de las células. Se añadió un ml de disolución de transfección por pocillo. Las células se incubaron durante cuatro horas, y el medio de transfección se substituyó por el mismo volumen de medio completo. Las células se incubaron durante 20 horas adicionales.

Estirpe celular de mamífero transformada de forma estable

Las células CHO transformadas de forma estable con pVgRXR y pIND/LacZ(SPI) (Invitrogen Corp.) se mantuvieron en medio F-12 de Ham que contiene 10% de FBS, 2 mM de glutamina, 300 mg/ml de zeocina (Invitrogen Corp.) y 300 mg/ml de higromicina B. Se puede inducir pIND(SPI), una alternativa al vector pIND, hasta niveles de expresión absolutos cinco veces mayores que aquel de pIND, debido a la presencia de 3 elementos SPI que actúan en cis. Correspondientemente, los niveles de expresión basales son mayores.

Tratamiento con ligandos

Se prepararon disoluciones madre (10^{-2} M) para muristerona A y los ligandos no esteroideos descritos en la presente memoria, en etanol y acetona respectivamente, y se almacenaron a -20°C . Veinticuatro horas después de la transfección, se añadió un compuesto de ensayo a una concentración final de $10 \mu\text{M}$ (10^{-5} M) a cada pocillo de 1 ml de cultivo celular. Como control positivo, se usó muristerona A, a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Como control negativo, se añadió acetona sola.

Ensayos de gen informador

La expresión del gen informador se evaluó 24-48 horas después del tratamiento de células transfectadas transitoriamente, o 24 horas después del tratamiento de la estirpe celular, transformada de forma estable, con los ligandos de ensayo. La β -galactosidasa se evaluó tiñendo células fijas, o evaluando la actividad enzimática en lisados celulares. La β -galactosidasa cataliza la hidrólisis del β -galactósido, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido), produciendo un color azul con las células fijas (Invitrogen, K1465-01), que se puede visualizar en un microscopio. Como alternativa, se usó tampón de lisis informador (RLB: Promega/E397A) para lisar las células para determinar la detección de la actividad de β -galactosidasa usando un sustrato quimioluminiscente, Galacto-Star (Tropix/BM100S). Las células dentro de cada placa de 12 pocillos se lisaron con $250 \mu\text{l}$ de RLB. Se evaluaron veinte μl de cada extracto con $100 \mu\text{l}$ de sustrato.

Para la detección de la actividad de luciferasa, las células se lavaron dos veces con PBS, y se lisaron con $250 \mu\text{l}$ de RLB por pocillo. Después de 10 minutos, la placa se congeló a -80°C durante 10 minutos, y se volvieron a la temperatura ambiente. Una muestra de $20 \mu\text{l}$ de lisado se mezcló con $100 \mu\text{l}$ de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega, E1500). Tanto para el ensayo de β -galactosidasa como de luciferasa, la luminiscencia se detectó a temperatura ambiente usando un luminómetro de placa de microtitulación DYNEX MLX, equipado con un autoinyector para el suministro del sustrato.

Preparación de extracto de receptor de ecdisona citosólico a partir de células Kc de Drosophila

La estirpe celular Kc167 de dípteros, originalmente derivada de embriones de *Drosophila* (véase Echalié, G. y Ohanesian, A. (1969) C. R. Acad. Sci., 268, 1771), se obtuvo Dr. Peter Cherbas (Indiana University), y se mantuvo como se describe (Cherbas, L., et al., (1994), Methods in Cell Biology, 44,161-179). Se centrifugó un cultivo de 400 ml de células Kc (3×10^7 células por ml) a $700 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente, para formar peletes celulares. El sobrenadante se aspiró, y el pelete se resuspendió en 70 ml de tampón de TM frío (10 mM de Tris, 5 mM de MgCl_2 , 1 mM de DTT, pH 7.2). Después de una incubación de 10 minutos en hielo, las células se centrifugaron a $2.300 \times g$. El sobrenadante se desechó. El pelete celular se congeló a -20°C durante 1 hora. El pelete celular congelado se descongeló lentamente en hielo, y se homogeneizó en un homogeneizador Potter-Elvehjem frío usando una mano de mortero de teflón en un motor de homogeneizador Caframo, ajustado a 500 con 10 golpes ascendentes y descendentes a 4°C . Esta suspensión se centrifugó a $100.000 \times g$ en un rotor de cubo de balanceo durante 60 minutos. El sobrenadante, que contiene el extracto de proteína citosólica, se diluyó con tampón de T (10 mM de Tris, 1 mM de DTT, pH 7,2), hasta una concentración de proteína de 5 mg/ml. Este extracto se usó inmediatamente para ensayos de unión a ligandos.

