

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 944**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2012 PCT/EP2012/056481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12136859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2012 E 12714306 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2694652**

54 Título: **Medicamento para la regeneración hepática y para el tratamiento de insuficiencia hepática**

30 Prioridad:

07.04.2011 EP 11161588

07.04.2011 US 201161473015 P

24.05.2011 EP 11167373

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

05.07.2017

73 Titular/es:

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (50.0%)

Inhoffenstrasse 7

38124 Braunschweig, DE y

Medizinische Hochschule Hannover (50.0%)

72 Inventor/es:

ZENDER, LARS y

WÜSTEFELD, TORSTEN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 621 944 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

Medicamento para la regeneración hepática y para el tratamiento de insuficiencia hepática

5 La presente invención se refiere a un compuesto que es un inhibidor de la actividad quinasa de MKK4, MKK4 está codificada por el ARNm de SEQ ID NO: 1204, en donde el compuesto no es genisteína, miricitina o SP600125, para uso como un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece una función hepática deteriorada, para el tratamiento de insuficiencia hepática, incluyendo insuficiencia hepática aguda/fulminante o crónica, y/o para aumentar la regeneración del tejido hepático en un paciente. También se describe en el presente documento el uso del compuesto para aumentar la robustez y regeneración de hepatocitos cultivados in vitro para mejorar terapias celulares, incluyendo el uso de los hepatocitos cultivados como un trasplante, y para trasplante de hepatocitos, respectivamente, en un paciente que padece insuficiencia hepática. En el presente documento se describe además el uso de hepatocitos cultivados in vitro en presencia del compuesto para la producción de un trasplante de hepatocitos.

15 En el presente documento se describe además un hígado bioartificial que comprende hepatocitos cultivados que contienen o se ponen en contacto con el compuesto que se puede usar como un medicamento. Además, la invención se refiere a un proceso para producir hepatocitos que comprende el compuesto usado como un medicamento, y al uso de los hepatocitos cultivados que se ponen en contacto con el medicamento para uso como un medicamento en el tratamiento de un hígado funcionalmente deteriorado, para el tratamiento de insuficiencia hepática, y/o para apoyar regeneración hepática. La insuficiencia hepática que se puede tratar según la invención incluye hepatitis aguda y/o fulminante debido a infección con virus hepatotrópicos, abuso de alcohol, obesidad, enfermedades genéticas como la enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia en alfa 1 antitripsina y afecciones relacionadas. La insuficiencia hepática que se puede tratar según la invención también incluye todas las formas de insuficiencia hepática crónica con cirrosis hepática inducida por, por ejemplo, las causas indicadas anteriormente.

Estado de la técnica

30 Hasta la fecha, la insuficiencia hepática se trata por trasplante de un hígado donante, sin embargo, hay una escasez grave de órganos donantes.

Los documentos WO 98/39352, WO 99/14226 y US 7.569.575 B2 describen el uso y síntesis de ácidos nucleicos bloqueados (ANB).

35 El documento WO 2011/032981 se refiere a un polinucleótido que codifica un "represor de apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas" (ARC) o un fragmento funcional del mismo para uso en tratar o prevenir la insuficiencia hepática o insuficiencia hepática aguda (IHA).

40 El documento WO 2014/112824 se refiere a una composición farmacéutica para estimular la regeneración hepática in vivo incluyendo después de insuficiencia hepática crónica/aguda, que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 90% de identidad de aminoácidos con el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que empieza en el residuo de aminoácido 36 y termina en el residuo de aminoácido 175 de la secuencia SEQ ID NO 1 como se divulga en este documento, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

Kuzu N et al., *Mediators Inflamm.* 2007;2007:36381 divulga una investigación del efecto protector de genisteína en daño hepático agudo experimental inducido por CCl₄.

50 Takamura M et al., *Life Sci.* 2007;80(14):1335-44 describe un estudio que evalúa el papel de la c-Jun-N-terminal quinasa (JNK) durante lesión hepática inducida por D-galactosamina (GalN)/lipopolisacárido (LPS) usando el inhibidor de molécula pequeña específico de JNK SP600125.

Objetos de la invención

55 Es un objeto de la invención proporcionar un medicamento adecuado para el tratamiento de la función hepática insuficiente, por ejemplo, insuficiencia hepática, y proporcionar hepatocitos cultivados, que se pueden mantener en cultivo para uso en un hígado bio-artificial, por ejemplo, para uso en la purificación de sangre o para trasplante en pacientes con función hepática deteriorada.

Descripción general de la invención

60 La invención proporciona un compuesto que inhibe o inactiva la quinasa 4 de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP2K4, también denominada MKK4), como se define adicionalmente en las reivindicaciones. La secuencia de nucleótidos del ARNm que codifica la MKK4 humana según el No. de registro NM_003010 se da como SEQ ID NO: 1204. La inhibición o inactivación de la actividad de MKK4 puede ser por reducción de la expresión de

MKK4, por ejemplo, por interferencia de ARN inducida por ARNip, especialmente ARNhc o microARN que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, o por inhibición de MKK4 presente en un hepatocito, por ejemplo, por un compuesto inhibidor específico de quinasa.

5 La invención se basa en el descubrimiento de que la reducción o delección de MKK4 activa en hepatocitos, que pueden ser tanto hepatocitos cultivados in vitro como hepatocitos de un hígado de un animal o paciente humano, produce regeneración aumentada de hepatocitos, por ejemplo, en periodos de cultivo extendidos y un aumento de la regeneración de un hígado dañado o deteriorado in vivo, por ejemplo, en animales experimentales después de la inducción de una insuficiencia hepática experimental que representa insuficiencia hepática en un paciente humano.
 10 Se ha encontrado que la reducción o delección de MKK4 activa en hepatocitos puede producir una capacidad proliferativa aumentada debido a una entrada más temprana en el ciclo celular y una resistencia aumentada contra apoptosis. En resumen, poner en contacto hepatocitos in vivo con el compuesto que inhibe o inactiva MKK4 produce una supervivencia aumentada de ratones en modelos experimentales de insuficiencia hepática. Además, poner en contacto hepatocitos cultivados in vitro con el compuesto que inhibe o inactiva MKK4 produce periodos de cultivo
 15 extendidos y producción de hepatocitos cultivados, que se pueden usar como un medicamento, por ejemplo, como un trasplante, o que se pueden usar como parte de un dispositivo para la purificación continua de sangre sacada de y devuelta a un paciente.

20 La inactivación o delección de MKK4 se puede obtener previniendo la expresión de MKK4 funcional en células hepáticas, por ejemplo, inactivando el gen endógeno que codifica MKK4, por ejemplo, por mutagénesis insercional del gen endógeno que codifica MKK4, por ejemplo, insertando una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un nucleótido, para la alteración del gen endógeno que codifica MKK4, previniendo la traducción del ARNm que codifica MKK4, o por medios farmacológicos, por ejemplo, poniendo en contacto hepatocitos in vivo o in vitro con un compuesto que inhibe la función quinasa de MKK4.

25 Preferiblemente, la inactivación de MKK4 se obtiene por reducción o prevención de la expresión de MKK4 por administración de un ARN inhibidor mediante interferencia por ARN (iARN), que es, por ejemplo, un oligonucleótido que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, ARN inhibidor que puede ser, por ejemplo, un ARNip, un ARNhc o cualquier forma de ARNhc contenida en un microARN, por ejemplo, un ARNhc basado en microARN, un
 30 oligonucleótido antisentido, o una mezcla de estos. Preferiblemente, el oligonucleótido que hibrida con el ARNm que codifica MKK4 comprende o consiste en 19, 21 o 22 nucleótidos que son complementarios, especialmente en condiciones fisiológicas y celulares, a la secuencia de ARNm que codifica MKK4, y una segunda sección, por ejemplo, una hebra antisentido, que es complementaria en secuencia a la primera sección. De tal molécula de ARNip bicatenaria, en un medio celular, la primera sección se libera de la segunda sección y se une al ARNm que
 35 codifica MKK4 para inducir la degradación de este ARNm o para inducir la inhibición de la traducción. Las moléculas de ARN bicatenarias (ARNip) que después liberan una sección para dirigirse al ARNm se pueden administrar directamente en hígados o células hepáticas, pero también pueden estar contenidas en ARNhc o miARN de las que el ARN bicatenario se libera después por procesamiento enzimático mediante la maquinaria celular de iARN. La secuencia del oligonucleótido que hibrida con el ARNm que codifica MKK4 para inducir su degradación o para
 40 prevenir su traducción puede ser el 100% complementaria en secuencia como habitualmente es el caso con ARNip o ARNhc, pero también puede contener malos emparejamientos como es con frecuencia el caso con miARN endógeno, o se puede dirigir al ARNm de MKK4 siendo solo parcialmente complementaria en secuencia. En la descripción, se dan secuencias de oligonucleótidos ejemplares que hibridan con el ARNm que codifica MKK4, oligonucleótidos que pueden estar contenidos en un ARNip, por ejemplo, como una primera sección, preferiblemente formando una doble hebra con una segunda sección complementaria inversa contenida en el ARNip.

Se ha encontrado que la inactivación de la actividad MKK4, preferiblemente por reducción o inhibición de la expresión de MKK4 por la presencia de un oligonucleótido que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, se puede obtener poniendo en contacto hepatocitos in vivo o in vitro con al menos un oligonucleótido que hibrida
 50 específicamente con el ARNm que codifica MKK4. Poner en contacto en hepatocitos el ARNm que codifica MKK4 se puede obtener administrando a un paciente humano o animal el ARN que hibrida con el ARNm que codifica MKK4 usando iARN mediante ARNip por transfección transitoria in vivo del ARNip, o alternativamente usando, por ejemplo, como un medicamento, cualquier medio de administración estable de ARNip, por ejemplo, ARNhc, especialmente ARNhc basado en microARN u oligonucleótidos antisentido que hibridan con el ARNm que codifica MKK4, por
 55 ejemplo, el uso de una construcción de ácido nucleico vírica o basada en transposón que contiene un casete de expresión que codifica el ARNhc, para la transcripción del ARNhc del casete de expresión. El ARNip, o la construcción de ácido nucleico que contiene un casete de expresión que codifica el ARNip, se usa como un medicamento. La construcción de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un vector vírico o una construcción de ácido nucleico que contiene un transposón que además codifica transposasa para la transducción estable integrativa.
 60

Generalmente, un oligonucleótido que hibrida con el ARNm que codifica MKK4 para reducir o prevenir la expresión de MKK4 en una célula hepática es un oligonucleótido que tiene una secuencia que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, especialmente que hibrida con SEQ ID NO: 1204, en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en el
 65 medio celular de una célula hepática. La secuencia puede ser complementaria por completo, es decir, ser complementaria inversa a una sección del ARNm de SEQ ID NO: 1204, o la secuencia puede tener malos

emparejamientos como con frecuencia ocurre en inhibición de la traducción mediada por microARN, por ejemplo, la secuencia del oligonucleótido tiene una secuencia de nucleótidos de al menos el 80%, preferiblemente de al menos el 85%, más preferiblemente de al menos el 90% o del 95% de identidad a una sección complementaria inversa de SEQ ID NO: 1204.

5 Los oligonucleótidos inhibidores preferidos, por ejemplo, ARNhc, comprenden o consisten en uno o más de los oligonucleótidos: SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 1203. Para el diseño de estas secuencias se usó la herramienta DSIR para diseño de dianas ARNip y ARNhc (BMC Bioinformatics. 30 Nov. 2006; 7(1):520) con un umbral de puntuación de 70, y por tanto todas de SEQ ID NO: 1 a 1203 tienen puntuación de al menos 70. Las secuencias de oligonucleótidos inhibidores, y grupos de secuencias de oligonucleótidos inhibidores que tiene mayores puntuaciones son preferidas. Las secuencias se dan en orden descendente de valor de puntuación, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 tiene la mayor puntuación (107,1) y SEQ ID NO: 1200, SEQ ID NO: 1201, SEQ ID NO: 1202, y SEQ ID NO: 1203 tienen la menor puntuación (70,0 cada una). De SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 11 tienen una puntuación de al menos 100, de SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 55 tienen una puntuación de al menos 95,1, por ejemplo, de 99,8 a 95,1, de SEQ ID NO: 56 a SEQ ID NO: 136 tienen una puntuación de al menos 90,0, por ejemplo, de 94,8 a 90,0, de SEQ ID NO: 137 a SEQ ID NO: 317 tienen una puntuación de al menos 85, por ejemplo, de 89,9 a 85,0, de SEQ ID NO: 318 a SEQ ID NO: 593 tienen una puntuación de al menos 80, por ejemplo, de 84,9 a 80,0, de SEQ ID NO: 594 a SEQ ID NO: 915 tienen una puntuación de al menos 75,0, por ejemplo, de 79,9 a 75,0, y de SEQ ID NO: 916 a SEQ ID NO: 1203 tienen una puntuación entre 74,9 y 70,0. Además, las moléculas de ARNhc o microARN pueden comprender uno de estos oligonucleótidos que son complementarios al ARNm que codifica MKK4, por ejemplo, comprender uno de estos oligonucleótidos como una primera sección y una segunda sección complementaria en el ARNip como secciones que hibridan en un microARN.

25 Los oligonucleótidos que hibridan con el ARNm que codifica MKK4 para uso como un medicamento para la regeneración del tejido hepático, o para el tratamiento de fallo del hígado, insuficiencia hepática, y/o cirrosis hepática, pueden estar preferiblemente en forma de ARN, ADN, o híbridos de ADN y ARN, ácidos nucleicos con enlace peptídico (APN), y derivados de ácidos nucleicos que contienen una fracción ribosa con sustituyentes que unen el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4', por ejemplo, mediante un grupo oximetileno o un grupo aminometileno, derivados que se denominan ácidos nucleicos bloqueados (ANB), incluyendo derivados adicionales del esqueleto fosfato-azúcar, monocatenarios, preferiblemente bicatenarios, que por procesamiento intracelular por la maquinaria enzimática de iARN liberan un oligonucleótido monocatenario para hibridación con el ARNm que codifica MKK4.

35 En la alternativa a consistir en el uso de una secuencia de ácido nucleico que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, por ejemplo, para uso directo como un medicamento, el ARN inhibidor puede estar contenido como una secuencia codificante bajo el control de un promotor en un casete de expresión. Dependiendo del promotor, que puede ser un promotor constitutivo o inducible, tras la introducción en el hepatocito el ARN inhibidor se produce por transcripción.

40 Para la introducción de las construcciones de ácido nucleico que reducen o delecionan la expresión de MKK4 activa, por ejemplo, construcciones de ácido nucleico que interrumpen el gen endógeno que codifica MKK4 de un hepatocito o ARN inhibidor que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, las construcciones de ácido nucleico preferiblemente se proporcionan en forma de uno o más oligonucleótidos en una formulación soporte farmacéuticamente aceptable o en forma de un vector vírico empaquetado en una partícula vírica o partícula similar a virus. Un vector vírico puede ser un vector retrovírico, lentivírico, un vector vírico adenoasociado, o vector adenovírico.

50 Una formulación de los compuestos o composiciones de la invención para inhibir o inactivar MKK4 en un soporte farmacéuticamente aceptable puede estar, por ejemplo, en una formulación de nanopartículas lipídicas (LNP) (por ejemplo, disponible de Alnylam Pharmaceuticals, EE UU), una formulación en liposomas, y/o en una formulación que contiene una combinación con al menos un agente potenciador de la transfección, por ejemplo, lipofectamina y/o como un complejo con calcio.

55 En la alternativa o además de un oligonucleótido que tiene una secuencia que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, por ejemplo, un iARN que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, se pueden usar agentes que inactivan la actividad de MKK4, por ejemplo, agentes que bloquean la función de la proteína MKK4, como compuestos para uso como un medicamento según la invención. Los compuestos correspondientes adecuados para inactivar MKK4 se pueden usar especialmente como medicamentos para el tratamiento de insuficiencia hepática, y para la regeneración de tejido hepático, respectivamente.

60 El análisis histológico de hígados de ratón con expresión reducida estable de MKK4, generados experimentalmente por transfección con una construcción de ácido nucleico que contiene un casete de expresión para ARNhc que hibrida con el ARNm que codifica MKK4 mostró histología normal. Además, no se detectó aumento en neoplasias en los animales experimentales, lo que indica que la deleción de MKK4 no aumenta el riesgo de desarrollo de cáncer.

65 **Descripción detallada de la invención**

La invención se describe ahora en mayor detalle mediante los ejemplos con referencia a las figuras, que muestran en

- 5 la figura 1 representaciones esquemáticas de construcciones de ácidos nucleicos para producir ARN inhibidor,
- la figura 2 una representación esquemática de una transferencia intrahepática mediada por transposasa de un casete de expresión que codifica un ARN inhibidor (ARNhc basado en microARN) de la invención,
- 10 la figura 3 la evolución temporal del peso corporal de ratones después de la transferencia intrahepática mediada por transposón estable de un casete de expresión para ARN inhibidor y controles mientras que un aumento en el peso corporal se correlaciona con un aumento en la repoblación hepática con la construcción,
- 15 la figura 4 imágenes de GFP de hígados de ratón explantados en el proceso de repoblación por hepatocitos que expresan establemente ARNhc específico para inactivar MKK4,
- la figura 5 una inmunotransferencia específica para MKK4 de muestras de hígado de ratones transfectados establemente con un casete de expresión que codifica ARNhc específico para inactivar MKK4,
- 20 la figura 6 análisis de inmunofluorescencia de los hígados de ratones transfectados establemente con un casete de expresión que codifica ARNhc específico para inactivar MKK4,
- la figura 7 una inmunotransferencia para ciclina A y E de extractos nucleares de hígado de hígados de ratones transfectados en la evolución temporal indicada después de hepatectomía parcial que indica entrada más temprana en el ciclo celular de los hepatocitos que expresan establemente ARNhc específico para MKK4,
- 25 la figura 8 una tinción de Ki67 de hígados de ratón que expresan ARNhc específico para MKK4 o ARNhc control en los puntos de tiempo indicados después de la hepatectomía parcial,
- 30 la figura 9 un gráfico de cuantificación de los hepatocitos positivos para Ki67 representados en la figura 8,
- la figura 10 tinción TUNEL (panel superior) y con H&E (panel inferior) en secciones de hígado después de la inducción de insuficiencia hepática aguda/fulminante en hepatocitos transfectados con ARNhc control en comparación con hepatocitos que expresan un ARNhc específico para el ARN de MKK4, que están protegidos,
- 35 la figura 11 un gráfico de cuantificación de hepatocitos apoptóticos según la tinción TUNEL como se representa en la figura 10,
- la figura 12 una curva de supervivencia de ratones que expresan el ARNhc que inactiva MKK4 (shMKK4) comparados con ratones control (shCtr) después de inducción de insuficiencia hepática,
- 40 la figura 13 un gráfico de cuantificación de la incorporación de EdU en hepatocitos murinos cultivados con actividad MKK4 inactivada (FAHIG-shMKK4) y hepatocitos control (FAHIG-shCtr) con un recuadro que muestra micrografías de contraste de fase de estos hepatocitos,
- 45 la figura 14 micrografías de contraste de fase de hepatocitos cultivados con MKK4 inactivada (shMKK4) el día 29 (d29) y de hepatocitos control (shCtr) el día 12 (d12), y el día 3 de hepatocitos replaqueados el día 15 (replaqueado),
- la figura 15 una curva de supervivencia de ratones FAH $-/-$ después de trasplante de hepatocitos mantenidos una semana en cultivo que expresan ARNhc que inactiva específicamente MKK4 o un ARNhc control,
- 50 la figura 16 fotografías, imagen de GFP, inmunotinción de α -FAH y tinción de H&E de hígado de ratones envejecidos durante 1 año después del trasplante de hepatocitos que expresan establemente ARNhc que inactiva específicamente MKK4, y en
- 55 la figura 17 una visión global del efecto inhibitorio de compuestos inhibidores pequeños preferidos y del compuesto de referencia genisteína.
- Usando ratones y tejido hepático y hepatocitos murinos como ejemplos, especialmente representando pacientes humanos y tejido hepático humano y hepatocitos humanos, respectivamente, se encontró que la regeneración del hígado se podría aumentar inactivando la actividad MKK4, tanto in vivo como en hepatocitos cultivados. Los ratones que tienen hígados con actividad MKK4 reducida muestran capacidad regenerativa aumentada en condiciones de insuficiencia hepática, que también produjo una supervivencia aumentada. La inactivación de la actividad MKK4 se pudo alcanzar eficazmente mediante ARN inhibidor presente en hepatocitos, in vivo e in vitro, ARN inhibidor que se pudo generar por transcripción de una construcción de ácido nucleico transfectada de forma estable o transitoria que
- 60
- 65

contiene un casete de expresión que codifica al menos un ARN que en condiciones fisiológicas hibrida con el ARNm de MKK4.

Alternativamente, el ARN inhibidor se podría introducir, por ejemplo, transfectar en hepatocitos in vivo y en cultivo, por ejemplo, en forma de un ARNip, ARNhc o microARN, preferiblemente en una formulación adecuada, por ejemplo, formulado como una preparación en liposomas o una preparación de nanopartículas lipídicas. En la alternativa al uso del ARN inhibidor para uso como un medicamento para el tratamiento del hígado y hepatocitos, 3-(dimetilamino)-N-[3-[(4-hidroxibenzoil)-amino]-4-metilfenil]benzamida (ZM 336372), 2-hidroxil-1-metil-4-oxo-N-piridin-4-ilquinolina-3-carboxamida (BAS00525963), 2-(1H-indazol-5-iliminometil)-6-nitrofenolato (BAS00697444), 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-7-oxo-N-fenil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida (SYN22174524), 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-3-(4-fluorofenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona (SYN22174787), 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-3-(4-metilfenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona (SYN22175977), 3-(4-clorofenil)-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(metoximetil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona (SYN22176267), -[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(metoximetil)-3-(4-metilfenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona (SYN22176367), 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(3-metoxifenil)-3-metil-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol (SYN22176842), 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(2-metoxifenil)-3-metil-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol (SYN22176990), 3-(4-clorofenil)-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-metil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona (SYN22177890), 5-amino-3-[(Z)-1-ciano-2-[3-[(4-metoxi-6-piperidin-1-il-1,3,5-triazin-2-il)oxifenil]jetenil]-1-(2-hidroxi)etil]pirazol-4-carbonitrilo (BAS00896568), 2-(1H-indazol-5-iliminometil)-6-metoxi-4-nitrofenolato (BAS00697462), ácido 7-oxobenzo[e]perimidina-4-carboxílico (BAS00368055), los compuestos adicionales contenidos en la tabla 1 dada en el presente documento, y combinaciones de los mismos se podrían usar como medicamentos, cuya presencia inactivaría la actividad MKK4 al menos parcialmente, también produciendo un aumento de la proliferación de hepatocitos, protección contra apoptosis inducida, y restauración de la función hepática. Estos compuestos que tienen actividad inhibidora específica contra MKK4 también se denominan colectivamente compuestos inhibidores pequeños. Según esto, tanto los ARN inhibidores que tienen especificidad por el ARN que codifica MKK4 como los compuestos inhibidores pequeños que tienen especificidad por la proteína MKK4 inhiben cada uno MKK4 y, por tanto, se usan como medicamentos en el tratamiento de insuficiencia hepática y/o para la protección de hepatocitos contra apoptosis y/o para la regeneración de hepatocitos. Los compuestos inhibidores pequeños se pueden formular en una formulación farmacéuticamente aceptable, que comprende, por ejemplo, sustancia reguladora y sustancia soporte, así como aditivos de formulación como conoce el farmacéutico, por ejemplo, para administración i.v., i.m., intra-hepática o administración oral.