ES 2 296 370 T3

Preparación de receptor de ecdisona nuclear a partir de células de Plodia interpunctella

La estirpe celular IAL-PID2, derivada de discos imaginales del ala del lepidóptero *Plodia interpunctella*, se obtuvo de H. Oberlander, y se mantuvo como se describe (Lynn, E. E. y Oberlander, H., (1983), J. Insect Physiology, 29, 591-96). Se centrifugó un cultivo de 300 ml de fase estacionaria de células de *P. interpunctella* a 700 x g durante 10 min. a temperatura ambiente, para peletizar las células. El sobrenadante se aspiró, y el pelete celular se resuspendió en 35 ml de TMT (tampón de TM con 0,1% de Triton X-100). La suspensión se homogeneizó con veinte golpes ascendentes y descendentes de un homogeneizador Dounce, en hielo. El homogenado se incubó en hielo durante 10 minutos, y después se centrifugó durante 15 minutos a 900 x g. El pelete se resuspendió en 15 ml de tampón de TM, y se centrifugó a 2.300 x g. Este pelete se extrajo en tampón de TMK (tampón de TM con 800 mM de KCl), usando una varilla de vidrio para machacar el pelete hasta que se formó una suspensión gelatinosa, y se incubó en hielo durante 15 minutos. El extracto se centrifugó a 100.000 x g en un rotor de cubo de balanceo, durante 60 minutos. El sobrenadante, que está constituido por el extracto nuclear, se desaló en una columna desaladora 10 DG (Bio-Rad, 732-2010), equilibrada con tampón de T. La concentración de proteína total en el extracto nuclear se ajustó a 5 mg por ml con tampón de T que contiene 1 mM de DTT.

Preparación de proteínas de fusión con glutathion-S-transferasa bacteriana

También se usaron, en ensayos de desplazamiento de radioligandos, proteínas de fusión del EcR del gusano del abeto (*Choristoneura fumiferana*) (CfEcR), que contiene sólo los dominios de CDEF, y de la proteína de tipo espiráculo (CfUSP), con glutathion-S-transferasa (GST) bacteriana. El ADNc que codifica los dominios de CDEF de CfEcR se construyeron tras la amplificación mediante PCR usando cebadores que contienen sitios de BamHI y EcoRI (Perera SC, M Sundaram, Krell PJ, Retnakaran A, Dhadialla TS, SR Palli, 1999 Arch. Insect Biochem. Physiol. 41, en prensa). El producto de la PCR se digirió con BamHI y con EcoRI, y se clonó en el vector pGEX-3X obtenido de Pharmacia Biotech. La región codificante de CfUSP se amplificó usando cebadores que contienen BamHI y EcoRI, y se clonó en el vector pGEX-2T obtenido de Pharmacia Biotech. Se hicieron crecer *E. coli* transformadas con cada un de estos dos vectores, y se indujeron para producir las proteínas de fusión como se detalla en el boletín técnico de GST de Pharmacia Biotech.