Durante el ensayo in vitro funcional de hepatocitos que contienen construcciones de ácidos nucleicos con expresión estable de FAH, GFP y ARNhc, se aislaron hepatocitos de hígados de ratones y se cultivaron. Se encontró que solo los hepatocitos que se transfectaron con un casete de expresión que codifica un ARN inhibidor que se dirige, es decir, hibrida específicamente con el ARNm que codifica MKK4 se pudieron cultivar durante periodos extendidos de tiempo, por ejemplo, durante más de 30 días. Además, estos hepatocitos se pudieron tripsinizar y replaquear según métodos estándar.

El trasplante de hepatocitos primarios que expresan el ARNhc contra MKK4 después de 1 semana en cultivo en ratones deficientes en FAH mostró la capacidad de los hepatocitos en los que MKK4 se inactivó para repoblar el hígado de estos ratones y permitir la supervivencia. En contraste, este resultado no se pudo obtener por hepatocitos primarios que expresan el ARNhc control no específico. Este resultado también indica que los hepatocitos primarios que expresan el ARNhc contra MKK4 no experimentan desdiferenciación principal durante el tiempo de cultivo.

Ejemplo 1: Inactivación de MKK4 por transcripción de ARN inhibidor de un casete de expresión integrado en el tejido hepático

La introducción de ARN inhibidor en hepatocitos, es decir, en el hígado de un paciente, para inactivar MKK4 in vivo por expresión del ARN inhibidor de una construcción de ácido nucleico que codifica el ARN inhibidor en un casete de expresión se muestra en el ejemplo de ratones (C57BL/6) usando un casete de expresión que codifica el ARN inhibidor para la producción del ARNhc que hibrida con el ARNm que codifica MKK4. El promotor que controla la transcripción del ARN inhibidor era constitutivo.

Brevemente, se mantuvieron ratones homocigotos negativos para FAH (FAH -/-) con administración constante de NTCB para bloquear la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa que de otra manera produciría la acumulación de metabolitos tóxicos en el hígado. Como ARN inhibidor, se usó SEQ ID NO: 1 o, alternativamente, SEQ ID NO: 2, ambos de los cuales hibridan con el ARNm que codifica MKK4. Cada ARN inhibidor se introdujo poniendo en contacto las células hepáticas in vivo con construcciones de ácido nucleico con secciones repetidas invertidas (IR) específicas de transposasa en ambos extremos, que contienen un casete de expresión para FAH para complementar el genotipo FAH -/- tras la expresión, por inyección hidrodinámica en la vena de la cola en combinación con una segunda construcción de ácido nucleico que codifica la transposasa sleeping beauty 13 (SB13) bajo el control de del promotor PGK.

Las construcciones de ácidos nucleicos se muestran en la figura 1. La figura 2 muestra esquemáticamente los pasos de la manipulación genética. Una primera construcción control p/T-FAHIG contiene el casete de expresión que complementa a FAH y un casete de expresión de proteína fluorescente verde (GFP) que comprende la secuencia

codificante de GFP bajo el control de un elemento IRES, pero no codifica ARN inhibidor. Una secuencia que codifica un ARN inhibidor sin dianas como control, que además del casete de expresión de GFP en 3' respecto a la secuencia codificante de GFP codifica un microARN estaba contenido en la construcción p/T-FAHIG-shCtr. Una secuencia que codifica un ARN inhibidor según la invención estaba contenida en la construcción p/T-FAHIS-shMKK4, que además del casete de expresión de GFP en 3' respecto a la secuencia codificante de GFP codifica un microARN (representado como un bucle) que comprende un ARNhc como ejemplo de un ARN inhibidor. En el ejemplo, se usó SEQ ID NO: 1, alternativamente SEQ ID NO:2 como un representante preferido de secuencias inhibidoras de ARN. Después de la introducción de las construcciones de ácido nucleico, los ratones se mantuvieron en ausencia de NTBC para seleccionar animales que tienen hepatocitos complementados. En células cotransfectadas, la expresión transitoria de SB13 produce la integración estable del casete de expresión en el genoma.

Los análisis de los ratones después de la introducción de las construcciones de ácidos nucleicos confirmaron la transcripción estable del ARN inhibidor de la construcción de ácido nucleico. En detalle, el análisis del peso corporal de los ratones de la figura 3 muestra que los animales que habían recibido la construcción control p/T-FAHIG (5), así como los animales que habían recibido la construcción control p/T-FAHIG-shCtr (1), que expresa un ARN no específico no pudieron reconstituir la función hepática de manera eficaz, sino que murieron.

Los animales de esos grupos que habían recibido una construcción de ácido nucleico que contenía un casete de expresión para un ARN inhibidor que es específico para SEQ ID NO: 1, es decir, p/T-FAHIG-shMKK4.A (2, 4) y p/T-FAHIG-shMKK4.B (3) pudieron reconstituir la función hepática, como se muestra por la supervivencia y restablecimiento de los pesos corporales.

Este resultado está apoyado además por la figura 4 que muestra hígados explantados el día 20 después de la administración de la construcción de ácido nucleico, donde los hígados están en el proceso de repoblación por hepatocitos que se cotransfectaron in vivo con una construcción de ácido nucleico que contenía un casete de expresión para FAH y GFP e incluía un casete de expresión para ARN inhibidor específico para el ARNm que codifica MKK4 (p/T-FAHIG-shMKK4, ambas imágenes a mano izquierda), o que incluía un casete de expresión que codifica un ARN no específico (p/T-FAHIG-shCtr, ambas imágenes a mano derecha). Los hígados explantados de la figura 4 muestran un aumento más rápido de fluorescencia de GFP a lo largo del tiempo in vivo de animales cotransfectados con la construcción de ácido nucleico que incluye el casete de expresión que codifica un ARN inhibidor específico para el ARNm que codifica MKK4 comparado con animales cotransfectados con la construcción de ácido nucleico que incluye el casete de expresión que codifica un ARN inhibidor sin diana.

El resultado de fluorescencia se confirma en este caso en hígados de ratón completamente repoblados por la tinción inmunoespecífica para MKK4 en la inmunofluorescencia mostrada en la figura 5 y por los análisis de inmunofluorescencia para la expresión de MKK4 en muestras de tejidos de hígados de ratón explantados que se muestran en la figura 6.

En la figura 5, shMKK4-224 indica extractos de proteína de hígados de ratón repoblados con un casete de expresión que codifica un ARN inhibidor contra MKK4 y shMKK4-3553 indica extractos de proteína de hígados de ratón repoblados con un casete de expresión que codifica un ARN inhibidor independiente contra MKK4; tubulina sirvió como control de carga y se detectó por un anticuerpo específico (α -tub), MKK4 se detectó por un anticuerpo anti-MKK4 (α -MKK4). En la figura 6, FAHIG-shCtr indica una construcción de ácido nucleico que contiene el casete de expresión para complementar FAH y para GFP, que incluye un ARN inhibidor no específico (shCtr). shMKK4-A y shMKK4-B indican construcciones de ácido nucleico que contienen casetes de expresión para ARNhc que específicamente hibridan con el ARNm de MKK4.

Ambos análisis muestran que solo la construcción de ácido nucleico que incluye un casete de expresión que codifica un ARN inhibidor para el ARNm que codifica MKK4 produce una disminución de la expresión de MKK4 en hepatocitos.

La figura 7 muestra inmunotransferencias para ciclina A y E de extractos nucleares de los hígados de ratón puestos en contacto con la construcción de ácido nucleico que expresa el ARNhc que hibrida con el ARNm de MKK4 (shMKK4, +) y que expresa el ARNhc no específico (shCtr, +), respectivamente, a 0, 24 h, 38 h, y 48 h después de hepatectomía parcial, detectadas con anticuerpo α -ciclina A (α -Cic.A) y anticuerpo α -ciclina B (α -Cic.B). Este análisis muestra que la inactivación de MKK4, que se obtiene, por ejemplo, por la expresión de un ARN inhibidor que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, produce una entrada más temprana del ciclo celular después de hepatectomía parcial.

La figura 8 muestra una tinción de Ki67 de hígados de los animales experimentales que habían recibido la construcción de ácido nucleico que expresa el ARN inhibidor específico para el ARNm de MKK4 (shMKK4) y de animales que habían recibido la construcción que expresa el ARNhc no específico (shCtr), respectivamente a las 0 h, 38 h y 48 h después de hepatectomía parcial. Los análisis muestran que la inactivación de MKK4, que en el ejemplo se obtiene por presencia del ARNhc que es específico para el ARNm de MKK4 y se expresa de la

construcción del ácido nucleico introducido en los hepatocitos produce un aumento de la proliferación de hepatocitos in vivo.

5 La figura 9 muestra una cuantificación de las células positivas para Ki67 del análisis de la figura 8. El aumento en la proliferación de hepatocitos para los hepatocitos que contiene el ARNhc que inhibe la expresión de MKK4 (p/t-FAHIG-shMKK4) es significativa en comparación al ARNhc no específico control (p/t-FAHIG-shCtr).

10 La figura 10 muestra tinción TUNEL para la identificación de células apoptóticas en tejido hepático de ratones transfectados con una construcción de ácido nucleico que se integra que contiene un casete de expresión para ARNhc no específico (shCtr) o un casete de expresión para ARNhc que hibrida específicamente con el ARNm de MKK4 (shMKK4.224 o shMKK4.355, cada uno expresa un ARNip específico de ratón que hibrida con el ARN de MKK4). La apoptosis se indujo in vivo 9 h antes del análisis experimentalmente por inyección de anticuerpo Jo2, que interacciona con CD95 para inducir insuficiencia hepática fulminante. La tinción TUNEL revela menos hepatocitos apoptóticos en el tejido hepático que expresa el ARNhc específico de MKK4 (shMKK4.224 o shMKK4.355) que en controles (shCtr). La fila superior de imágenes muestra micrografías de fluorescencia de análisis TUNEL, la fila inferior muestra micrografías de campo claro de muestras de tejidos teñidas con H&E.

20 La cuantificación del análisis TUNEL después de la inducción de la insuficiencia hepática se muestra en la figura 11, que demuestra un número significativamente menor de hepatocitos apoptóticos en esos tejidos hepáticos que contienen el ARNhc (shMKK4.224 y shMKK4.3553) que hibrida con el ARNm de MKK4 cuando se comparan al control con ARNhc no específico (shCtr).

25 La figura 12 muestra la tasa de supervivencia según Kaplan Meier de ratones transfectados con la construcción de ácido nucleico que expresa en ARNhc que hibrida con el ARNm de MKK4 (shMKK4.224 y shMKK4.3553) y ratones control (shCtr) después de la inducción experimental de insuficiencia hepática. El resultado demuestra que la inactivación de MKK4, inactivación que en el ejemplo se obtiene por la expresión de un ARN inhibidor (ARNhc) de un casete de expresión de una construcción de ácido nucleico, protege de forma eficaz hepatocitos in vivo contra apoptosis.

30 Ejemplo 2: Inhibición de MKK4 in vivo por transcripción de un ARN inhibidor de un casete de expresión que codifica ARNhc

35 Para la transfección transitoria de hepatocitos, una construcción de ácido nucleico que contiene o consiste en un casete de expresión que codifica un ARN inhibidor que específicamente hibrida con el ARNm que codifica MKK4, por ejemplo, que contiene SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 (que son ambos específicos para el ARNm humano y de ratón de MKK4) se introdujo transitoriamente en hepatocitos. Para la transfección transitoria in vivo, la construcción de ácido nucleico se formuló en liposomas y se administró a los animales experimentales. La formulación de liposomas contenía los lípidos 3-N-[(qmetoxipoli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristiloxi-propilamina (PEG-C-DMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) y colesterol, en una proporción 2:40:10:48 por ciento molar.

45 El efecto de aumentar la proliferación de hepatocitos, protección contra la inducción de apoptosis se pudo mostrar como se explica para la expresión estable del ARNhc en el ejemplo 1, lo que indica que el efecto estaba limitado al periodo en el que el ARNhc estaba presente en los hepatocitos usando los métodos analíticos descritos en el ejemplo 1. Esto muestra que la actividad MKK4 se puede inhibir o inactivar de forma eficaz por expresión transitoria de ARN inhibidor, por ejemplo, ARNhc o microARN, de un casete de expresión de una construcción de ácido nucleico que no se integra en el hepatocito.

50 Ejemplo 3: Inhibición de MKK4 in vivo por ARN inhibidor transfectado en hepatocitos

55 La idoneidad del ARN inhibidor para uso como un medicamento se pudo mostrar transfectando el ARN inhibidor que específicamente hibrida con el ARNm de MKK4 en tejido hepático in vivo. El ARN inhibidor podría ser ARNhc o microARN, preferiblemente formulado como liposomas o nanopartículas lipídicas. Generalmente, la reducción o eliminación de MKK4 se podría obtener en al menos una fracción del tejido hepático por la formulación del ARN inhibidor usando los métodos analíticos descritos en el ejemplo 1. Esto muestra que se puede usar ARN inhibidor específico para el ARNm de MKK4 como un medicamento, especialmente para el tratamiento de función hepática deteriorada.

60 Ejemplo 4: Inhibición de MKK4 in vivo por SP600125 (referencia), miricitina (referencia) o genisteína (referencia) en hepatocitos

65 En la alternativa a la inhibición de la actividad MKK4 en un tejido hepático por el ARN inhibidor, se usaron SP600125 (referencia) miricitina (referencia) o genisteína (referencia) para inactivar MKK4 en el hígado. Generalmente, SP600125, miricitina o genisteína se administraron a ratones a una dosis eficaz para la inactivación in vivo de MKK4. Preferiblemente, la dosis era eficaz para inactivar al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90% o el 95% de la actividad MKK4 media in vivo.

Se pudo encontrar que la inactivación de MKK4 en el hígado por administración de SP600125, miricitina o genisteína como medicamento produjo un aumento significativo en la regeneración hepática, un aumento en proliferación, y en protección contra apoptosis inducida usando los métodos analíticos descritos en el ejemplo 1.

5 Ejemplo 5: Inhibición de MKK4 en hepatocitos primarios cultivados in vitro por transcripción estable o transitoria de ARN inhibidor de un casete de expresión que codifica ARNhc

10 Para la transfección in vitro, hepatocitos primarios cultivados obtenidos de animales experimentales se pusieron en contacto con la construcción de ácido nucleico como se describe en el ejemplo 1 o 2. En general, la construcción de ácido nucleico se podría formular como liposomas según el ejemplo 2. En general, la expresión estable o transitoria del ARN inhibidor se podría obtener en los hepatocitos cultivados, y la reducción o eliminación de MKK4 se podría detectar usando los métodos analíticos descritos en el ejemplo 1.

15 Para fines experimentales, en la alternativa a la transfección in vivo de hepatocitos primarios que se originan de un animal experimental, hepatocitos establemente transfectados que expresan ARNhc específico para el ARNm de MKK4 se aislaron de ratones experimentales generados según el ejemplo 1. El análisis de los hepatocitos cultivados fue por cuantificación de la incorporación de EdU por hepatocitos primarios por citometría de flujo. El resultado de hepatocitos transfectados cultivados después de 3 días de cultivo se muestra en la figura 13. Las micrografías de contraste de fase del recuadro y la relación de hepatocitos que contiene ARNhc específico para el ARNm de MKK4, generado por expresión del casete de expresión transfectado, muestran que los hepatocitos cultivados con MKK4 inactivada (FAHIG-shMKK4) muestran una incorporación de EdU drásticamente mejorada como marcador para proliferación sobre los controles (FAHIG-shCtr) sin inhibición de la actividad MKK4 en cultivo.

25 El replaqueo de los hepatocitos cultivados en medio de cultivo nuevo muestra la supervivencia a largo plazo aumentada de hepatocitos cultivados en los que la actividad MKK4 está esencialmente inhibida, por ejemplo, por la presencia de ARN inhibidor (shMKK4) que hibrida específicamente con el ARNm de MKK4, como se muestra en las micrografías de la figura 14. Los hepatocitos con MKK4 inactivada (shMKK4) se pueden cultivar de forma eficaz al menos hasta el día 29 (d29), y se pueden cultivar tripsinizando y replaqueando a medio nuevo el día 15; las micrografías a mano derecha muestran el día 3 de células replaqueadas después de 15 días del cultivo inicial. En contraste, las células transfectadas con un ARNhc no específico (shCtr) muestran una supervivencia a largo plazo menor en cultivo y ningún crecimiento tras replaquear después de 15 días del cultivo inicial.

35 Estos resultados muestran que la inactivación de la actividad MKK4 aumenta drásticamente la supervivencia a largo plazo y eficiencia de replaqueo de hepatocitos cultivados.

En general, se usó el medio de Eagle generalmente conocido para los cultivos de hepatocitos.

40 Ejemplo 6: Hepatocitos cultivados con actividad MKK4 inactivada para uso como medicamento para regeneración hepática

45 Se cultivaron hepatocitos de un ratón que representa un paciente que tiene un grupo sanguíneo compatible o idéntico, preferiblemente hepatocitos que eran inmunológicamente compatibles con un receptor posterior, por ejemplo, un paciente, preferiblemente hepatocitos autólogos. La actividad MKK4 se inhibió como se describe en los ejemplos anteriores, preferiblemente por transfección de hepatocitos cultivados con una construcción de ácido nucleico que contiene un casete de expresión para un ARN inhibidor que hibrida con el ARNm que codifica MKK4, por transfección con un ARN inhibidor, preferiblemente de forma repetida, o poniendo en contacto con SP600125 (referencia), miricitina (referencia) o genisteína (referencia).

50 Hepatocitos de ratón cultivados que se transfectaron establemente con una construcción de ácido nucleico que expresa FAH complementario y GFP (FAHIG) y un ARN inhibidor específico para el ARNm que codifica MKK4 o un ARNhc no específico (Ctrl), respectivamente, se recogieron por tripsinización. Estos hepatocitos se resuspendieron en un soporte farmacéuticamente aceptable y se trasplantaron en el bazo o hígado de ratones FAH $-/-$, que posteriormente se mantuvieron sin NTBC. El análisis por Kaplan Meier de supervivencia después del trasplante intraesplénico de los hepatocitos cultivados se muestra en la figura 15. En comparación a ratones que habían recibido hepatocitos que contenían el ARNhc no específico (ARNhc.Ctrl) que mueren el día 37-38 (línea vertical), los ratones que habían recibido hepatocitos que contienen ARNhc de MKK4 específico para el ARNm de MKK4 por expresión del casete de expresión que codifica el ARNhc tienen una supervivencia drásticamente aumentada.

60 Los ratones FAH $-/-$ experimentales que habían repoblado hígados con hepatocitos con un casete de expresión para GFP, incluyendo el ARNhc específico para el ARNm que codifica MKK4 (ARNhc.MKK4) se mantuvieron durante 12 meses después de la repoblación. Los análisis de hígados explantados en fotografía de campo claro (Claro), con imagen de GFP (GFP) (imágenes a mano izquierda de la figura 16) e inmunofluorescencia anti-FAH y tinción con H&E de secciones de hígado (imágenes a mano derecha de la figura 16) no muestra desarrollo tumoral con expresión intrahepática estable de GFP y del ARNhc que inactiva específicamente MKK4. Estos datos enfatizan que la inhibición de MKK4 se puede usar para aumentar la regeneración sin desencadenar crecimiento tumoral.

Ejemplo 7: Hepatocitos cultivados con actividad MKK4 inactivada para uso como dispositivo para purificación de sangre extracorpórea (referencia)

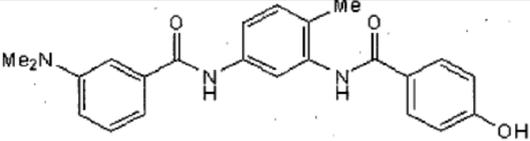
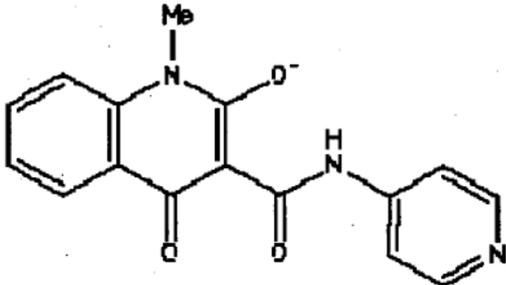
5 Se hicieron crecer hepatocitos cultivados como se ha descrito anteriormente, preferiblemente cultivando hepatocitos primarios que se transfectaron establemente con una construcción de ácido nucleico que expresa un ARNhc específico para el ARNm de MKK4, en un sustrato soporte, por ejemplo, un soporte polímero. Los hepatocitos cultivados que se adhieren al sustrato soporte se dispusieron en un envase que se perfundió con sangre sacada de un paciente, ejemplificado por un ratón o rata. La sangre que sale del envase se podría devolver inmediatamente al paciente. En experimentos iniciales, se pudo mostrar que los hepatocitos que se manipulan genéticamente para expresar establemente un ARNhc que inactiva el ARNm que codifica MKK4 son estables cuando se hacen crecer sobre un sustrato soporte, y que estos hepatocitos cultivados se podrían usar como un dispositivo de purificación de sangre.