Ensayo de unión competitiva al receptor de ecdisona

Se mezcló ³H-ponasterona A, un potente fitoecdisteroide (66.000 dpm; actividad específica 170 Ci/mmol; NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts) con 100 μ l de extractos de receptor de ecdisona citosólico de Kc o de receptor de ecdisona nuclear de *Plodia*, en tubos de ensayo de vidrio de 0,8 x 50 mm, en ausencia o en presencia de 10 μ M de 20-hidroxiecdisona (20E) no marcada, para obtener un estimado de la unión total o no específica, respectivamente, de la ponasterona A tritiada. Los tubos se sometieron a remolino y se incubaron toda la noche a 4°C para los extractos citosólicos de Kc o 1,5 horas para los extractos nucleares de *Plodia*, para que las reacciones de unión alcanzasen el equilibrio. Al final de los tiempos de unión de equilibrio, se separó la ponasterona A tritiada unida de la no unida mediante adición de 600 μ l o 300 μ l de disolución de carbón revestido con dextrano enfriada en hielo (500 mg de carbón activado lavado con HCl de Sigma, 50 mg de dextrano T70 de Pharmacia, 50 ml de tampón de T) a los extractos de Kc o de *Plodia*, respectivamente. Los tubos se sometieron a remolino durante poco tiempo, y se centrifugaron a 7.000 x g para peletizar el carbón. El sobrenadante, 600 μ l o 300 μ l para las reacciones de los extractos de Kc o de *Plodia*, respectivamente, que contenía ponasterona A tritiada unida a proteínas, se aspiró en viales de recuento de líquidos por centelleo, que contienen 5 ml de cóctel de centelleo (ReadySafe®, Beckmann). La mezcla se sometió a remolino, y se midió la cantidad de radioactividad total o no unida específicamente, en un contador de centelleo de líquidos Beckmann LS500, con una eficiencia de recuento del 60% para tritio.

Determinación de los valores de K_d para inhibidores competitivos de ³H-ponasterona A que se une a complejos de receptor de ecdisteroide en extractos celulares de Kc o de Plodia y proteínas de fusión bacterianas

Las concentraciones de competidores que inhibieron el 50% de la unión de ponasterona A tritiada (IC₅₀) se determinaron incubando extractos nucleares de Kc o de *Plodia*, o extractos de bacterias que producen proteínas de fusión de CfEcR(CDEF)-GST y CfUSP-CST, con ³H-ponasterona A (66.000 dpm por reacción) en presencia de un intervalo de concentraciones (0,1 nM hasta 10 μ M) de compuestos de ensayo. En el caso de reacciones de unión que usan proteínas de fusión bacterianas, se incluyeron, por reacción de unión, 20 o uno μ l de extracto de bacterias que producen proteínas de fusión de CfEcR(CDEF)-GST o CfUSP-CST, respectivamente. Las condiciones del ensayo y la determinación de la unión total y no específica fueron como se describió anteriormente. El volumen de competidor en disolvente, como aquel para 20E o para disolvente solo, se mantuvo a 1% del volumen de reacción total, usando una disolución madre concentrada 100 veces (es decir, una dilución de 100 veces de disoluciones madre). El resto del ensayo fue como se describió anteriormente. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado por concentración por compuesto de ensayo. La unión específica de ³H-ponasterona A se determinó restando la unión no específica (la obtenida en presencia de 10 μ M de 20E) de la unida radioactiva total (sin competidor) o competida. Los datos para cada compuesto de ensayo se analizaron usando el programa de ordenador IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR), para calcular los valores de IC₅₀. La constante de unión (K_d en μ M) para los compuestos de ensayo se calculó incorporando la ecuación de Cheng-Prusoff (véase Munson PJ. y Rodbard D. (1980) Anal. Biochem. 107, 220-239) en el programa de ordenador IGOR Pro.

ES 2 296 370 T3

Las Tablas 1-3 resumen los datos obtenidos:

TABLA 1

Ligando	log(1/EC50) de Kc	log(1/IC50) de Plodia	log(1/IC50) de CfECR bacteriano
CE-1	6,55	8,7	
CE-2	5,52	6,48	
CE-3	7,96		
1	7,36	8,52	
2	7,16	9,14	
3	6,73	9,04	8,76
4	7,41	8,51	
5	7,70	9,49	
6		8,82	
7		8,78	
8		8,85	
9		9,00	
10		8,80	
11		8,93	
12	8,10	9,63	
13	7,44	9,06	
14			8,61
15			8,49
17		9,24	
18		8,82	

TABLA 2

Activación del gen de luciferasa en células CHO transfectadas transitoriamente			
Ligando <u>10 μM</u>	Actividad de luciferasa ¹	Relación de inducción ²	Kd para células de Kc (nM)
Ninguno	42		
CE-1	89	2	110
CE-2	36	1	2000
CE-3	316	8	2,3
CE-4	418	10	0,7
1	275	7	39,5
2	204	5	60
3	324	8	124
4	251	6	47
5	313	8	13,3
12	305	7	5,3
13	226	5	65