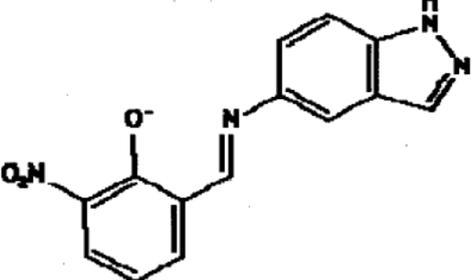
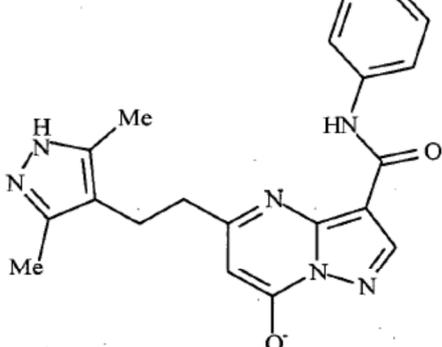
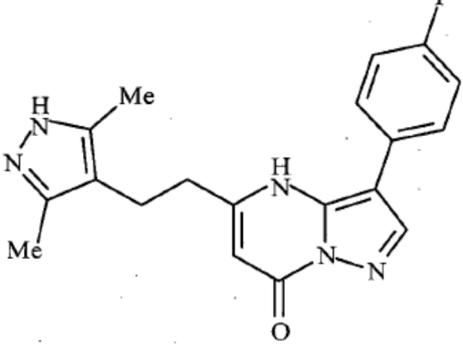
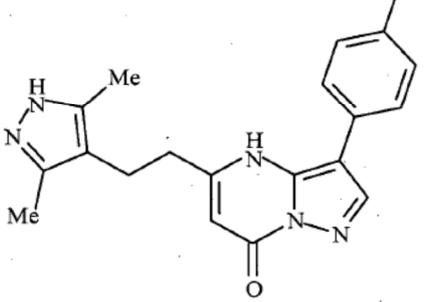
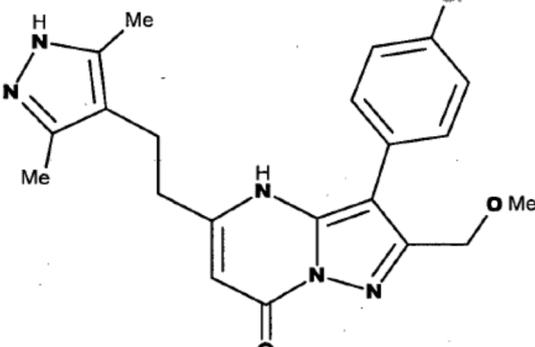
15 Ejemplo 8: Inactivación de MKK4 en análisis in vitro

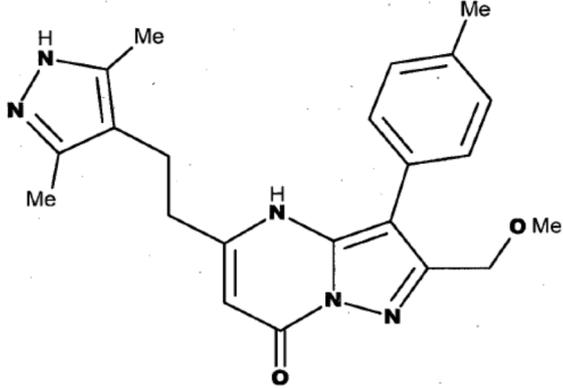
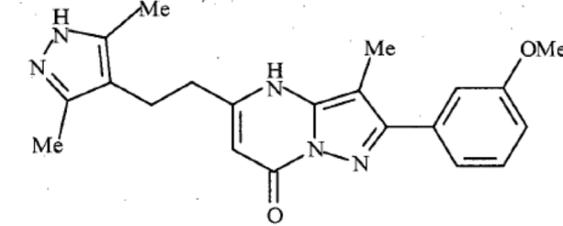
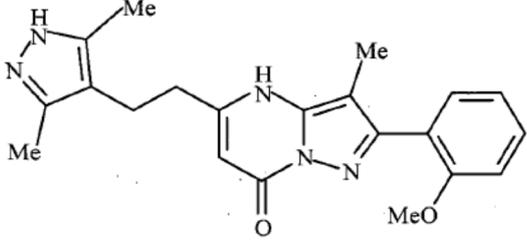
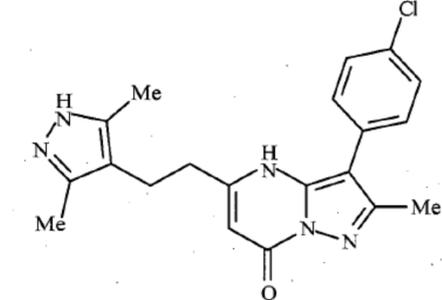
Se analizó el efecto inhibitor de compuestos contra MKK4 en un ensayo in vitro usando proteína MKK4 purificada, por ejemplo, obtenida de una línea celular que se manipuló genéticamente para sobreexpresar MKK4 de un casete de expresión que contenía la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1204 como una secuencia codificante y purificación de afinidad usando, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra la proteína MKK4.

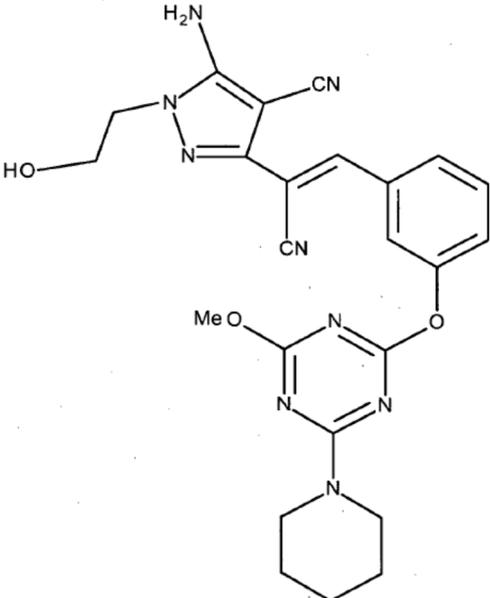
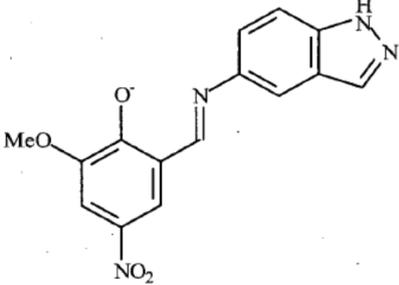
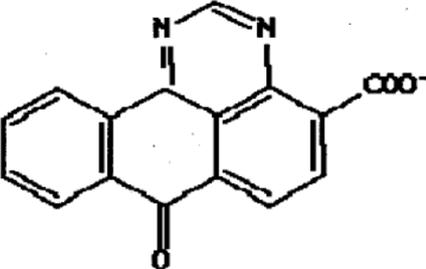
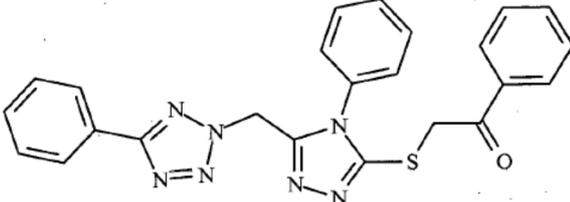
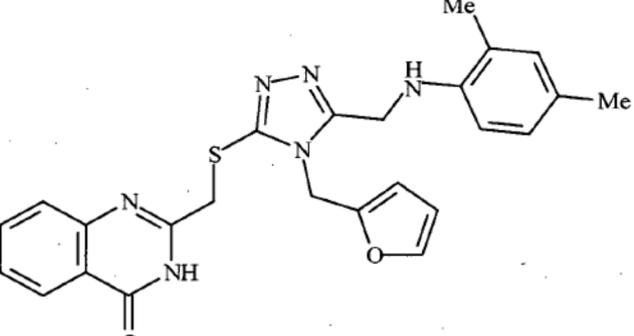
En el ensayo, la proteína MKK4 activa purificada se incubó con su sustrato JNK1a1 y gATP marcado con ³²P (5 µCi, aprox. 10 µM), sin compuesto activo adicional, con el compuesto inhibidor pequeño, o con genisteína como control positivo. Para el ensayo, se usó tampón de ensayo quinasa (HEPES 20 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; BSA 1 mg/ml; Na₃VO₄ 1 mM; DTT 1 mM). Se detectó un efecto inhibitor del compuesto inhibidor pequeño (concentración final 50 µM) como una reducción de la actividad de fosforilación de la proteína MKK4 en su sustrato JNK1a1 midiendo la cantidad de fosfato radioactivo (³²P) en JNK1a1. La fosforilación de JNK1a1 se midió en presencia de 2 ml de coctel de centelleo por muestra usando un contador de centelleo (Wallac, Contador de centelleo líquido). En este ensayo, genisteína dio una inhibición hasta aprox. el 80% de la actividad comparado con el ensayo sin compuesto activo adicional.

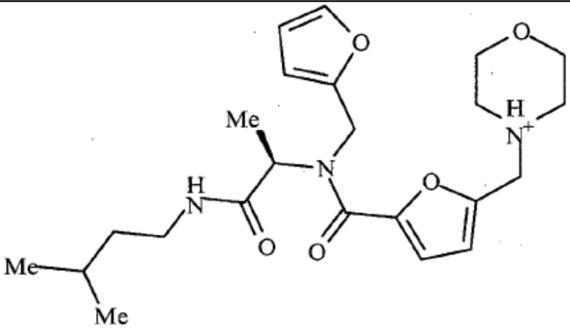
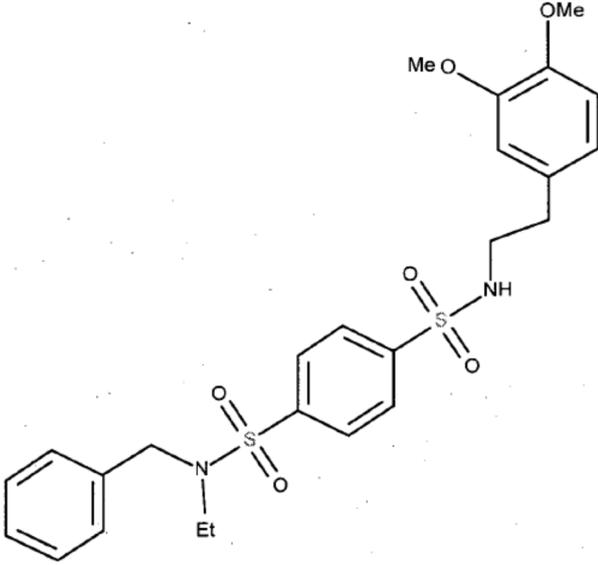
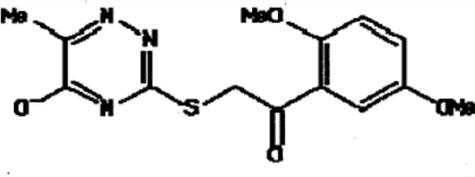
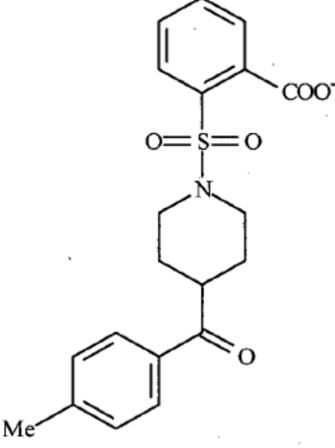
Tabla 1: Compuestos inhibidores pequeños ensayados para actividad inhibitora contra MKK4

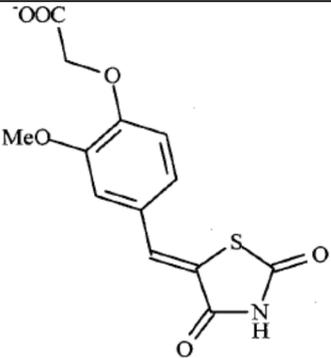
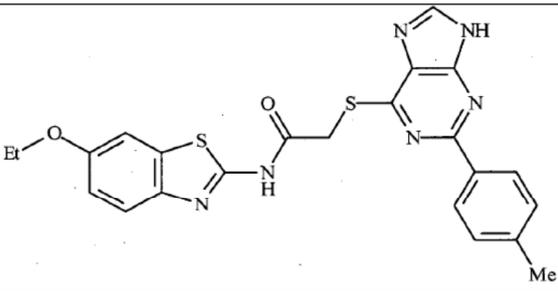
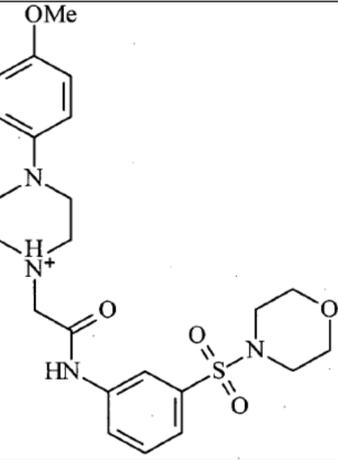
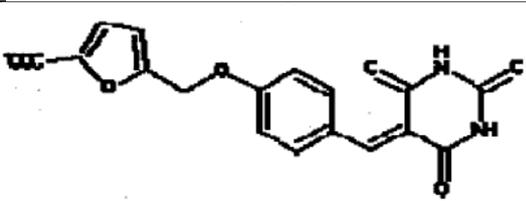
Nombre	Estructura	Inhibición, actividad relativa de MKK4 comparada al control (sin compuesto adicional) (%)
ZM 336372; 3-(dimetilamino)-N-[3-[(4-hidroxibenzoil)-amino]-4-metilfenil]benzamida		54,2
BAS00525963; 2-hidroxi-1-metil-4-oxo-N-piridin-4-ilquinolina-3-carboxamida		72,6

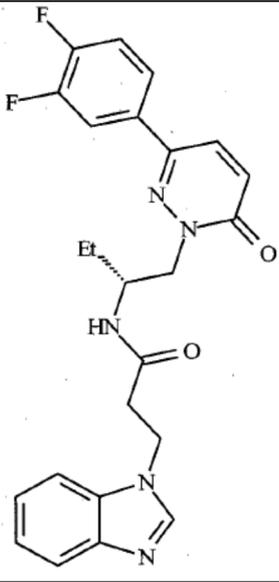
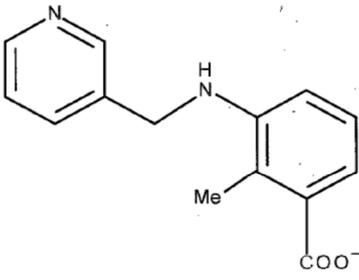
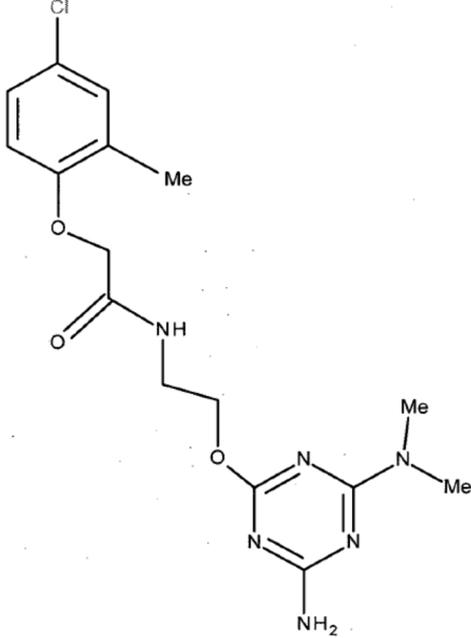
<p>BAS00697444; 2-(1H-indazol-5-iliminometil)- 6-nitrofenolato</p>		<p>79,0</p>
<p>SYN22174524; 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-7-oxo-N-fenil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida</p>		<p>47,8</p>
<p>SYN22174787; 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-3-(4-fluorofenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>		<p>41,5</p>
<p>SYN22175977; 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-3-(4-metilfenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>		<p>55,5</p>
<p>SYN22176267; 3-(4-clorofenil)-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(metoximetil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>		<p>59,1</p>

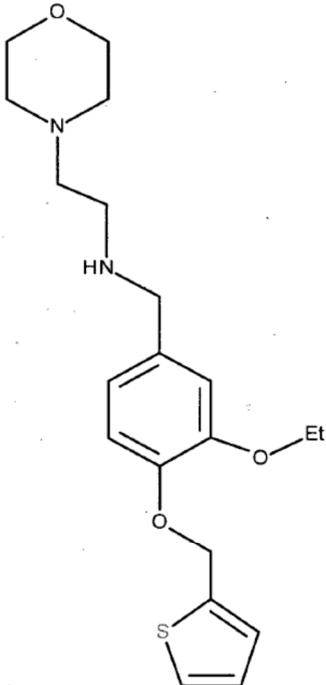
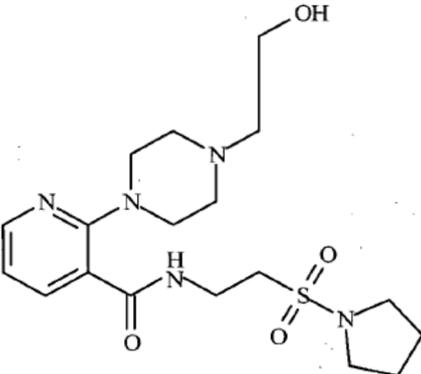
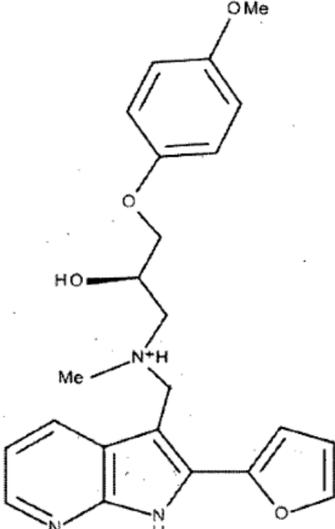
<p>SYN22176367; 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(metoximetil)-3-(4-metilfenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>		<p>49,9</p>
<p>SYN22176842; 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(3-metoxifenil)-3-metil-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>		<p>54,9</p>
<p>SYN22176990; 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(2-metoxifenil)-3-metil-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>		<p>58,2</p>
<p>SYN22177890; 3-(4-clorofenil-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-metil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>		<p>56,3</p>

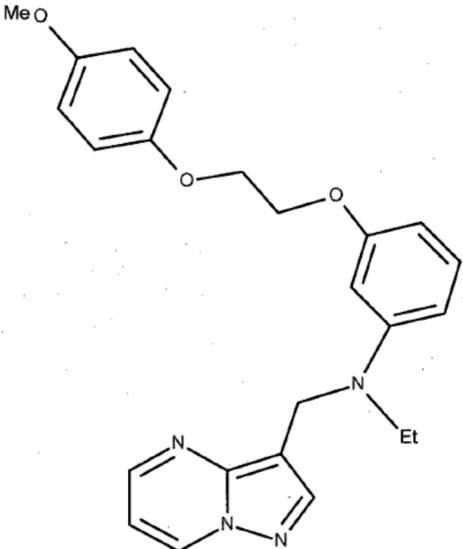
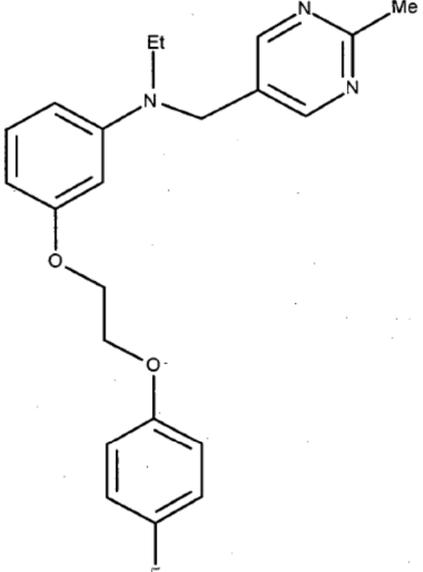
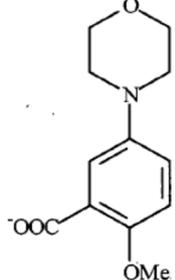
<p>BAS00896568; 5-amino-3-[(Z)-1-ciano-2-[3- [(4-metoxi-6-piperidin-1-il- 1,3,5-triazin-2- il)oxifenil]etenil]-1-(2- hidroxietil)pirazol-4- carbonitrilo</p>		58,4
<p>BAS00697462; 2-(1H-indazol-5-iliminometil)- 6-metoxi-4-nitrofenolato</p>		71,1
<p>BAS00368055; ácido 7-oxobenzo[e]- perimidina-4-carboxílico</p>		66,2
<p>Nombre de la IUPAC: 1-fenil- 2-[[4-fenil-5-[(5-feniltetrazol-2- il)metil]-1,2,4-triazol-3- il]sulfanil]etanona</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[[5- [(2,4-dimetil-anilino)metil]-4- (furan-2-ilmetil)-1,2,4-triazol- 3-il]sulfanilmetil]-1H- quinazolin-4-ona</p>		

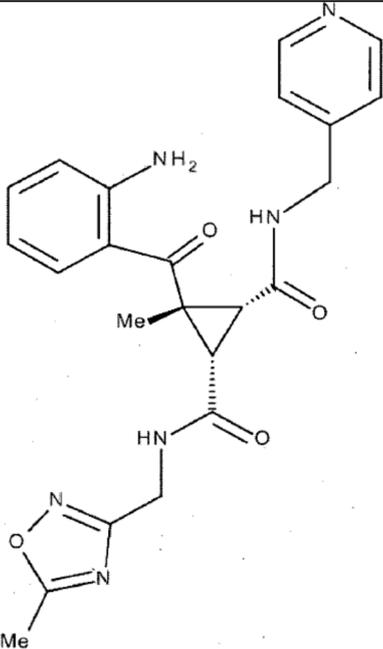
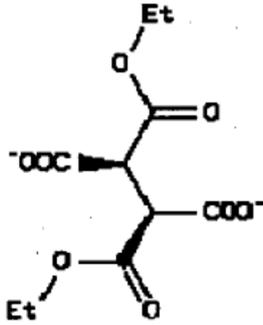
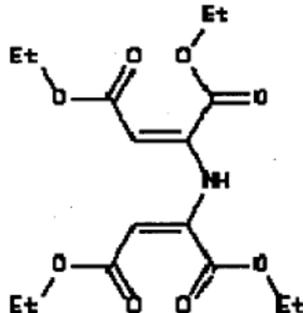
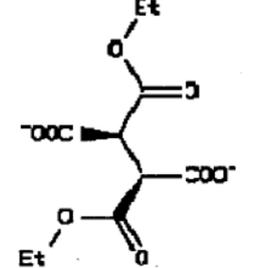
<p>N-(2-furilmetil)-N-[1-(isopentilcarbamoil)etil]-5-(morfolinometil)-furan-2-carboxamida</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 4-N-bencil-1-N-[2-(3,4-dimetoxifenil)-etil]-4-N-etilbenceno-1,4-disulfonamida</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 3-[2-(2,5-dimetoxifenil)-2-oxoetil]sulfanil-6-metil-2H-1,2,4-triacin-5-ona</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[4-(4-metilbenzoil)-piperidin-1-il]sulfonilbenzoato</p>		

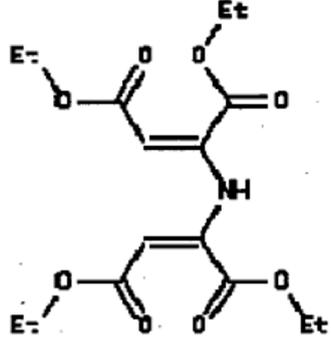
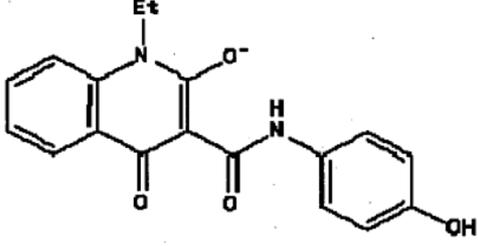
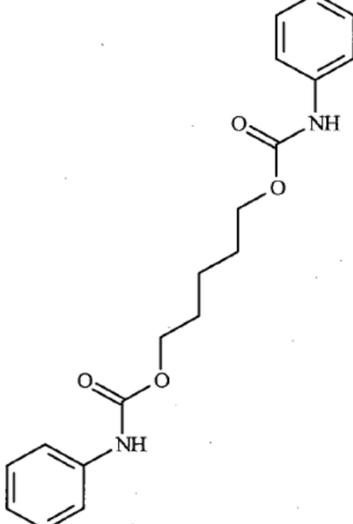
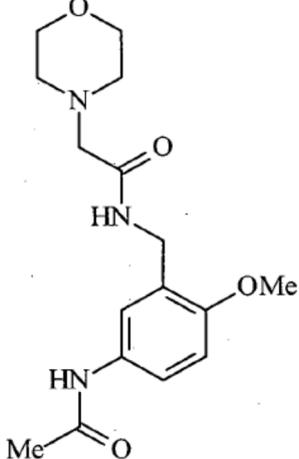
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 2-[4-[(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-metoxifenoxi]-acético</p>		
<p>Nombre popular: N-(6-etoxi-1,3-benzotiazol-2-il)-2-[[2-(p-tolil)-9H-purin-6-il]sulfanil]acetamida</p>		
<p>2-[4-(4-metoxi-fenil)-piperacin-1-il]-N-(3-morfolino-sulfonil-fenil)-acetamida</p>		
<p>Nombre popular: 5-[[4-[(2,4,6-trioxohexa-hidropirimidin-5-ilideno)metil]-fenoxi]metil]-furan-2-carboxílico</p>		

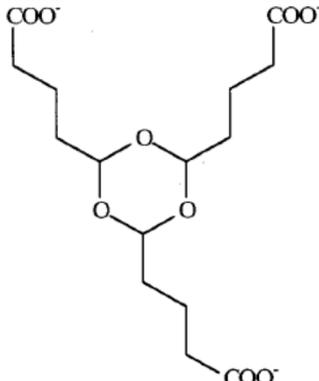
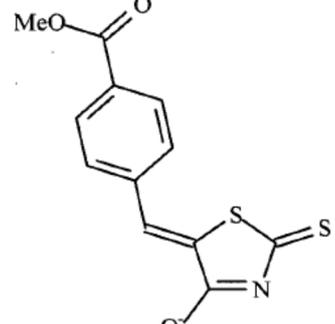
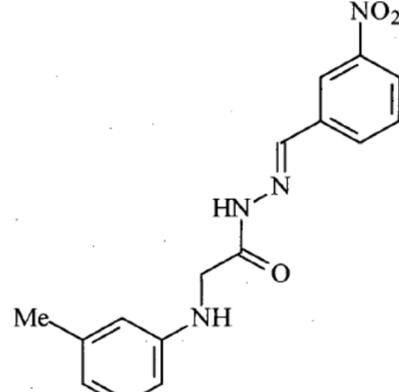
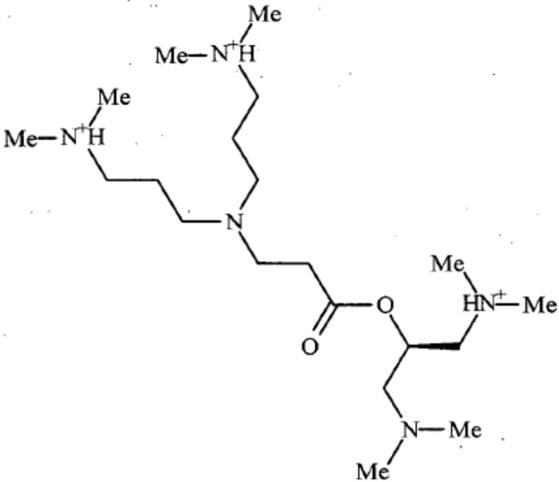
<p>Nombre de la IUPAC: 3-(bencimidazol-1-il)-N-[(2R)-1-[3-(3,4-difluorofenil)-6-oxopiridacin-1-il]butan-2-il]propanamida</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 2-metil-3-(piridin-3-ilmetilamino)benzoato</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2-[[4-amino-6-(dimetilamino)-1,3,5-triacin-2-il]oxi]etil]-2-(4-cloro-2-metilfenoxi)acetamida</p>		

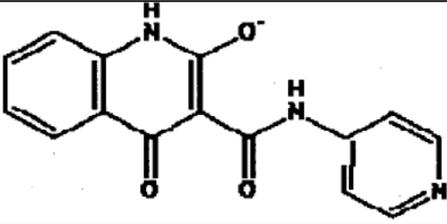
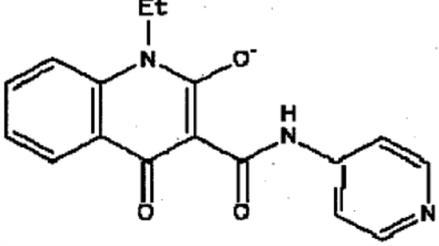
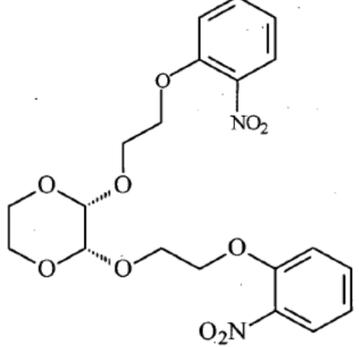
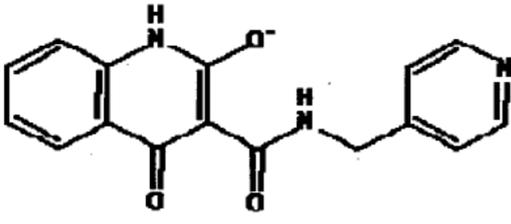
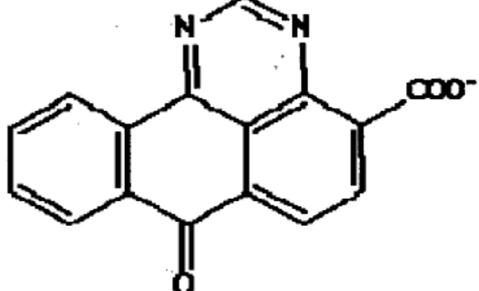
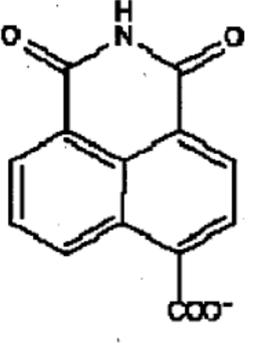
<p>Nombre de la IUPAC: [3-etoxi-4-(tiofen-2-ilmetoxi)fenil]metil-(2-morfolin-4-ilo-4-ilet)azanio</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[4-(2-hidroxi-etil)piperacin-1-il]-N-(2-pirrolidin-1-il-sulfonil-etil)piridina-3-carboxamida</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 1-[[2-(furan-2-il)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il]metil-metil-amino]-3-(4-metoxifenoxi)propan-2-ol</p>		

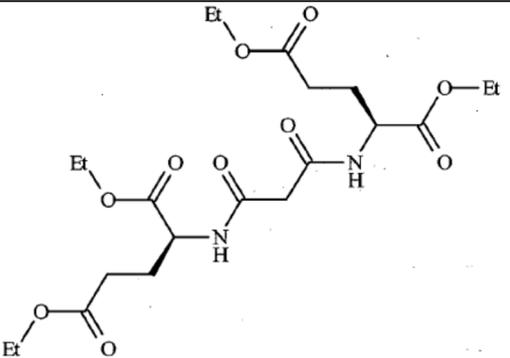
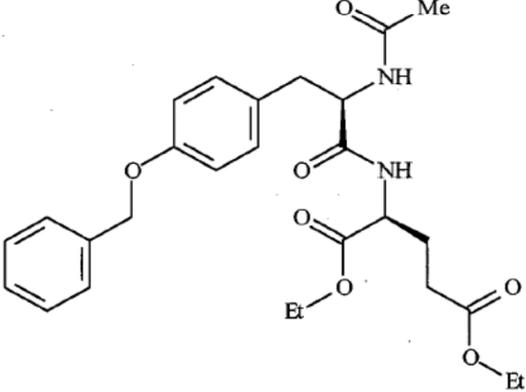
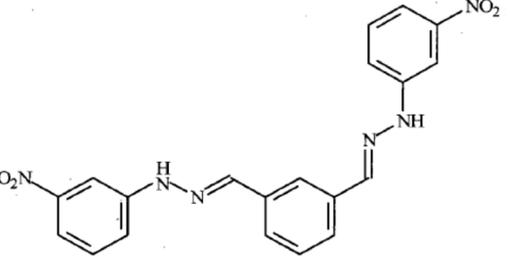
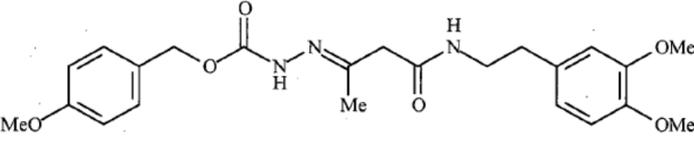
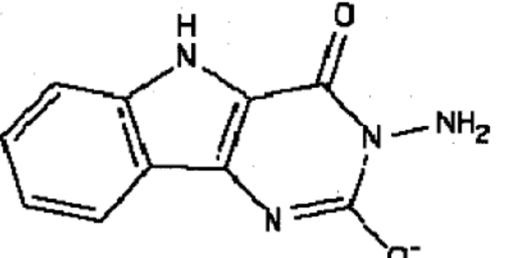
<p>Nombre de la IUPAC: N-etil-3-[2-(4-metoxifenoxi)-etoxi]-N-(pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-ilmetil)anilina</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: N-etil-3-[2-(4-fluorofenoxi)etoxi]-N-[(2-metilpirimidin-5-il)metil]anilina</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 2-metoxi-5-morfolin-4-ilbenzoato</p>		

<p>Nombre de la IUPAC: (1R,2S,3R)-3-(2-aminobenzoyl)-3-metil-2-N-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metil]-1-N-(piridin-4-ilmetil)ciclopropano-1,2-dicarboxamida</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: (2S,3S)-2,3-bis(etoxicarbonil)butanodioato</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[(1,4-dietoxi-1,4-dioxobut-2-en-2-il)amino]but-2-enodioato de dietilo</p>		
<p>Nombre de la IUPAC: (2S,3S)-2,3-bis(etoxicarbonil)butanodioato</p>		

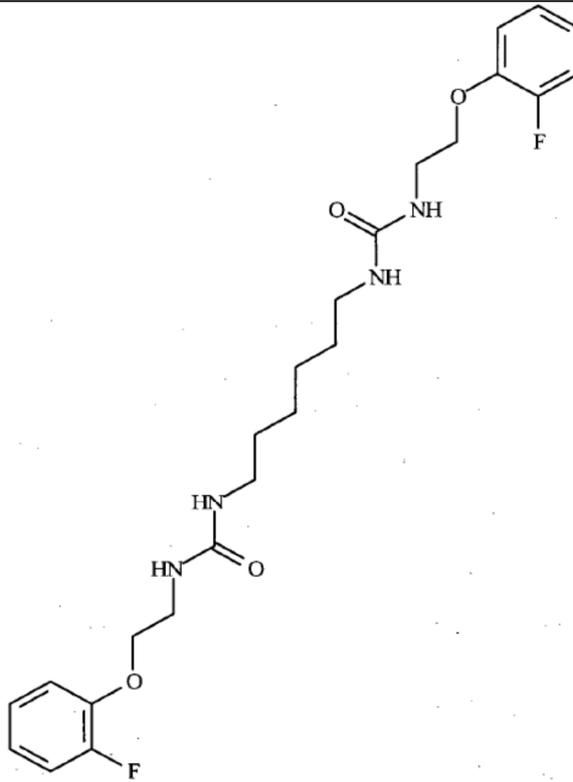
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[(1,4-dietoxi-1,4-dioxobut-2-en-2-il)amino]but-2-enodioato de dietilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 1-etil-2-hidroxi-N-(4-hidroxifenil)-4-oxoquinolina-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-fenilcarbamato de 5-(fenylcarbamoil-oxi)pentilo</p>	
<p>Nombre popular: N-[(5-acetamido-2-metoxifenil)metil]-2-morfolinoacetamida</p>	

<p>Nombre de la IUPAC: ácido 4-[4,6-bis(3-carboxipropil)-1,3,5-trioxan-2-il]butanoico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[(4-oxo-2-sulfanilideno-1,3-tiazolidin-5-ilidene)metil]benzoato de metilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(3-metilaniilino)-N-[(3-nitrofenil)metilidenoamino]acetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: [(2R)-2-[3-[bis[3-(dimetilazaniol)propil]amino]propanoiloxi]-3-(dimetilamino)propil]-dimetilazanio</p>	

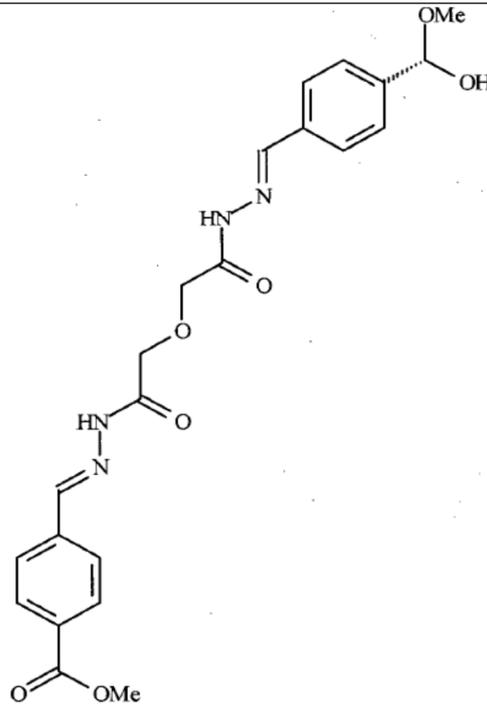
<p>Nombre de la IUPAC: 2-hidroxi-4-oxo-N-piridin-4-il-1H-quinolina-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 1-etil-2-hidroxi-4-oxo-N-piridin-4-ilquinolina-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2,3-bis[2-(2-nitrofenoxi)etoxi]-1,4-dioxano</p>	
<p>4-hidroxi-2-oxo-N-(4-piridinilmetil)-1,2-dihidro-3-quinolina carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 7-oxobenzo[e]perimidina-4-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 1,3-dioxobenzo[de]isoquinolina-6-carboxílico</p>	

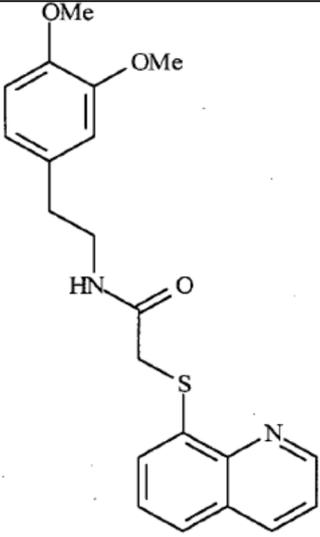
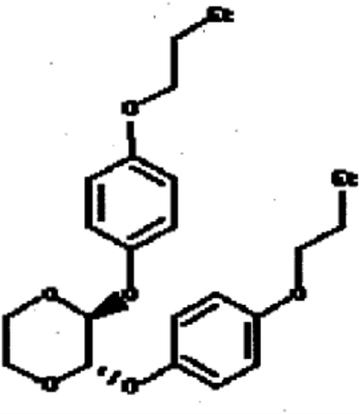
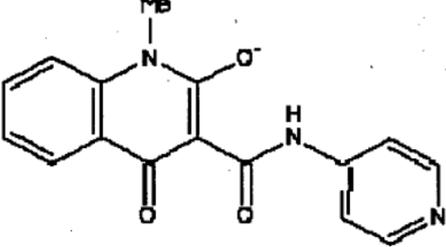
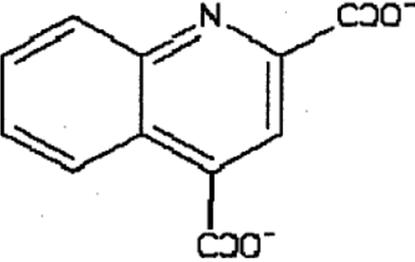
<p>Nombre de la IUPAC: (2S)-2-[[3-[[[(2S)-1,5-dietoxi-1,5-dioxopentan-2-il]amino]-3-oxopropanoil]amino]pentanedioato de dietilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[[2-acetamido-3-(4-fenilmetoxifenil)propanoil]amino]pentanedioato de dietilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-nitro-N-[(E)-[3-[(E)-[(3-nitrofenil)hidracinilideno]metil]fenil]metilidenoamino]anilina</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-[[4-[2-(3,4-dimetoxifenil)etilamino]-4-oxobutan-2-ilideno]amino]carbamato de (4-metoxifenil)metilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-amino-1,5-dihidropirimido[5,4-b]indol-2,4-diona</p>	

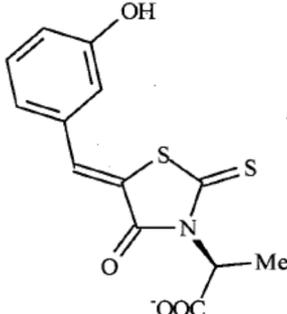
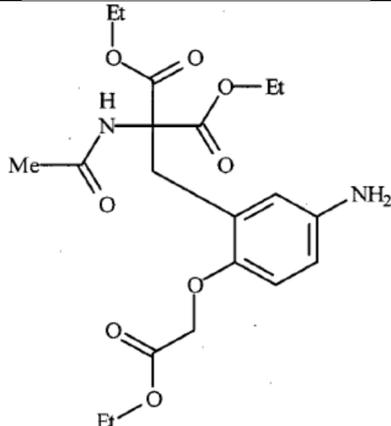
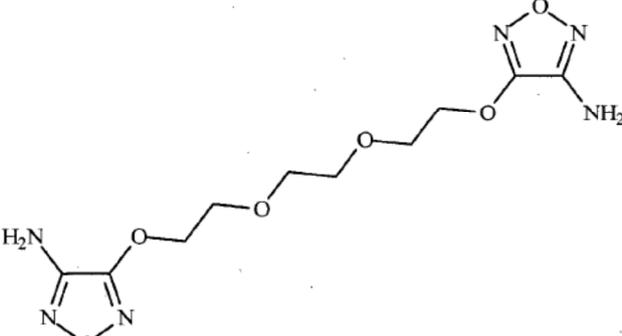
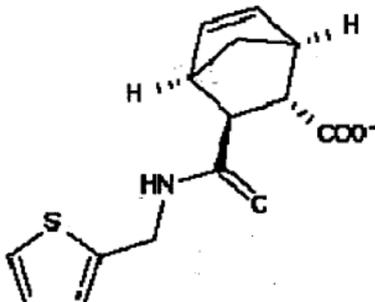
Nombre de la IUPAC: 1-[2-(2-fluorofenoxi)etil]-3-[6-[2-(2-fluorofenoxi)etil carbamoilamino]hexil]urea

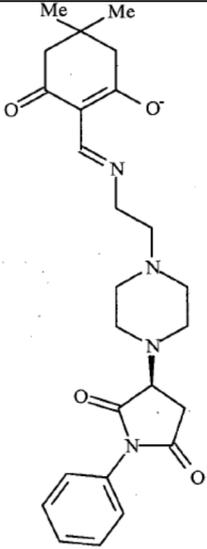
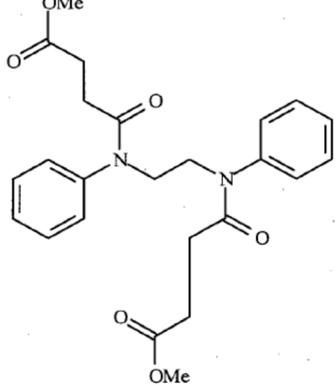
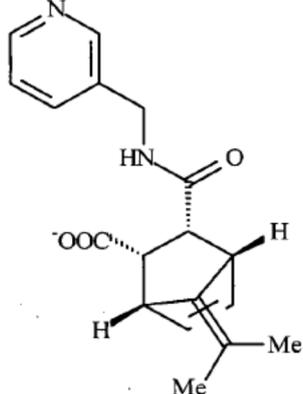


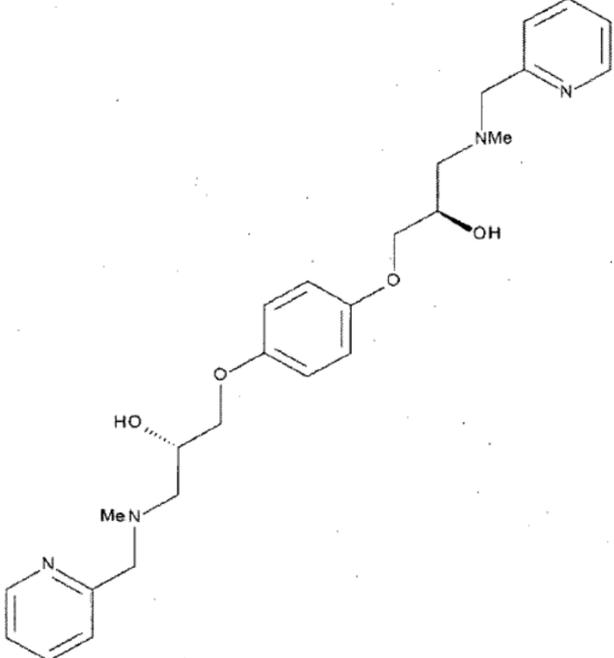
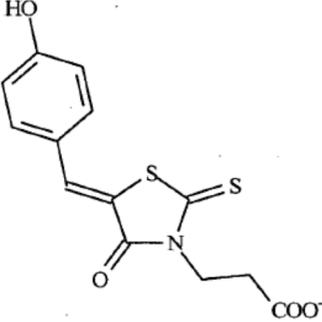
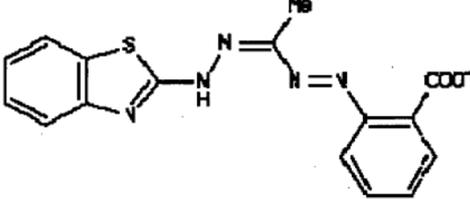
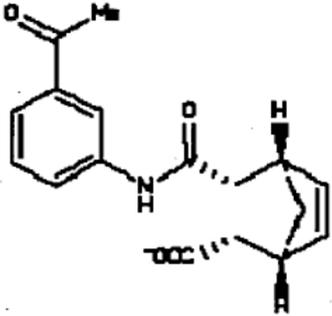
Nombre de la IUPAC: 4-[[[2-[2-[2-[[4-[hidroxi(metoxi)metil]fenil]metilideno]hidracinil]-2-oxoetoxi]acetil]hidracinilideno]metil]benzoato de metilo