CE-4 = ponasterona A
¹ En unidades de luz relativas (RLU) – Media de muestras duplicadas
² Relación de RLU en presencia y ausencia del ligando

ES 2 296 370 T3

TABLA 3

Activación del gen de β -galactosidasa en células CHO transformadas de forma estable			
Ligando $10 \mu\text{M}$	Actividad de β -galactosidasa ¹	Relación de inducción ²	Kd para células de Kc (nM)
Ninguno	200		
CE-1	323	2	192
CE-2	145	1	2000
CE-3	9830	49	2
CE-4	10386	52	0,7
1	1123	6	40
2	536	3	47
3	681	3	124
4	1963	10	26
5	11599	58	13
12	9830	49	5
13	6667	33	24
¹ En unidades de luz relativas (RLU) – Media de muestras triplicadas ² Relación de RLU en presencia y ausencia del ligando			

Estos datos indican que los ligandos descritos en la presente memoria son capaces de inducir la expresión génica a concentraciones comparables a, o menores que, aquellas de los compuestos conocidos CE-1 y CE2.

Además de las capacidades mejoradas de modulación de la expresión génica, se espera que los ligandos tengan una mayor utilidad en plantas y animales intactos, debido a sus propiedades de transporte y metabólicas superiores. El siguiente ejemplo demuestra el transporte mejorado en plantas de un ligando descrito en la presente memoria (Ligando 3), en comparación con un ligando conocido (CE-1) en plantas.

Movimiento translaminar

Se llevó a cabo un estudio para evaluar el movimiento translaminar de dos compuestos en hojas de algodón usando, como sistema modelo, larvas de oruga de gardama neonatas, *Spodoptera exigua*.

Se evaluaron dos tratamientos: concentrados emulsionables de CE-1 y Ligando 3 (5% y 19%, respectivamente), a una concentración de $100 \mu\text{g/ml}$ para estimular concentraciones de tanque de pulverización. Estos tratamientos se compararon entonces con plantas tratadas con un estándar químico que se sabe que tiene un excelente movimiento translaminar (benzoato de emamectina, 0,16% EC [$20 \mu\text{g/ml}$], Merck & Co.), y con plantas no tratadas.

Se trataron plantas de algodón, *Gossypium hirsutum* L. cv. Stoneville, de cuatro semanas, con cada tratamiento, pintando la superficie superior de una sola réplica de hoja/planta con un tratamiento correspondiente. Las plantas se conservaron en un invernadero con entorno controlado, mantenido a 27°C hasta que se necesitaron. La eficacia residual se evaluó exponiendo el follaje tratado y no tratado a larvas de oruga de gardama neonatas, *Spodoptera exigua* (Hübner), en 3 fechas: 1, 7 y 14 días después del tratamiento (DAT). En cada fecha de muestra, la hoja/planta tratada una sola vez se cortó de cada una de cinco réplicas de plantas por tratamiento. Las hojas se aseguraron entonces a la tapa superior de una cápsula de Petri plástica ($100 \times 20 \text{ mm}$), y después se infestaron con 10 larvas en su primera etapa. Las larvas de oruga de gardama de primera etapa se alimentan habitualmente sobre la superficie inferior de las hojas, y generalmente no se alimentan más allá hasta la superficie superior. De este modo, sería necesario un movimiento translaminar de material para afectar a las larvas, puesto que los compuestos se aplicaron solamente a la parte superior de la superficie de la hoja. La mortalidad de las larvas se registró 4 días después de la infestación. Además, se observó cualquier larva viva en busca de síntomas característicos de compuestos que aceleran la muda (formación de una nueva cutícula y/o una cápsula de cabeza desprendida). Cada tratamiento se repitió cinco veces.

Los datos del porcentaje de mortalidad se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada, y después se realizaron mediante ANOVA usando JMP (Ver. 3.2.1). Las medias se separaron mediante el ensayo de Tukey-Kramer ($P = 0,05$).