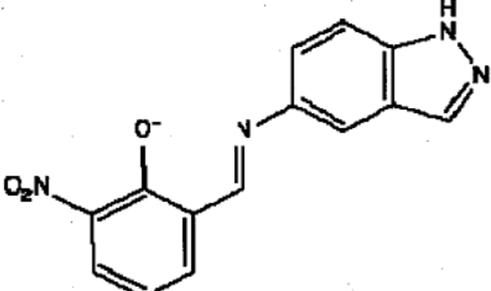
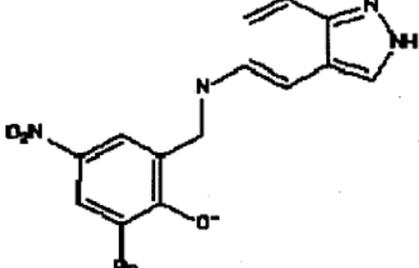
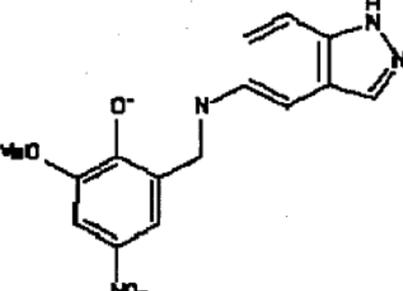
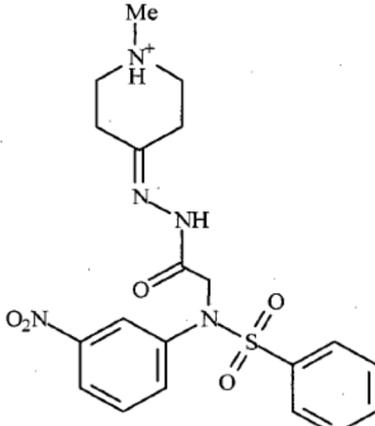
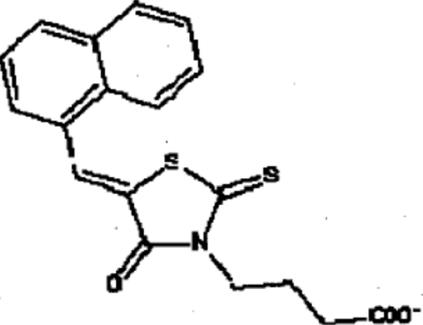


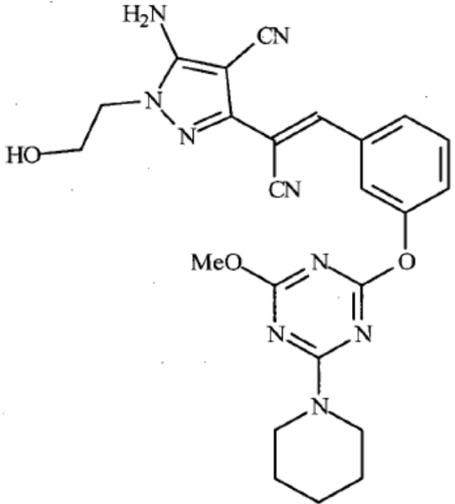
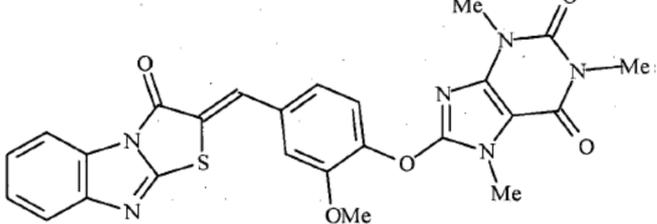
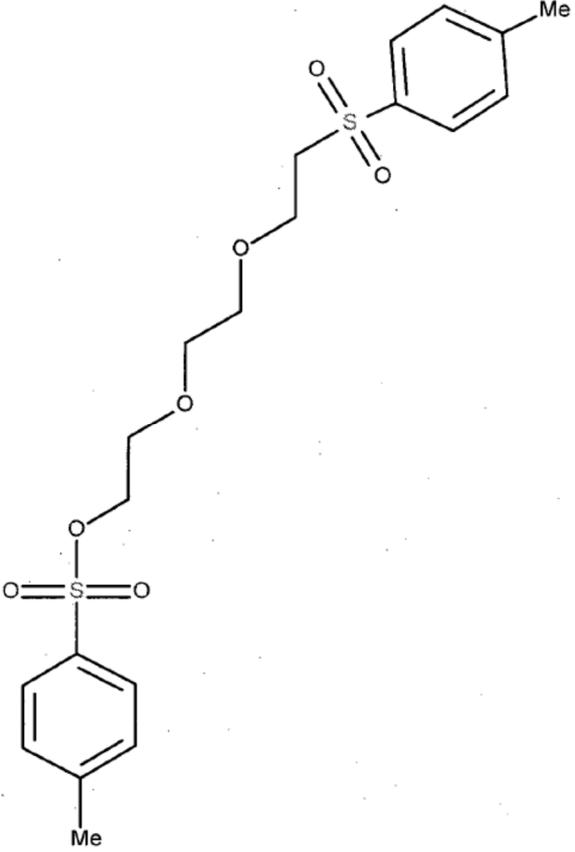
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-2-quinolin-8-ilsulfanilacetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: (2S,3S)-2,3-bis(4-butoxifenoxi)-1,4-dioxano</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-hidroxi-1-metil-4-oxo-N-piridin-4-ilquinolina-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido quinolina-2,4-dicarboxílico</p>	

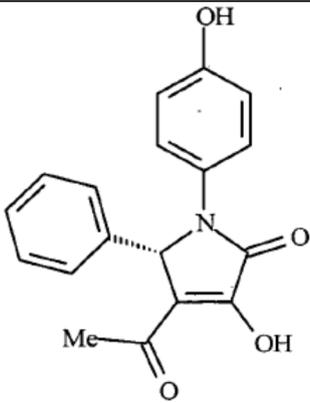
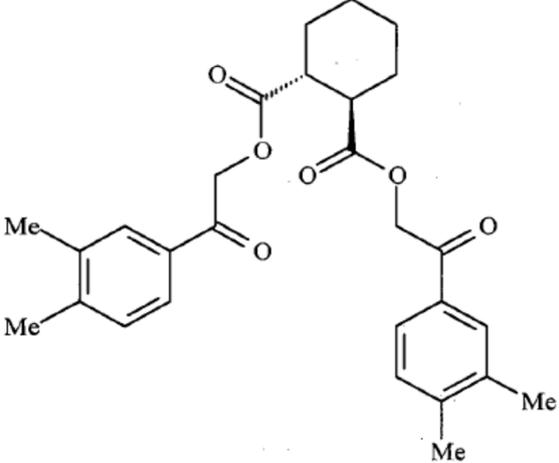
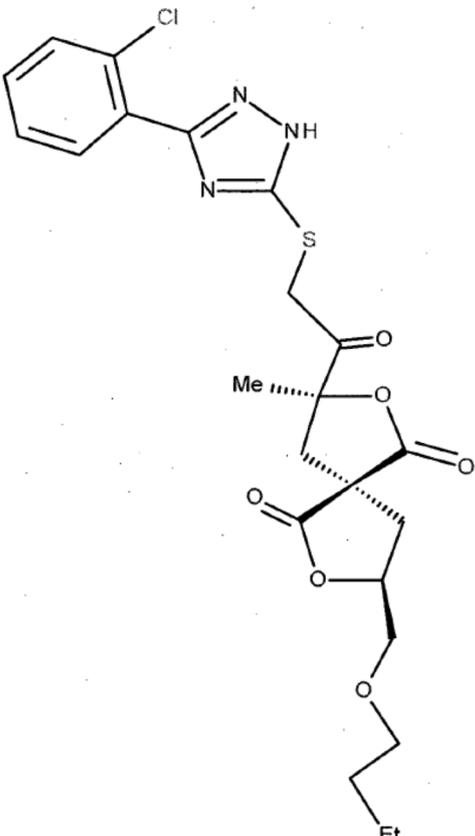
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 2-[(5Z)-5-[(3-hidroxifenil)metilideno]-4-oxo-2-sulfanilideno-1,3-tiazolidin-3-il]propanoico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-acetamido-2-[[[5-amino-2-(2-etoxi-2-oxoetoxi)fenil]metil]propanodioato de dietilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[2-[2-[2-[(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-il)oxi]etoxi]etoxi]etoxi]-1,2,5-oxadiazol-3-amina</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: (1R,2S,3S,4S)-2-(tiofen-2-ilmetilcarbamoil) biciclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato</p>	

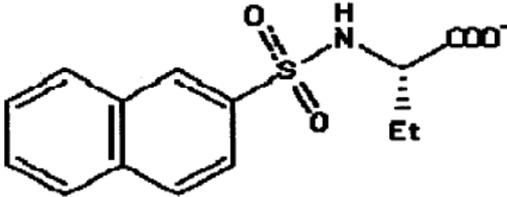
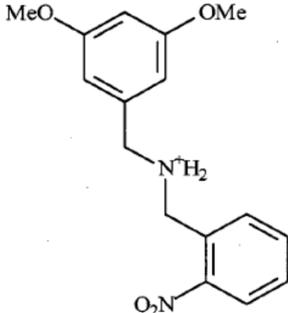
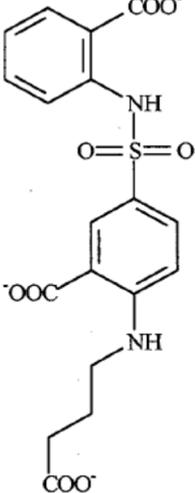
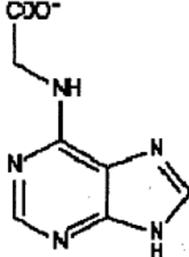
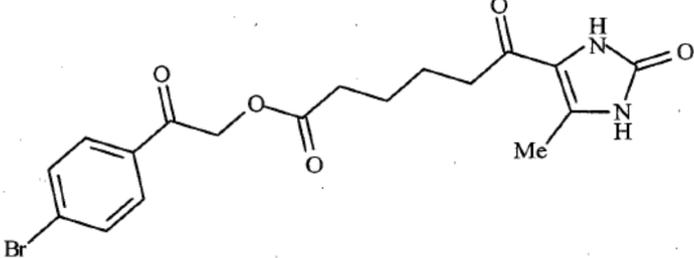
<p>Nombre de la IUPAC: 3-[4-[2-[(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)metilamino]etil]piperacina-1-il]-1-fenilpirrolidina-2,5-diona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[N-[2-(N-(4-metoxi-4-oxobutanoil)anilino)etil]anilino]-4-oxobutanoato de metilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 7-propan-2-ilideno-2-(piridin-3-ilmetilcarbamoil)biciclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxílico</p>	

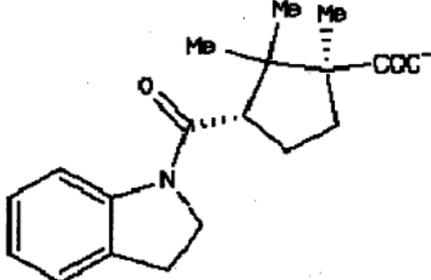
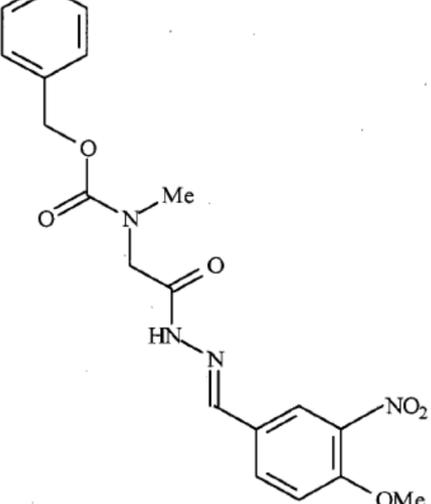
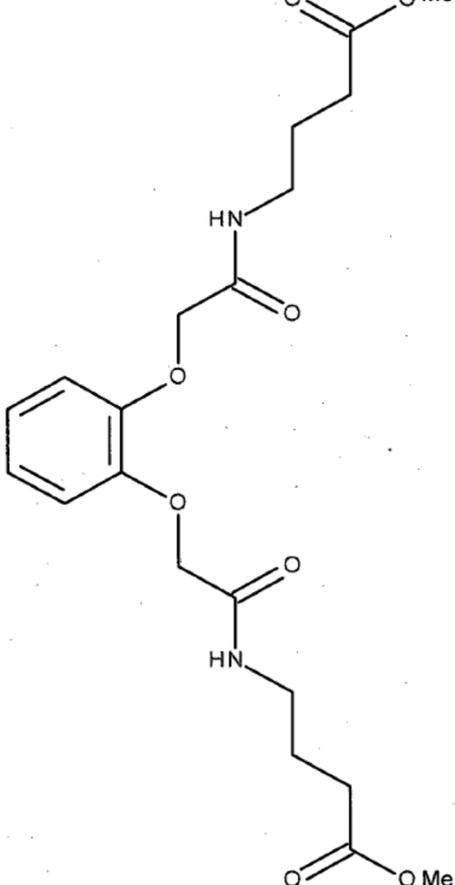
<p><u>1-[4-[2-hidroxi-3-(2-piridilmetilamino)propoxi]fenoxi-3-(2-piridilmetilamino)propan-2-ol</u></p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 3-[5-[(4-hidroxifenil)metilideno]-4-oxo-2-sulfanilideno-1,3-tiazolidin-3-il]propanoico</p>	
<p>2-(1-benzotiazol-2-ilaminoiminoetil-azo)benzoico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[(3-acetilfenil)-carbamoil]bicile-[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato</p>	

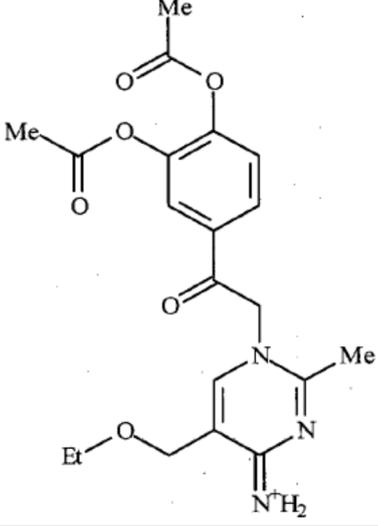
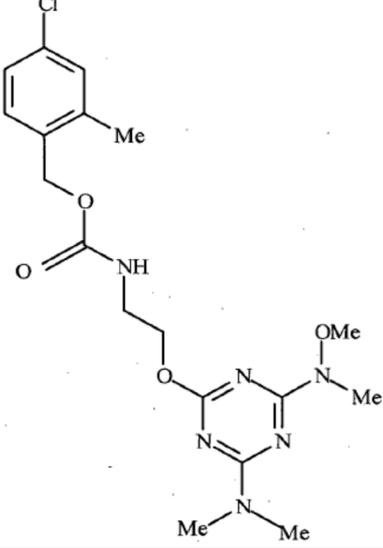
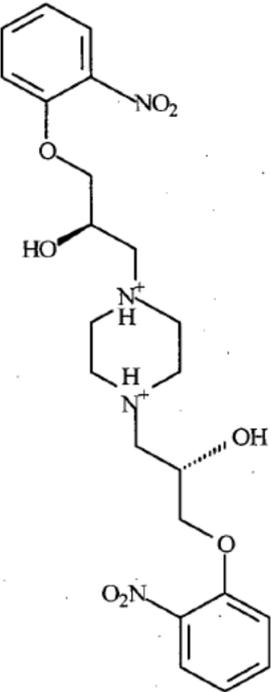
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(1H-indazol-5-iliminometil)-6-nitrofenolato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-bromo-6-[(1H-indazol-5-ilamino)-metilideno]-4-nitrociclohexa-2,4-dien-1-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(1H-indazol-5-iliminometil)-6-metoxi-4-nitrofenolato</p>	
<p>N-{2-[2-(1-metil-4-piperidinilideno)-hidracino]-2-oxoetil}-N-(3-nitrofenil)benceno sulfonamida (nombre no preferido)</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[5-(naftalen-1-ilmetilideno)-4-oxo-2-sulfanilideno-1,3-tiazolidin-3-il]butanoato</p>	

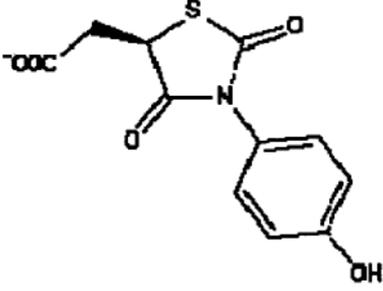
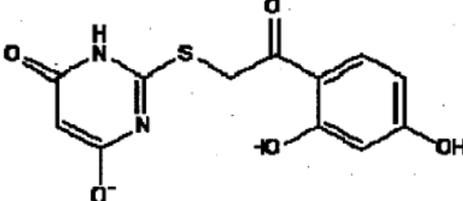
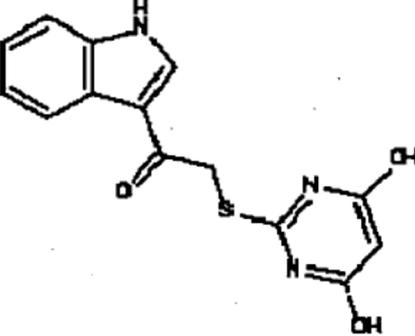
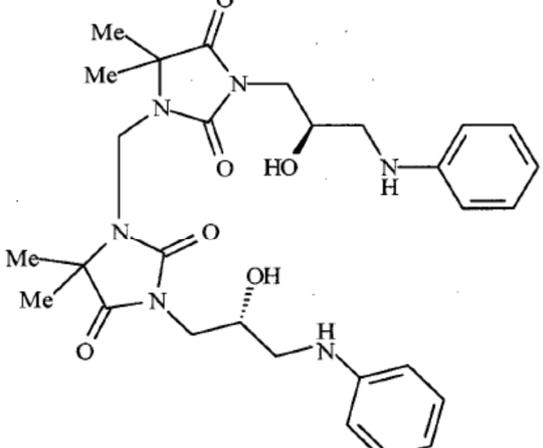
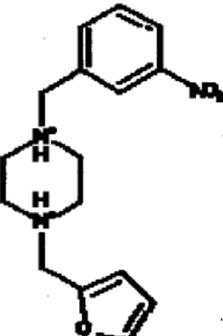
<p>Nombre de la IUPAC: 5-amino-3-[(Z)-1-ciano-2-[3-[(4-metoxi-6-piperidin-1-il-1,3,5-triacin-2-il)oxi]fenil]etenil]-1-(2-hidroxietil)pirazol-4-carbonitrilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 8-[2-metoxi-4-[(1-oxo-[1,3]tiazolo[3,2-a]bencimidazol-2-ilideno)metil]fenoxi]-1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-metilbencenesulfonato de 2-[2-[2-(4-metilfenil)sulfoniletoxi]etoxi]etilo</p>	

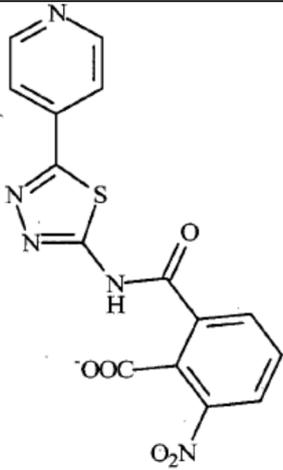
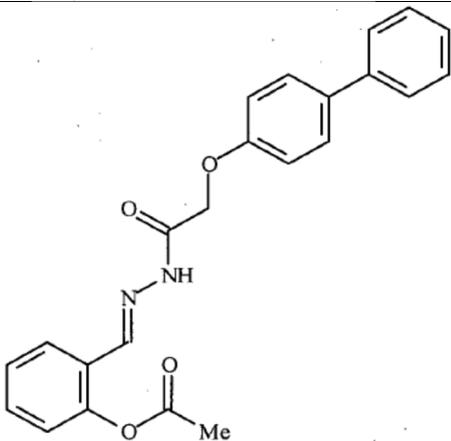
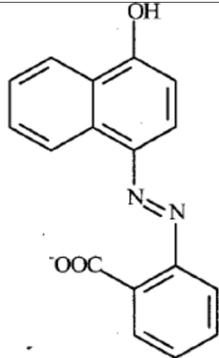
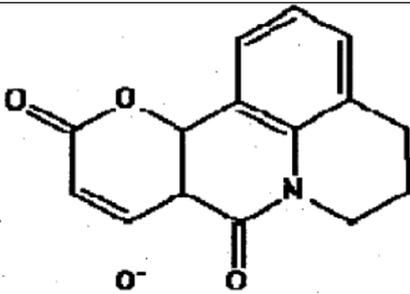
<p>Nombre de la IUPAC: (2S)-3-acetil-4-hidroxi-1-(4-hidroxifenil)-2-fenil-2H-pirrol-5-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ciclohexano-1,2-dicarboxilato de bis[2-(3,4-dimetilfenil)-2-oxoetilo]</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 8-(butoximetil)-3-[2-[[5-(2-clorofenil)-1H-1,2,4-triazol-3-il]sulfanil]acetil]-3-metil-2,7-dioxaspiro[4.4]nonano-1,6-diona</p>	

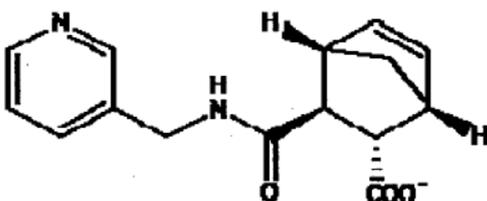
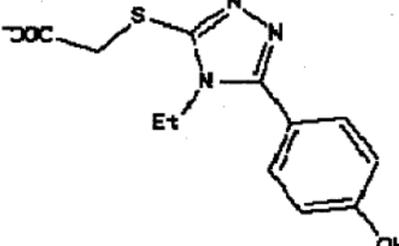
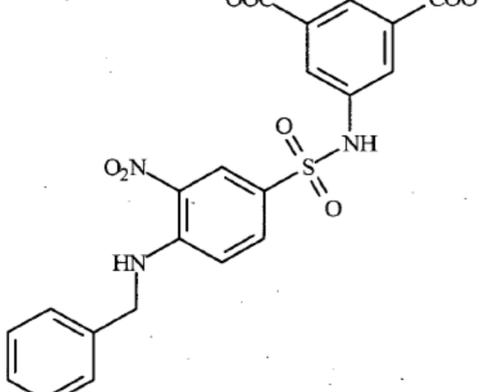
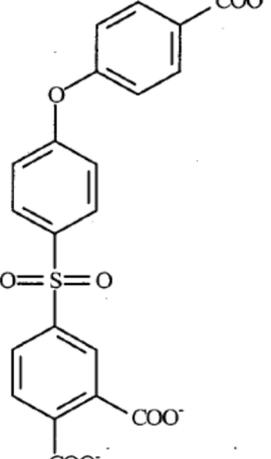
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 2-(naftalen-2-ilsulfonilamino) butanoico</p>	
<p>1-(3,5-dimetoxifenil)-N-[(2-nitrofenil)metil]metanamina</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[(2-carboxilatofenil)sulfamoil]-2-(3-carboxilatopropilamino) benzoato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(7H-purin-6-ilazanioil)acetato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 6-(5-metil-2-oxo-1,3-dihidroimidazol-4-il)-6-oxohexanoato de [2-(4-bromofenil)-2-oxoetil]</p>	