Los resultados mostraron que el Ligando 3 fue significativamente más eficaz que CE-1 exterminando las larvas de *S. exigua* del movimiento translaminar, y por lo tanto sería de esperar que tuviese una mayor sistemicidad en plantas.

ES 2 296 370 T3

TABLA 4

Porcentaje de mortalidad

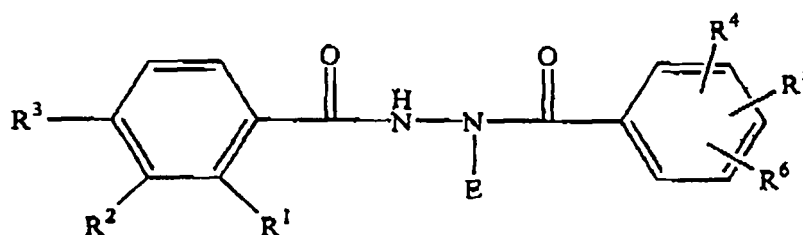
Tratamiento	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Día	Después	Aplic.
CE-1, 5% EC	100	1	7	14
3, 19% EC	100	2,5	0,0	22,7
Benzoato de emamectina	100	100,0	93,8	100,0
0,16 EC + AG-98	20	100,0	100,0	100,0
Comprobación no tratada		11,6	6,5	8,1
<u>AG-98 = 0,12% del tensioactivo no iónico Latron AG-98 (Rohm and Haas Company)</u>				

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para modular la expresión de genes exógenos, que comprende poner en contacto un complejo
5 de receptor de ecdisona que comprende:

- a) un dominio de unión a ADN;
- b) un dominio de unión a ligando;
- 10 c) un dominio de transactivación; y
- d) un ligando de la fórmula:



25 en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están
unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofúrico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o
un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un
anillo dihidrofúrico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno
adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F,
2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-
Me; o

ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

ES 2 296 370 T3

f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;
entonces R^1 es Me o Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

5 g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

10 h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

con un constructo de ADN, que comprende:

15

a) el gen exógeno; y

b) un elemento de respuesta;

20 en el que:

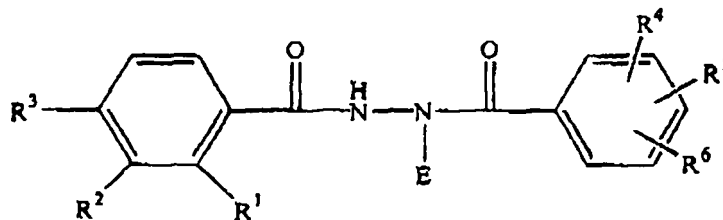
a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y

25

b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o la supresión del gen.

2. Método para modular la expresión de uno o más genes exógenos en una planta, que comprende administrar a la planta una cantidad eficaz de un ligando de la fórmula:

30



40

en la que:

45

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R^1 es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

50

R^2 es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R^3 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

55

R^3 es H, Et, o junto con R^2 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R^4 , R^5 , y R^6 son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

60

a) cuando R^1 es Me, y R^2 es OMe;

entonces R^3 es H; y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R^1 es Me, y R^2 es OEt;

65

entonces R^3 es H, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

ES 2 296 370 T3

c) cuando R^1 es Et, y R^2 es OMe u OEt;

entonces R^3 es H, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R^6 es H, R^4 es Me, y R^5 es Et, F, Cl, CH_2OH , CN, OMe, u OEt;

d) cuando R^1 es i-Pr;

entonces R^2 es OMe, u OEt; R^3 es H; y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

e) cuando R^3 es Et;

entonces R^2 es H, R^1 es F, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

en el que las células de la planta contienen:

a) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

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

b) un constructo de ADN, que comprende:

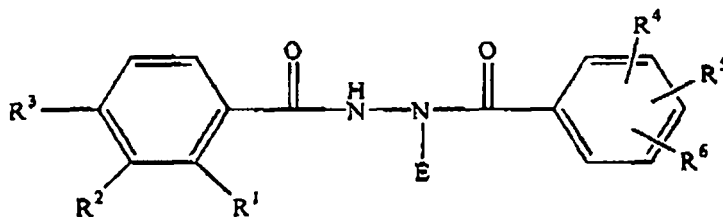
- 1) el gen exógeno; y
- 2) un elemento de respuesta; y

en el que:

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

3. Método para producir un polipéptido, que comprende las etapas siguientes:

a) seleccionar una célula que es insensible a la exposición a un ligando de la fórmula:



ES 2 296 370 T3

en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

5 R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

10 R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

15 R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

20 entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

25 entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

30 entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

35 ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

40 e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

45 f) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

50 g) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me; y

h) cuando R² es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

55 entonces R¹ es Et, R³ es H, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

b) introducir en la célula:

60 1) un constructo de ADN, que comprende:

a) un gen exógeno que codifica el polipéptido; y

65 b) un elemento de respuesta;

ES 2 296 370 T3

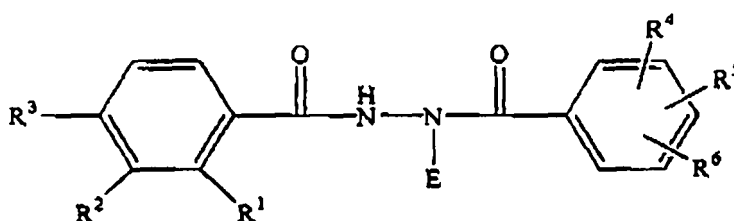
2) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

- a) un dominio de unión a ADN;
- b) un dominio de unión para el ligando; y
- c) un dominio de transactivación; y

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

c) exponer la célula al ligando de la etapa (a).

4. Método para regular la expresión de genes endógenos o heterólogos en una planta transgénica, que comprende poner en contacto un ligando de la fórmula:



en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirídico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirídico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

ES 2 296 370 T3

e) cuando R^3 es Et;

entonces R^2 es H, R^1 es F, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

5 f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

10 g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurílico o dihidropirfílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

15 h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

20 con un complejo de receptor de ecdisona dentro de las células de la planta, en el que las células contienen además una secuencia de unión a ADN para el complejo de receptor de ecdisona cuando se encuentra en combinación con el ligando, y en el que la formación de un complejo del complejo de receptor de ecdisona con ligando y con la secuencia de unión a ADN induce la expresión del gen.

25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y E es t-butilo.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y R^1 es Me, Et, i-Pr o F.

30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y R^2 es OH, OMe, OEt, o junto con R^3 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un anillo de etilendioxi o de dihidrofurilo con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico.

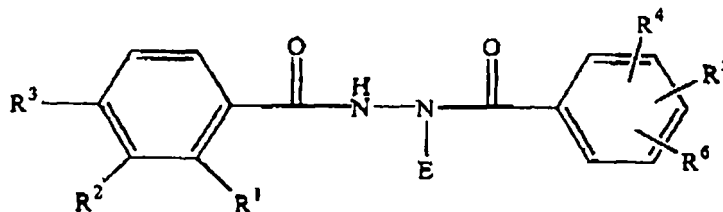
35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y R^3 es H, Et, o junto con R^2 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un anillo de etilendioxi o de dihidrofurilo con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y E es t-butilo, R^1 es Et, R^2 es OEt, R^3 es H, y la combinación R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me.

40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el complejo de receptor de ecdisona es un complejo de receptor de ecdisona quimérico, y el constructo de ADN comprende además un promotor.

11. Uso de un ligando de la fórmula (I):

45



50

55 en la que:

E es un alquilo (C_4 - C_6) que contiene un carbono terciario;

R^1 es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

60 R^2 es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R^3 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

65 R^3 es H, Et, o junto con R^2 y los carbonos fenílicos a los que están unidos R^2 y R^3 forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirfílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

ES 2 296 370 T3

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

- 5 a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;
entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;
- 10 b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;
entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;
- 15 c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;
entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:
- 20 i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o
ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;
- d) cuando R¹ es i-Pr;
25 entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;
- e) cuando R³ es Et;
entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;
- 30 f) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;
entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;
- 35 g) cuando R² y R³, junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurílico o dihidropirfílico;
entonces R¹ es Et, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me; y
- 40 h) cuando R² es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;
entonces R¹ es Et, R³ es H, la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

para modular *in vitro* la expresión de uno o más genes endógenos en una célula animal, en el que la célula contiene:

- 45 a) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:
- 1) un dominio de unión a ADN;
- 50 2) un dominio de unión para el ligando; y
- 3) un dominio de transactivación; y
- b) un constructo de ADN, que comprende:
- 55 1) el gen exógeno; y
- 2) un elemento de respuesta; y
- 60 en el que:
- a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y
- b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado
65 la activación o supresión del gen.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y E es t-butilo.