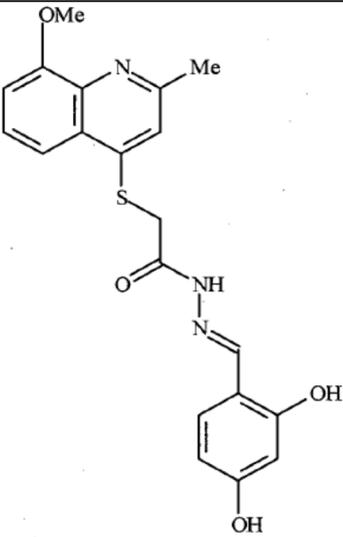
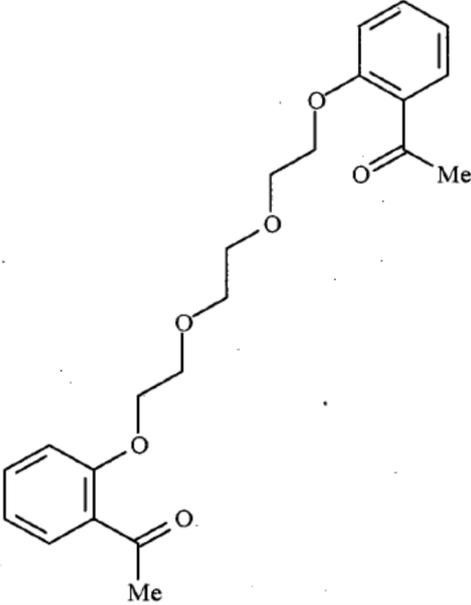
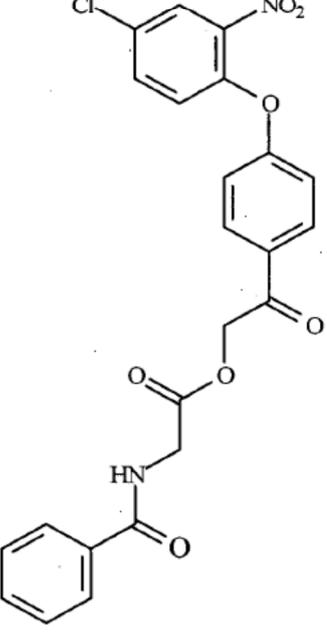
<p>ácido 3-(2,3-dihidro-1H-indol-1-ilcarbonyl)-1,2,2-trimetilciclopentanocarboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: carbamato de bencil-N-[2-[2-[(4-metoxi-3-nitrofenil)-metilideno]-hidracinil]-2-oxoetil]-N-metilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[[2-[2-[(4-metoxi-4-oxobutil)amino]-2-oxoetoxi]fenoxi]acetil]amino]butanoato de metilo</p>	

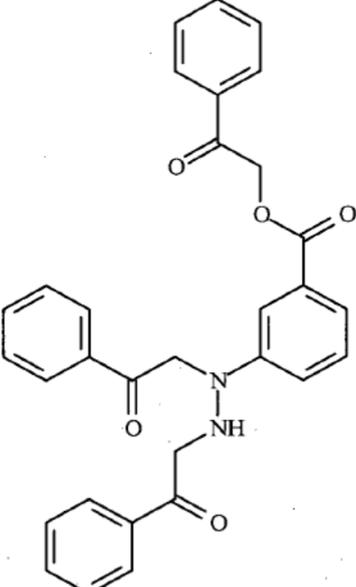
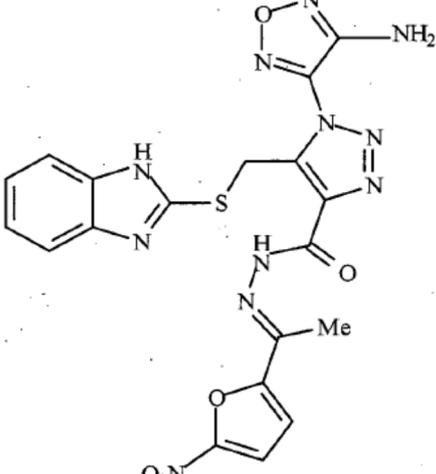
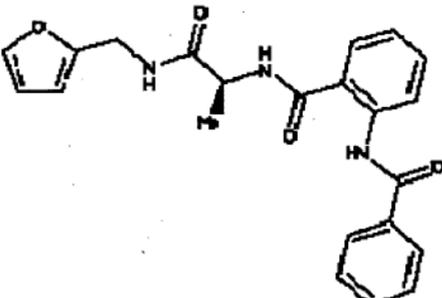
<p>Nombre de la IUPAC: acetato de [2-acetiloxi-4-[2-[5-(etoximetil)-4-imino-2-metilpirimidin-1-il]acetil]fenilo]</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2[[4-(dimetilamino)-6-[metoxi(metil)amino]-1,3,5-triacin-2-il]oxi]etil]carbamato de (4-cloro-2-metilfenil)metilo]</p>	
<p>1-[4-[2-hidroxi-3-(2-nitrofenoxi)-propil]piperacin-1-il]-3-(2-nitrofenoxi)-propan-2-ol</p>	

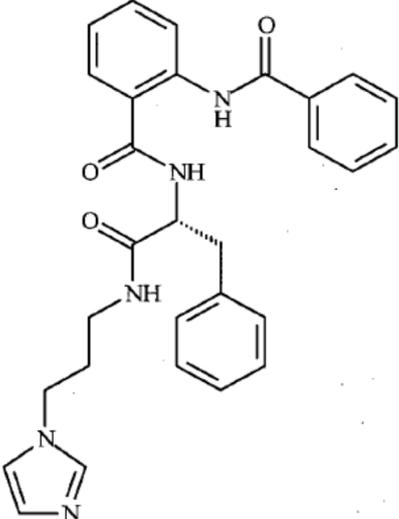
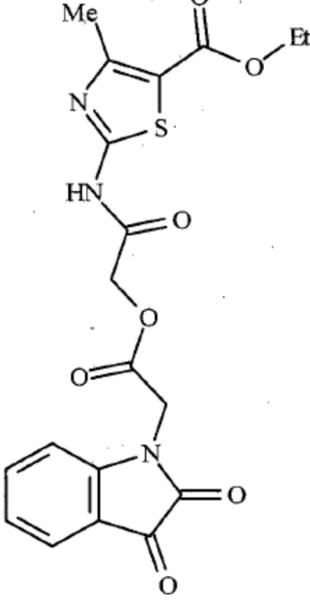
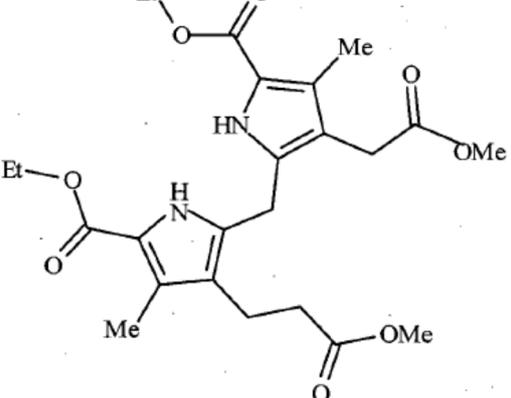
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[(5R)-3-(4-hidroxifenil)-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il]acetato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[2-(2,4-dihidroxifenil)-2-oxoetil]sulfanil-4-hidroxi-1H-pirimidin-6-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-hidroxi-2-[2-(1H-indol-3-il)-2-oxoetil]sulfanil-1H-pirimidin-6-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-(3-anilino-2-hidroxiopropil)-1-[[3-(3-anilino-2-hidroxiopropil)-5,5-dimetil-2,4-dioxoimidazolidin-1-il]metil]-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona</p>	
<p>1-(2-furilmetil)-4-(3-nitrobenzil)-piperacina</p>	

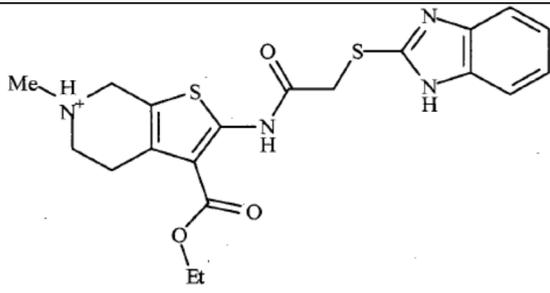
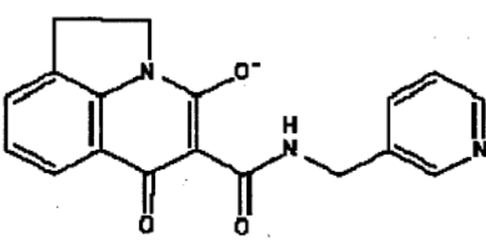
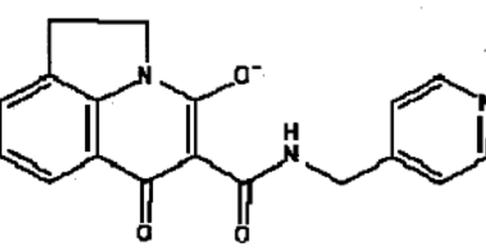
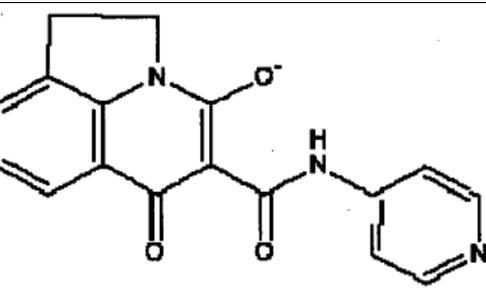
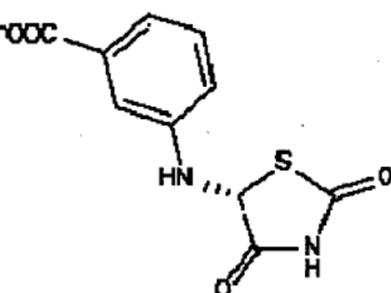
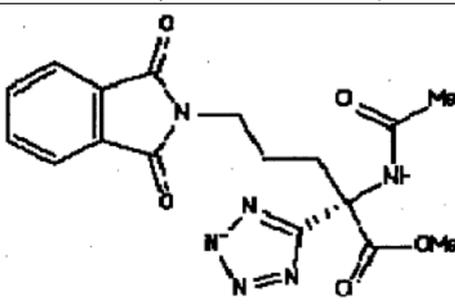
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 2-nitro-6-[(5-piridin-4-il-1,3,4-tiadiazol-2-il)carbamoil] benzoico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: acetato de [2-[[[2-(4-fenilfenoxi)acetil]hidracinilideno]metil]fenilo]</p>	
<p>ÁCIDO 2-((4'-HIDROXI-NAFTIL)-AZO)BENZOICO</p>	
<p>8-hidroxi-5,6-dihidro-4H-11-oxa-6a-azabenz[de]antraceno-7,10-diona</p>	

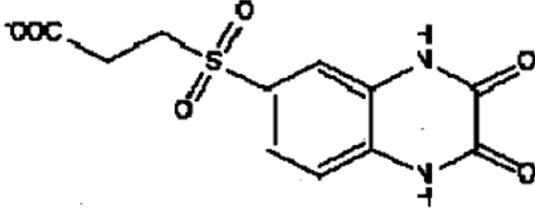
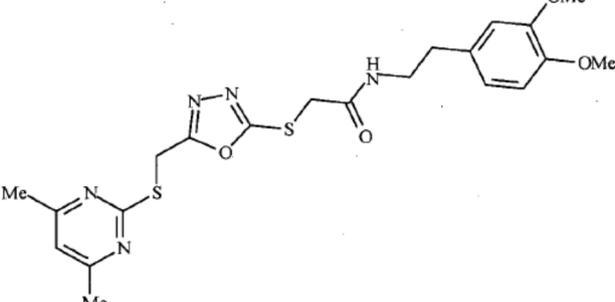
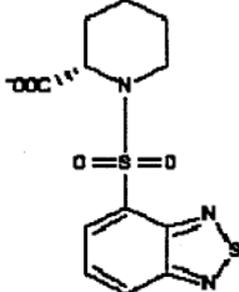
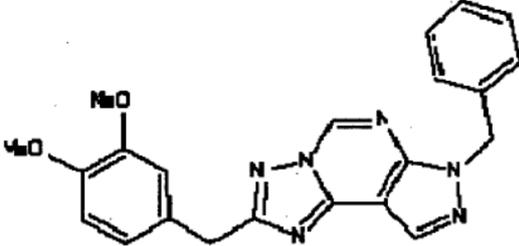
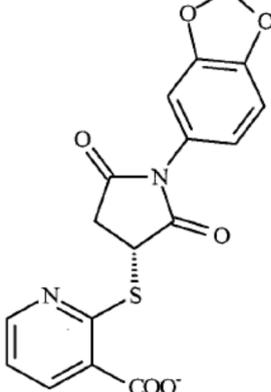
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(piridin-3-ilmetilcarbamoil) biciclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato</p>	
<p>ácido 4-etil-5-(4-hidroxifenil)-4H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanil]-acético</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[[4-(bencilamino)-3-nitrofenil]sulfonil amino]benceno-1,3-dicarboxilato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[4-(4-carboxilato-fenoxi)fenil]-sulfonilftalato</p>	

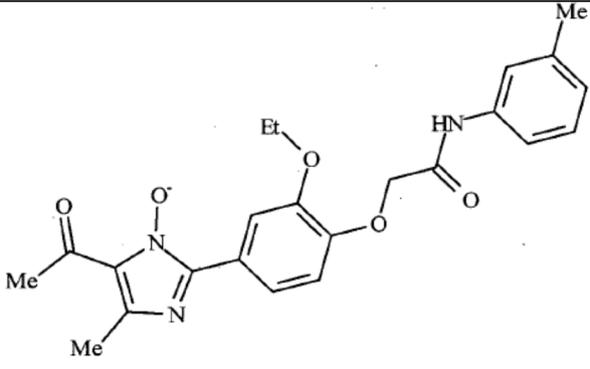
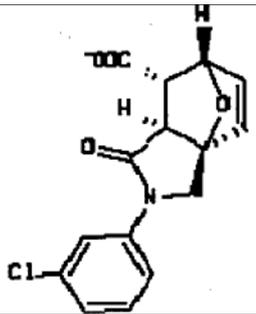
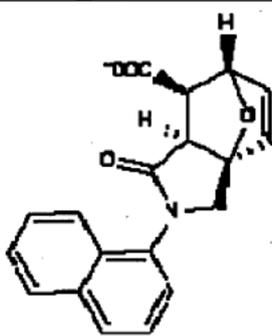
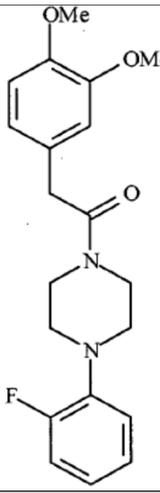
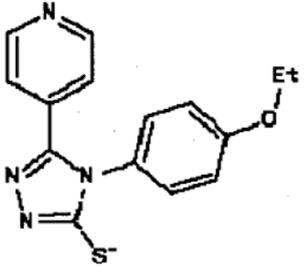
<p>N-[(2,4-dihidroxifenil)-metilenoamino]-2-[(8-metoxi-2-metil-4-quinolil)-sulfanil]acetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 1-[2-[2-[2-[2-(2-acetil-fenoxi)etoxi]-etoxi]etoxi]-fenil]etanona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-benzamidoacetate de [2-[4-(4-choro-2-nitro-fenoxi)fenil]-2-oxoetilo]</p>	

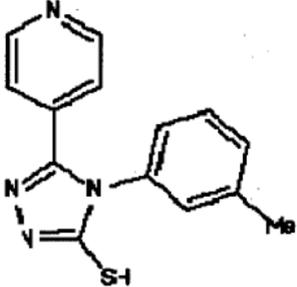
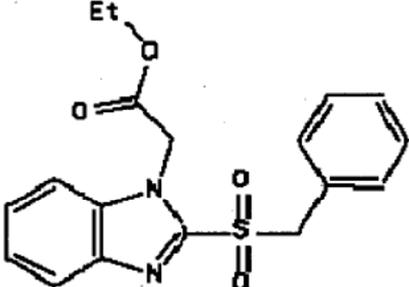
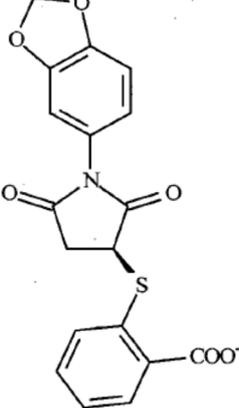
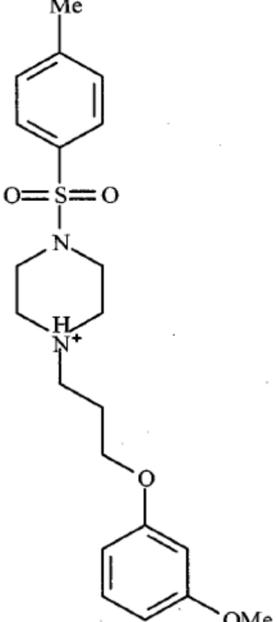
<p>Nombre de la IUPAC: 3-[fenacil-(fenacilamino)-amino]benzoato de fenacilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 1-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-il)-5-(1H-bencimidazol-2-ilsulfanilmetil)-N-[1-(5-nitrofuran-2-il)etilidenoamino]-triazol-4-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-benzamido-N-[1-(furan-2-il)metilamino]-1-oxopropan-2-il]benzamida</p>	

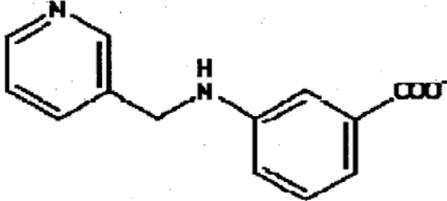
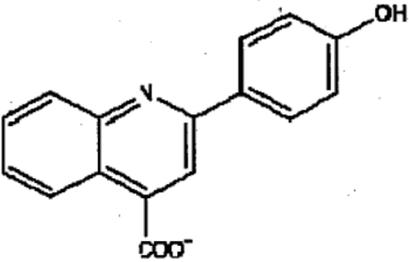
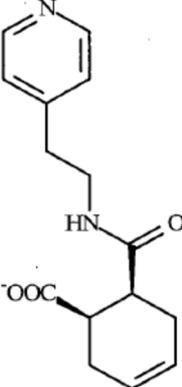
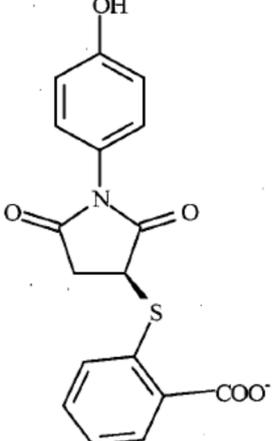
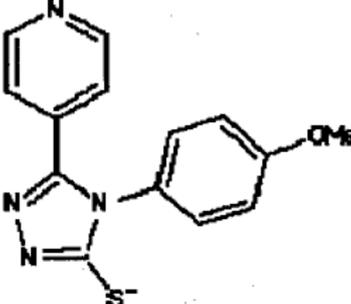
<p>Nombre de la IUPAC: 2-benzamido-N-[1-(3-imidazol-1-ilpropilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]benzamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2[[2-(2,3-dioxindol-1-il)acetil]oxiacetil]-amino]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[[5-etoxicarbonil-3-(2-metoxi-2-oxoetil)-4-metil-1H-pirrol-2-il]metil]-4-(3-metoxi-3-oxopropil)-3-metil-1H-pirrol-2-carboxilato de etilo</p>	

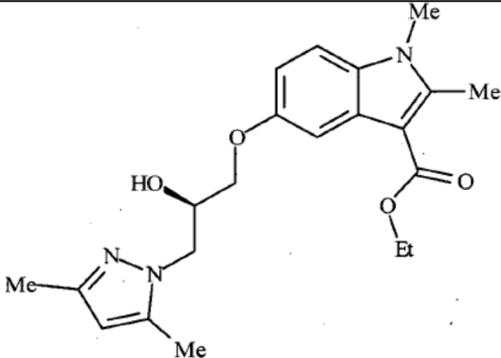
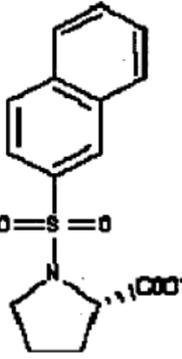
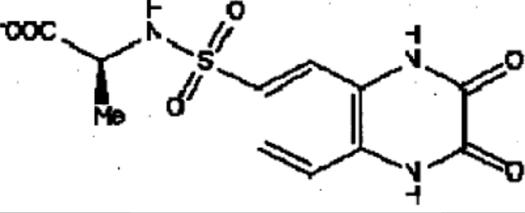
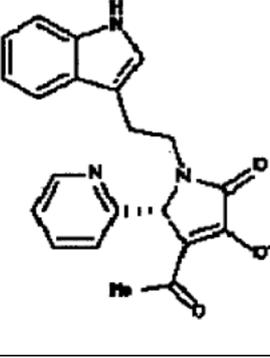
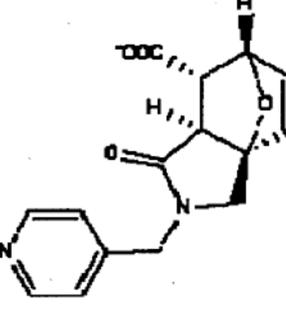
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[[2-(1H-bencimidazol-2-ilsulfanil)acetil]-amino]-6-metil-5,7-dihidro-4H-tieno[2,3-c]-piridina-3-carboxilato de etilo</p>	
<p>ceto(3-piridil-metilcarbamoil)-BLAHolato</p>	
<p>ceto(4-piridilmetil-carbamoil)BLAH-olato</p>	
<p>hidroxi-oxo-N-(4-piridil)BLAH-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-[[[(5R)-2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5-il]amino]benzoato</p>	
<p>N-acetil-5-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)-2-(2H-tetrazol-5-il)norvalinato de metilo</p>	

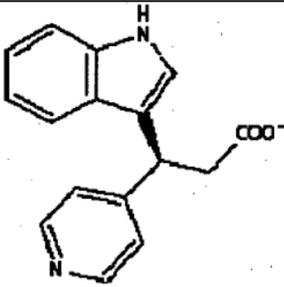
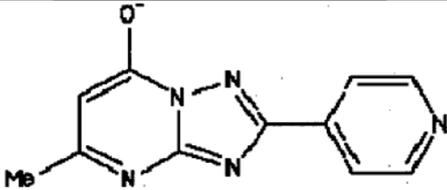
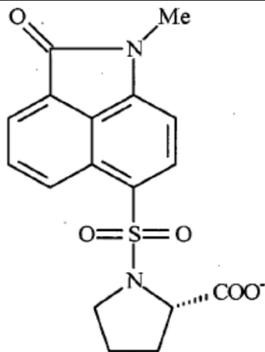
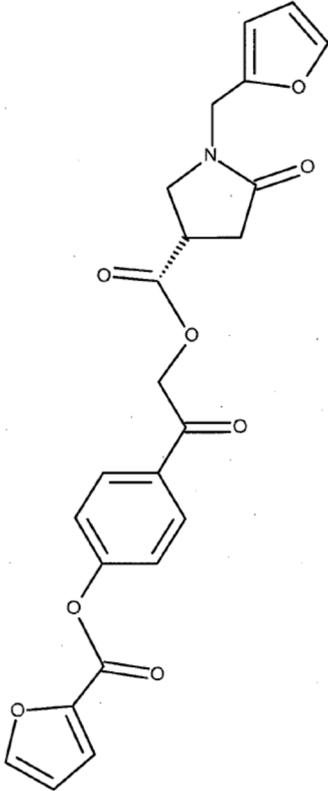
<p>Nombre de la IUPAC: 3-[(2,3-dioxo-1,4-dihidroquinoxalin-6-il)sulfonil]propanoato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-2[[5-[(4,6-dimetilpirimidin-2-il)sulfanil-metil]-1,3,4-oxadiazol-2-il]-sulfanil]acetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido (2S)-1-(2,1,3-benzotiadiazol-4-ilsulfonil)piperidina-2-carboxílico</p>	
<p>bencil(veratril)-BLAH</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,5-dioxopirrolidin-3-il]sulfanilpiridina-3-carboxilato</p>	

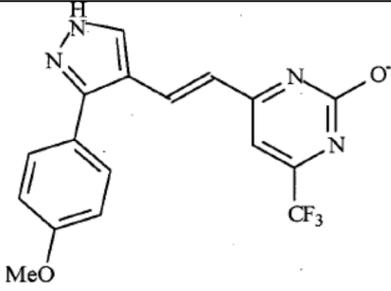
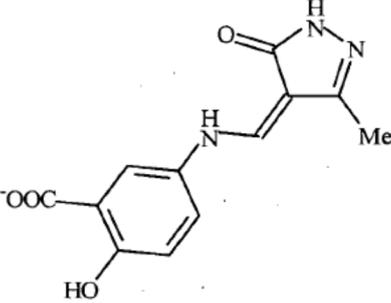
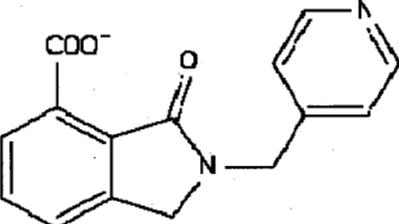
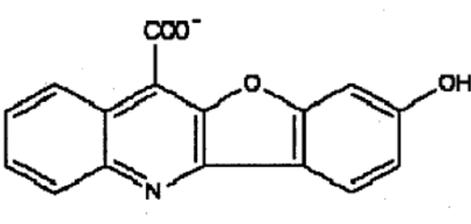
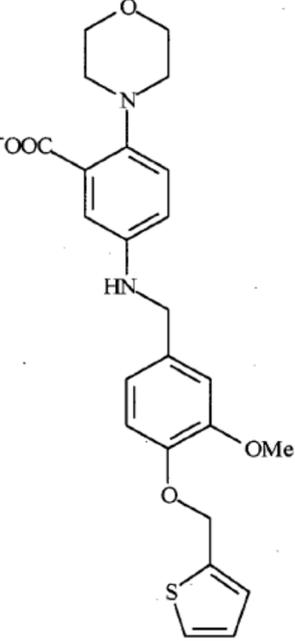
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[4-(5-acetil-1-hidroxi-4-metilimidazol-2-il)-2-etoxifenoxi]-N-(3-metilfenil)-acetamida</p>	
<p>(3-clorofenil)-ceto-BLAH-carboxilato</p>	
<p>ácido 1-naftil-oxo-BLAH-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(3,4-dimetoxifenil)-1-[4-(2-fluorofenil)-piperacin-1-il]etanona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-(4-etoxifenil)-5-piridin-4-il-1,2,4-triazol-3-tiolato</p>	

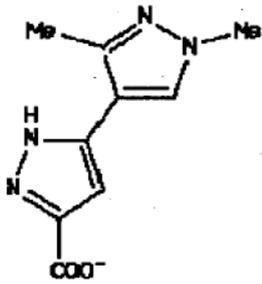
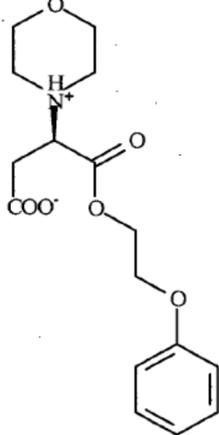
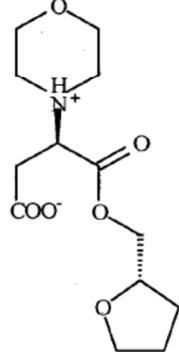
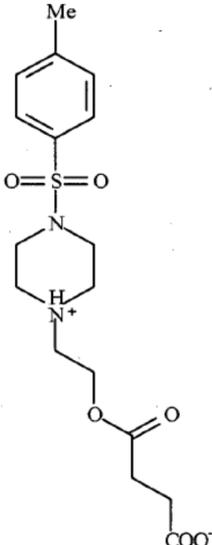
<p>Nombre de la IUPAC: 4-(3-metilfenil)-5-piridin-4-il-1,2,4-triazol-3-tiolato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(2-bencil-sulfonilbencimidazol-1-il)acetato de etilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[(3S)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,5-dioxopirrolidin-3-il]sulfanilbenzoato</p>	
<p>Nombre popular: 1-[3-(3-metoxi-fenoxi)propil]-4-[(4-metilfenil)-sulfonil]piperacina</p>	

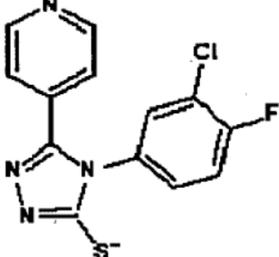
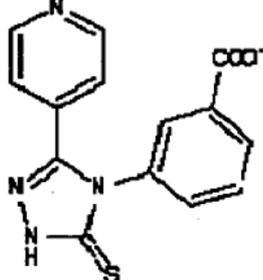
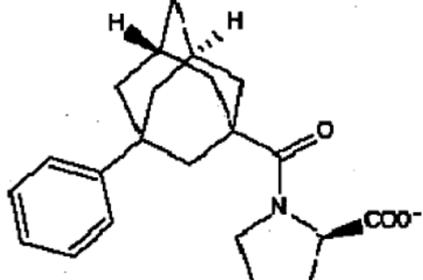
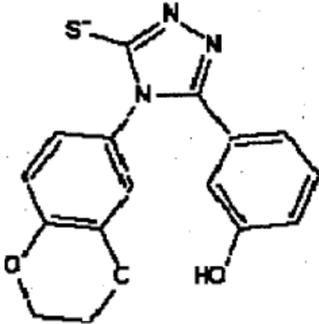
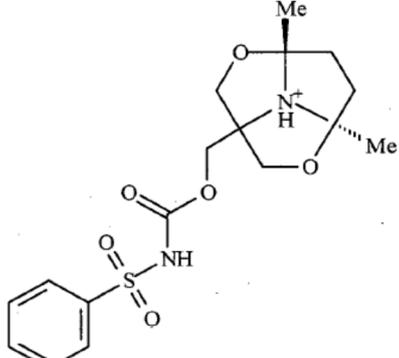
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 3-(piridin-3-ilmetil-amino)benzoico</p>	
<p>ácido 2-(4-hidroxifenil)quinolina-4-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 6-(2-piridin-4-iletílcarbamoil) ciclohex-3-eno-1-carboxilato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-[(3S)-1-(4-hidroxifenil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il]sulfanilbenzoato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-(4-metoxifenil)-5-piridin-4-il-1,2,4-triazol-3-tiolato</p>	

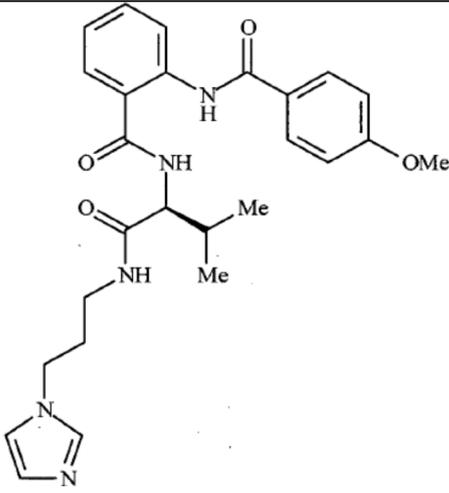
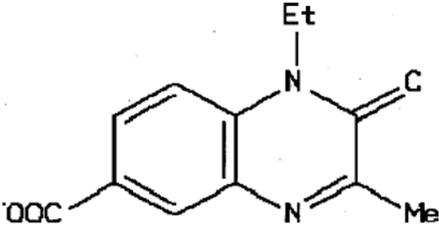
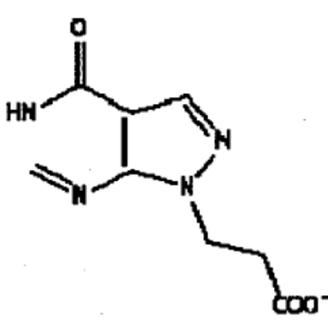
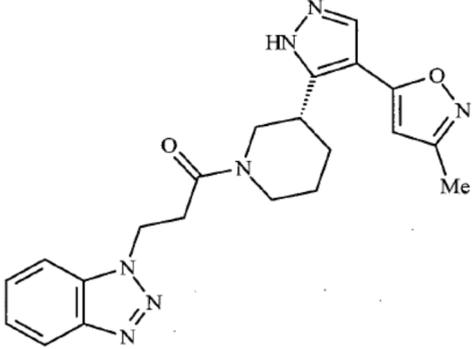
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[(2R)-3-(3,5-dimetilpirazol-1-il)-2-hidroxi-propoxi]-1,2-dimetilindol-3-carboxilato de etilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 1-naftalen-2-il-sulfonilpirrolidina-2-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: (2S)-2-[(2,3-dioxo-1,4-dihidroquinoxalin-6-il)sulfonil-amino]propanoato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: (2R)-3-acetil-4-hidroxi-1-[2-(1H-indol-3-il)etil]-2-piridin-2-il-2H-pirrol-5-ona</p>	
<p>ácido .2.1.0%1,5&]dec-8-eno-6-carboxílico</p>	

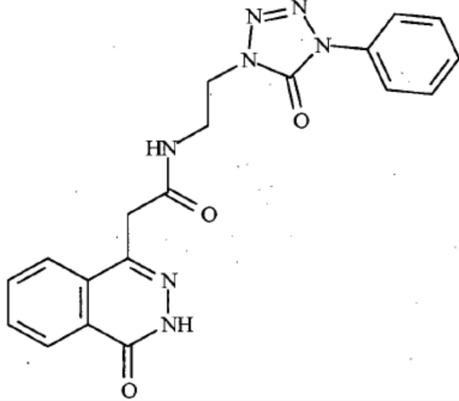
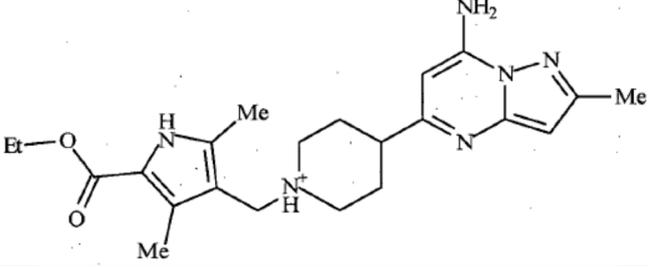
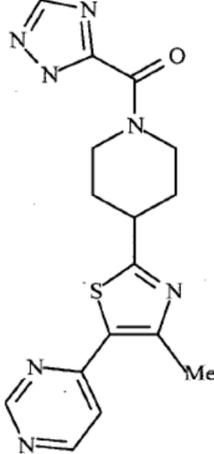
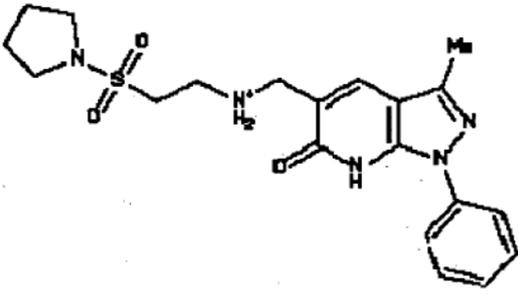
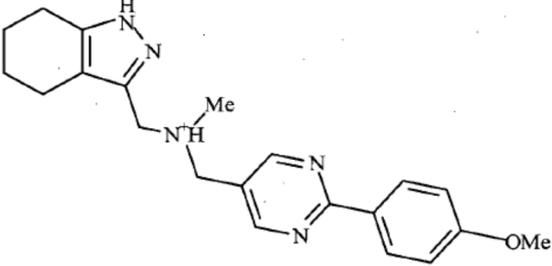
<p>Nombre de la IUPAC: ácido (3S)-3-(1H-indol-3-il)-piridin-4-ilpropanoico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-metil-2-piridin-4-il-1H-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido (2S)-1-(1-metil-2-oxobenzo[cd]indol-6-il)sulfonilpirrolidina-2-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 1-(furan-2-ilmetil)-5-oxopirrolidina-3-carboxilato de [2-[4-(furan-2-carboniloxi)fenil]-2-oxoetilo]</p>	

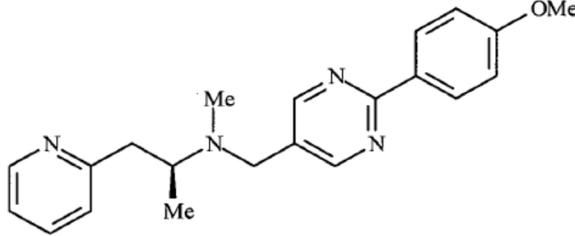
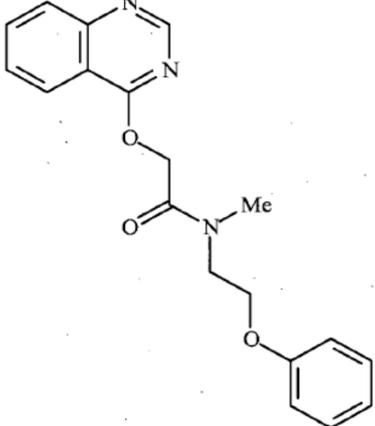
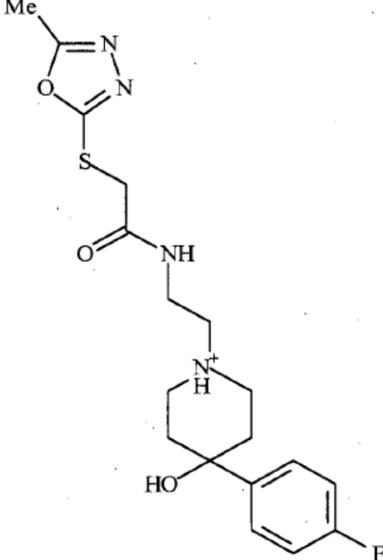
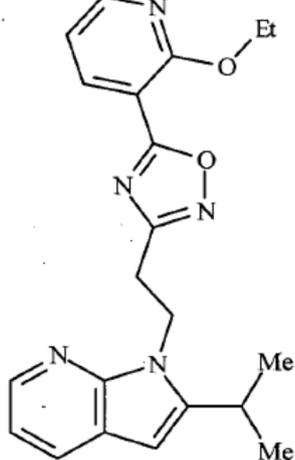
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[2-[5-(4-metoxifenil)-1H-pirazol-4-il]etenil]-6-(trifluorometil)-1H-pirimidin-2-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-hidroxi-5-[[[E)-(3-metil-5-oxo-1H-pirazol-4-ilideno)-metil]amino]-benzoato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 3-oxo-2-(piridin-4-ilmetil)-1H-isoindol-4-carboxílico</p>	
<p>ácido 8-hidroxi-[1]benzofuro[3,2-b]quinolina-11-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[[[3-metoxi-4-(tiofen-2-ilmetoxi)fenil]metilamino]-2-morfolin-4-il]benzoato</p>	

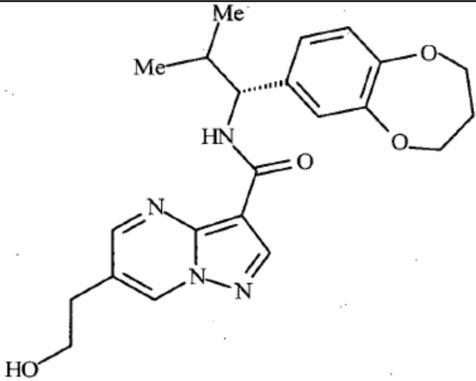
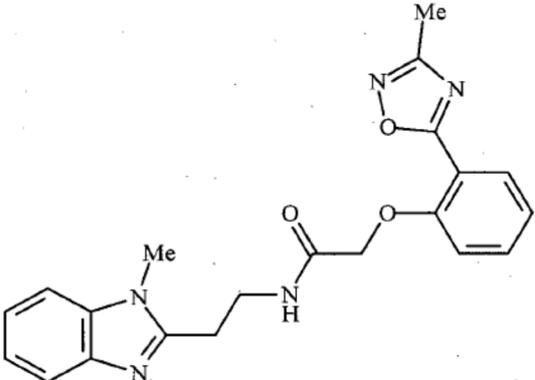
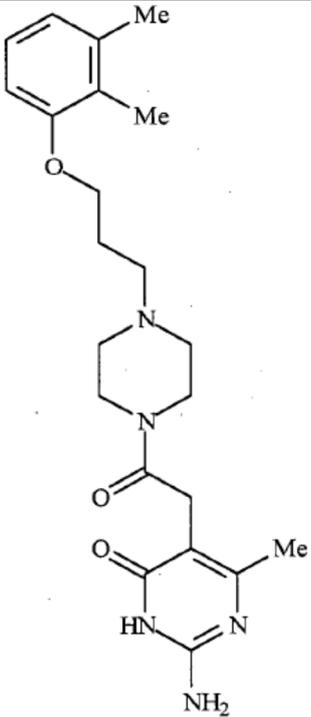
<p>ácido oxílico</p>	 <p>The structure shows a central carbon atom bonded to two nitrogen atoms, each substituted with a methyl group (Me). This central carbon is also bonded to two other carbon atoms, each part of a five-membered imidazole-like ring. The bottom-most carbon atom is substituted with a carboxylate group (COO⁻).</p>
<p>(3R)-4-ceto-3-morfolin-4-ilo-4-il-4-(2-fenoxietoxi)butirato</p>	 <p>The structure features a morpholine ring (a six-membered ring with one oxygen and one nitrogen atom). The nitrogen atom is protonated (N⁺H). Attached to the carbon adjacent to the nitrogen is a butyrate chain. The butyrate chain has a carboxylate group (COO⁻) at the end and a 2-phenoxyethoxy group (-O-CH₂-CH₂-O-C₆H₅) at the other end.</p>
<p>(3R)-4-ceto-3-morfolin-4-ilo-4-il-4-[[2-(2S)-tetrahidrofurano-2-il]metoxi]butirato</p>	 <p>The structure is similar to the previous one, featuring a protonated morpholine ring. The butyrate chain is substituted with a 2-(2S)-tetrahydrofuran-2-yl methoxy group (-O-CH₂-CH₂-O-THF) instead of the phenoxyethoxy group.</p>
<p>ácido 4-oxo-4-[2-[4-(p-tolilsulfonil)-piperacín-1-il]etoxi]butanoico</p>	 <p>The structure shows a piperazine ring (a six-membered ring with two nitrogen atoms). One nitrogen atom is protonated (N⁺H). The other nitrogen atom is substituted with a 4-methylphenylsulfonylethoxy group (-O-CH₂-CH₂-SO₂-C₆H₄-Me). The protonated nitrogen is also attached to a butyrate chain, which has a carboxylate group (COO⁻) at the end.</p>

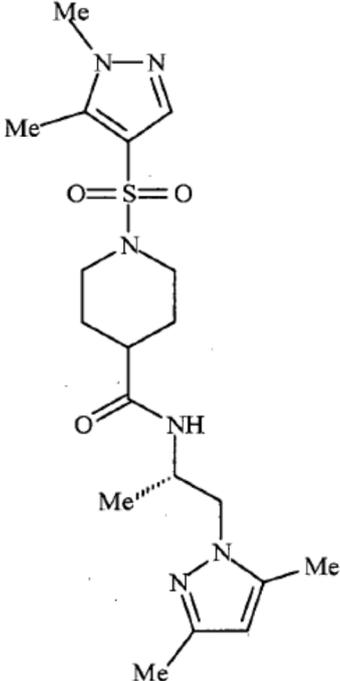
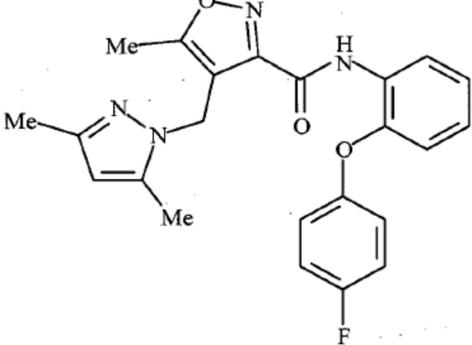
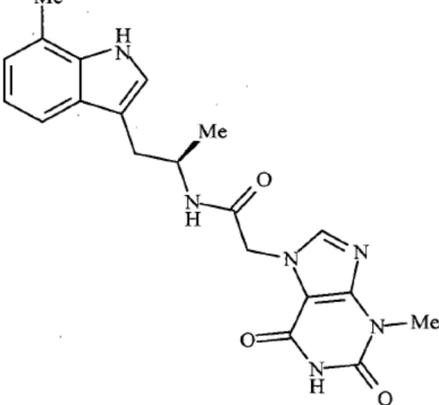
<p>Nombre de la IUPAC: 4-(3-cloro-4-fluorofenil)-3-piridin-4-il-1H-1,2,4-triazol-5-tiona</p>	
<p>3-[3-(4-piridil)-5-tioxo-1H-1,2,4-triazol-4-il]benzoico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: ácido 1-(3-fenil-adamantano-1-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-(3-hidroxifenil)-1H-1,2,4-triazol-5-tiona</p>	
<p>(dimetilBLAHil)-metil</p>	