ES 2 296 370 T3

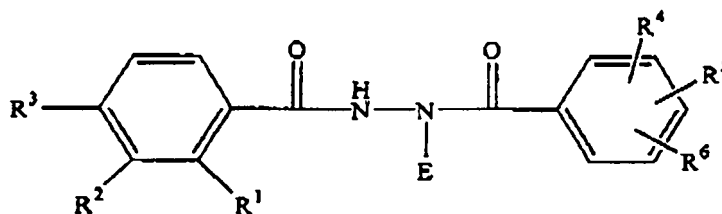
13. Uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el ligando tiene la fórmula especificada y R¹ es Me, Et, i-Pr o F.

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y R² es OH, OMe, OEt, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un anillo etilendioxi o dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico.

15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un anillo etilendioxi o dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico.

16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el ligando tiene la fórmula especificada, y E es t-butilo, R¹ es Et, R² es OEt, R³ es H, y la combinación R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me.

17. Uso de un ligando de la fórmula (I):



en la que:

E es un alquilo (C₄-C₆) que contiene un carbono terciario;

R¹ es H, Me, Et, i-Pr, F, u OMe;

R² es H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, SOMe, o junto con R³ y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R³ es H, Et, o junto con R² y los carbonos fenílicos a los que están unidos R² y R³ forma un etilendioxi, un anillo dihidrofurílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico, o un anillo dihidropirílico con el oxígeno adyacente a un carbono fenílico;

R⁴, R⁵, y R⁶ son independientemente H, Me, Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

con la condición de que:

a) cuando R¹ es Me, y R² es OMe;

entonces R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, o 3,5-di-F;

b) cuando R¹ es Me, y R² es OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me, 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl;

c) cuando R¹ es Et, y R² es OMe u OEt;

entonces R³ es H, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es:

i) 3,5-di-OMe-4-Me, 3,5-di-Cl, 3,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-F, 2,4- o 2,5-di-Cl, 3-OMe, 2-Cl-5-Me, 2-Cl, o 3-Me; o

ii) R⁶ es H, R⁴ es Me, y R⁵ es Et, F, Cl, CH₂OH, CN, OMe, u OEt;

d) cuando R¹ es i-Pr;

entonces R² es OMe, u OEt; R³ es H; y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

e) cuando R³ es Et;

entonces R² es H, R¹ es F, y la combinación de R⁴, R⁵, y R⁶ es 3,5-di-Me;

ES 2 296 370 T3

f) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo etilendioxi;
entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

5 g) cuando R^2 y R^3 , junto con los carbonos fenílicos a los que están unidos, forman un anillo dihidrofurfílico o dihidropirfílico;

entonces R^1 es Et, y la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me; y

10 h) cuando R^2 es Me, Et, n-Pr, i-Pr, Ac, F, Cl, OH, o SOMe;

entonces R^1 es Et, R^3 es H, la combinación de R^4 , R^5 , y R^6 es 3,5-di-Me;

15 en la preparación de un fármaco para modular la expresión de uno o más genes exógenos en un animal, en el que las células del animal contienen:

a) un complejo de receptor de ecdisona, que comprende:

1) un dominio de unión a ADN;

20 2) un dominio de unión para el ligando; y

3) un dominio de transactivación; y

25 b) un constructo de ADN, que comprende:

1) el gen exógeno; y

30 2) un elemento de respuesta; y

en el que:

a) el gen exógeno está bajo el control del elemento de respuesta; y

35 b) la unión del dominio de unión a ADN al elemento de respuesta, en presencia del ligando, da como resultado la activación o supresión del gen.

40

45

50

55

60

65