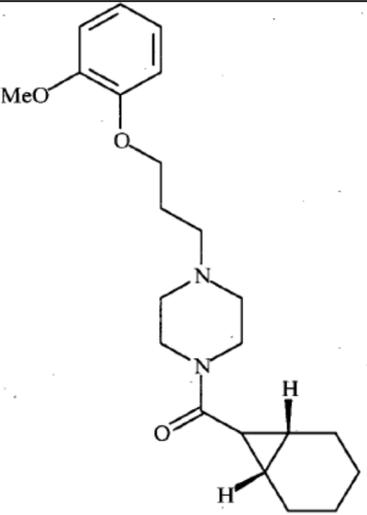
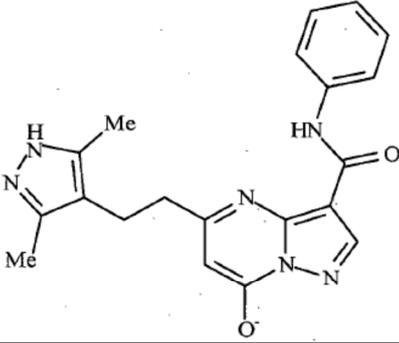
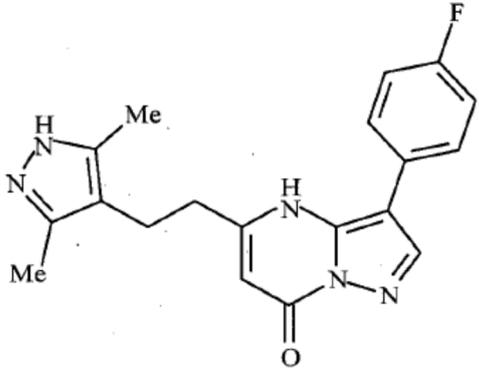
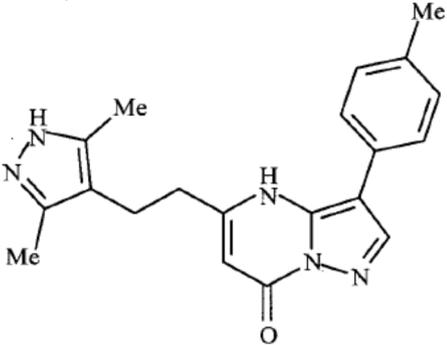
<p>Nombre de la IUPAC: N-[1-(3-imidazol-1-ilpropilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il]-2-[(4-metoxi-benzoil)amino]benzamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 1-etil-3-metil-2-oxoquinoxalina-6-carboxilato</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-(4-oxo-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)propanoato</p>	
<p>3-(benzotriazol-1-il)-1-[(3R)-3-[4-(3-metilisoxazol-5-il)-2H-pirazol-3-il]-1-piperidil]-propan-1-ona</p>	

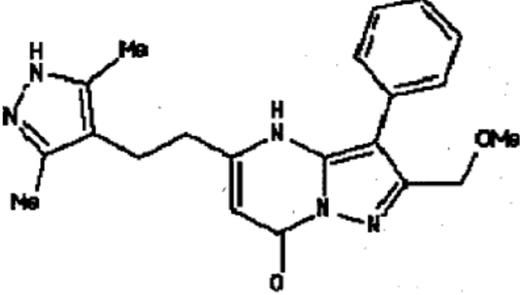
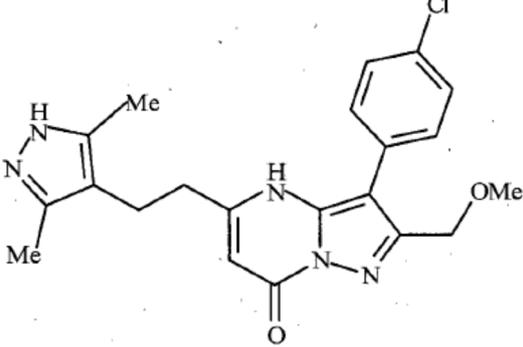
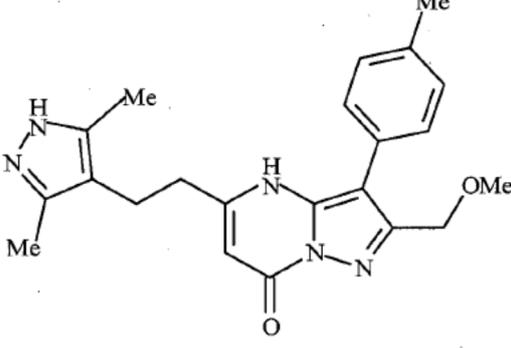
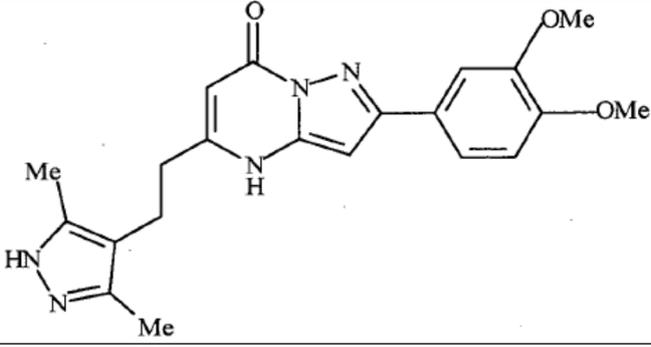
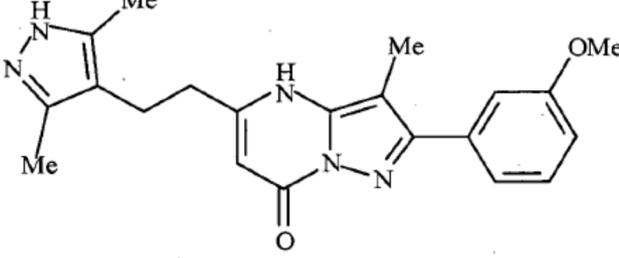
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2-(5-oxo-4-feniltetrazol-1-il)etil]-2-(4-oxo-3H-ftalacin-1-il)acetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[[4-(7-amino-2-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piperidin-1-il]metil]-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-carboxilato de etilo</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: [4-(4-metil-5-pirimidin-4-il-1,3-tiazol-2-il)piperidin-1-il]-(1H-1,2,4-triazol-5-il)metanona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-metil-1-fenil-5-[(2-pirrolidin-1-ilsulfoniletilamino)metil]-2H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-ona</p>	
<p>1-[2-(4-metoxi-fenil)pirimidin-5-il]-N-metil-N-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-indazol-3-ilmetil)metanamina</p>	

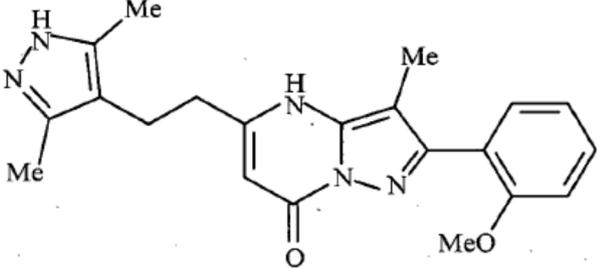
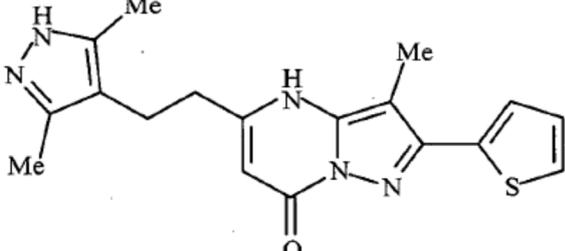
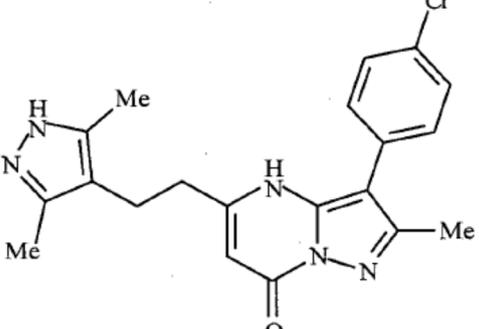
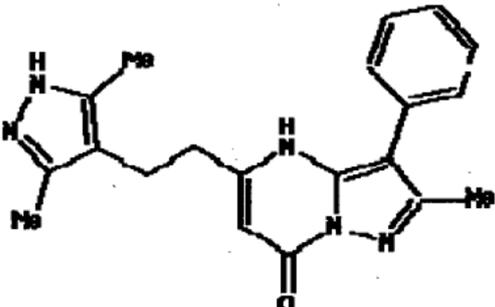
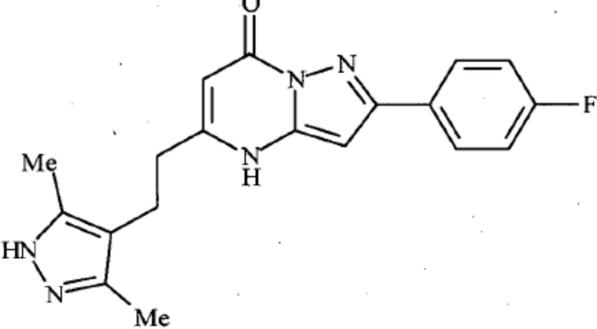
<p>Nombre de la IUPAC: N-[[2-(4-metoxifenil)pirimidin-5-il]metil]-N-metil-1-piridin-2-ilpropan-2-amina</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-metil-N-(2-fenoxietil)-2-quinazolin-4-iloxiacetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2-[4-(4-fluorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il]etil]-2-[(5-metil-1,3,4-oxadiazol-2-il)sulfanil]-acetamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-(2-etoxipiridin-3-il)-3-[2-(2-propan-2-ilpirrolo[2,3-b]piridin-1-il)etil]-1,2,4-oxadiazol</p>	

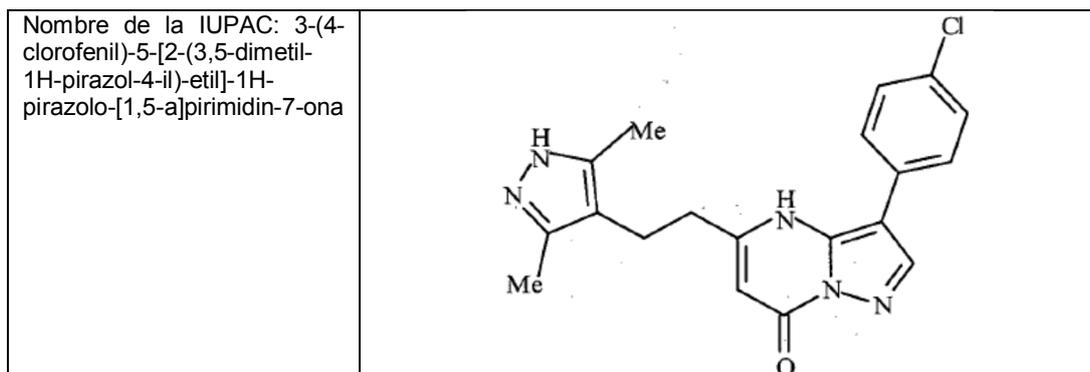
<p>Nombre de la IUPAC: N-[1-(3,4-dihidro-2H-1,5-benzodioxepin-7-il)-2-metilpropil]-6-(2-hidroxi-etil)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: N-[2-(1-metil-benzimidazol-2-il)etil]-2-[2-(3-metil-1,2,4-oxadiazol-5-il)fenoxi]-acetamida</p>	
<p>2-amino-5-[2-[4-[3-(2,3-dimetil-fenoxi)propil]-piperacina-1-il]-2-oxo-etil]-6-metil-3H-pyrimidin-4-</p>	

<p>Nombre de la IUPAC: N-[1-(3,5-dimetil-pirazol-1-il)propan-2-il]-1-(1,5-dimetilpirazol-4-il)sulfonilpiperidina-4-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 4-[(3,5-dimetil-pirazol-1-il)metil]-N-[2-(4-fluorofenoxi)-fenil]-5-metil-1,2-oxazol-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 2-(3-metil-2,6-dioxopurin-7-il)-N-[1-(7-metil-1H-indol-3-il)propan-2-il]acetamida</p>	

<p>Nombre de la IUPAC: 7-biciclo[4.1.0]-heptanil-[4-[3-(2-metoxifenoxi)-propil]piperacin-1-il]metanona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-7-oxo-N-fenil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-etil]-3-(4-fluoro-fenil)-1H-pirazolo-[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-3-(4-metilfenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	

<p>Nombre de la IUPAC: 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-etil]-2-(metoxi-metil)-3-fenil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-(4-clorofenil)-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(metoximetil)-1H-pirazolo[1,5-a]-pirimidin-7-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(metoximetil)-3-(4-metilfenil)-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	
<p>2-(3,4-dimetoxi-fenil)-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]pirazolo-[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>	
<p>5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(3-metoxifenil)-3-metil-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>	

<p>5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(2-metoxifenil)-3-metil-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>	
<p>5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-3-metil-2-(2-tienil)pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 3-(4-clorofenil)-5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-etil]-2-metil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	
<p>Nombre de la IUPAC: 5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-etil]-2-metil-3-fenil-1H-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-ona</p>	
<p>5-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)etil]-2-(4-fluorofenil)-pirazolo[5,1-b]pirimidin-7-ol</p>	



Los compuestos de la tabla 1 se pueden encontrar en <http://zinc.docking.org>.

5 La figura 17 da una visión global de los efectos inhibidores de estos compuestos inhibidores pequeños sobre la proteína MKK4 en relación a la inhibición por genisteína (referencia).

10 Los ensayos in vitro según el ejemplo 4 y los ensayos in vivo según el ejemplo 6 pudieron mostrar que estos compuestos inhibidores pequeños son adecuados para uso como un medicamento para el tratamiento de insuficiencia hepática y/o para la protección de hepatocitos contra apoptosis y/o para la regeneración de hepatocitos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto, que es un inhibidor de la actividad quinasa de MKK4, MKK4 que está codificada por el ARNm de SEQ ID NO: 1204,
para uso como un medicamento en el tratamiento de insuficiencia hepática y/o en el tratamiento de función hepática deteriorada y/o para aumentar la regeneración de tejido hepático en un paciente, en donde el compuesto no es genisteína, miricitina o SP600125.
- 10 2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es un ARNip que contiene un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones fisiológicas con el ARNm de SEQ ID NO: 1204.
- 15 3. El compuesto para uso según la reivindicación 2, en donde el oligonucleótido se selecciona del grupo que comprende de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 1203.
- 20 4. El compuesto para uso según la reivindicación 2 o 3, en donde el oligonucleótido está comprendido como una primera sección en una construcción de ácido nucleico que contiene una segunda sección que es complementaria inversa a la primera sección.
- 25 5. El compuesto para uso según la cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el oligonucleótido está dispuesto bajo el control de un promotor en un casete de expresión.
6. El compuesto para uso según la cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el oligonucleótido está contenido en una formulación de liposomas y/o en un vector vírico que está empaquetado en una partícula vírica o en una partícula similar a virus.
- 30 7. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona de los compuestos de la tabla 1.
8. El compuesto para uso según la cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto se formula como liposomas o nanopartículas lipídicas.
- 35 9. Hepatocito cultivado para uso en el tratamiento de insuficiencia hepática, caracterizado porque el hepatocito contiene un compuesto que es un inhibidor de la actividad quinasa de MKK4, MKK4 que está codificada por SEQ ID NO: 1204, en donde el compuesto no es genisteína, miricitina o SP600125.
- 40 10. El hepatocito cultivado para uso según la reivindicación 9, en donde el hepatocito es para uso como un medicamento para el tratamiento de insuficiencia hepática o para regeneración hepática.
- 45 11. El hepatocito cultivado para uso según la reivindicación 9 o 10, en donde el hepatocito se dispone en un recipiente que tiene un puerto de entrada de sangre de un paciente y un puerto de salida para recircular la sangre al paciente.
- 50 12. El hepatocito cultivado para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el compuesto se selecciona del grupo que comprende los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 1203 y los compuestos de la tabla 1.
- 55 13. Proceso para la producción de hepatocitos por cultivo en un medio de cultivo celular, caracterizado porque, durante el cultivo, los hepatocitos se ponen en contacto con un compuesto que es un inhibidor de la actividad quinasa de MKK4, MKK4 que está codificada por el ARNm de SEQ ID NO: 1204, en donde el compuesto no es genisteína, miricitina o SP600125.
- 60 14. El proceso según la reivindicación 13, en donde el compuesto es un ARNip que contiene un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones fisiológicas con el ARNm de SEQ ID NO: 1204.
15. El proceso según la reivindicación 14, en donde el oligonucleótido se selecciona del grupo que comprende cada una de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 1203.
16. El proceso según la reivindicación 13, en donde el oligonucleótido se selecciona de los compuestos de la tabla 1.

Fig. 1

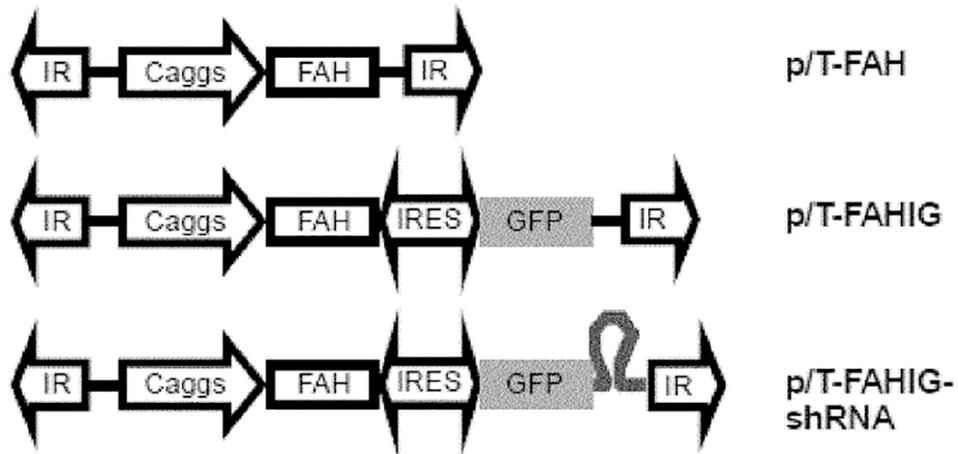


Fig. 2

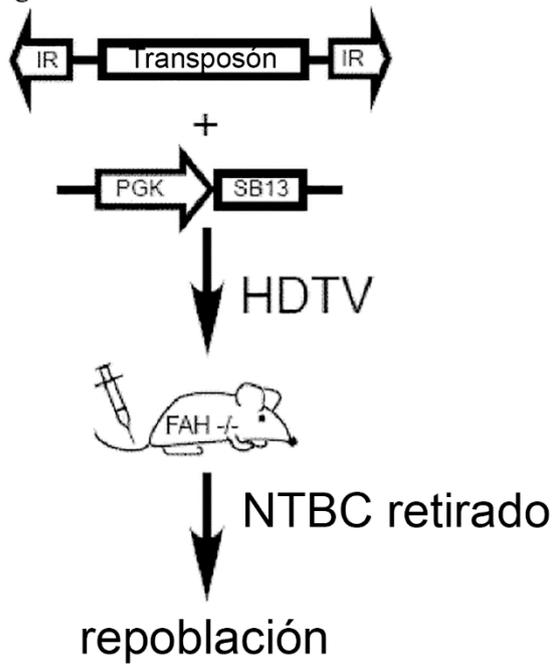


Fig. 3

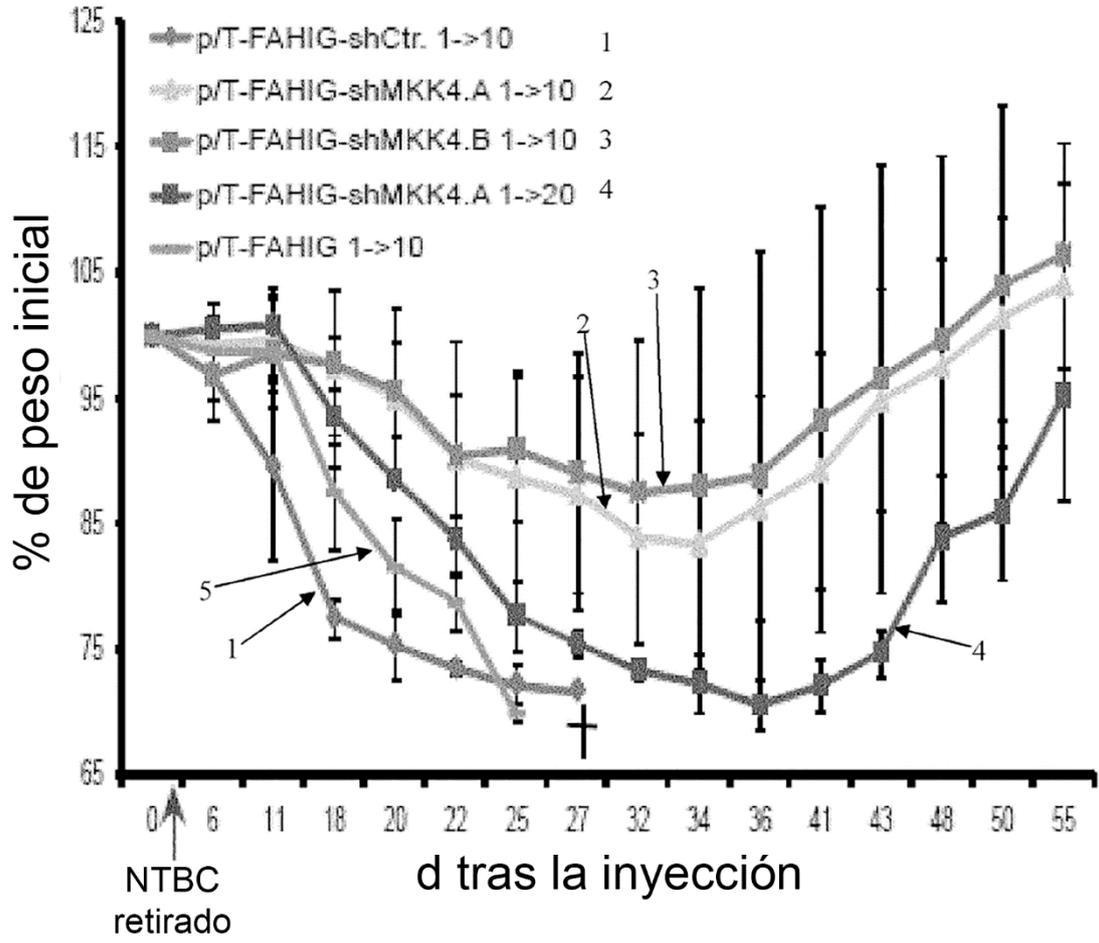


Fig. 4

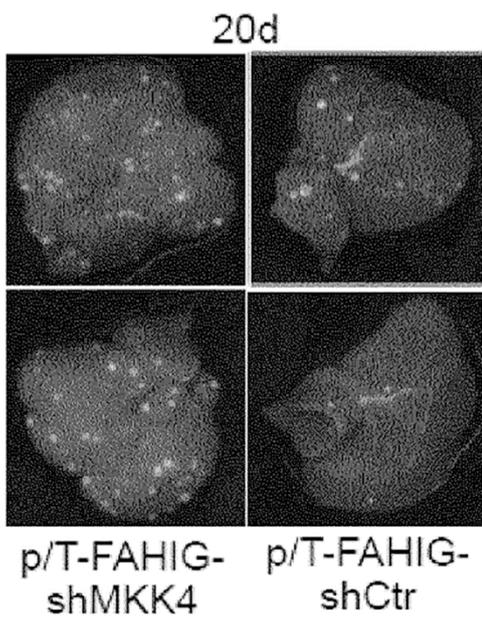


Fig. 5

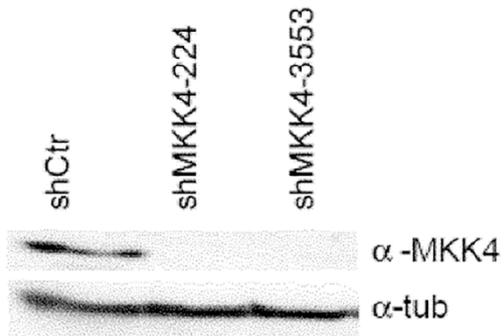


Fig. 6

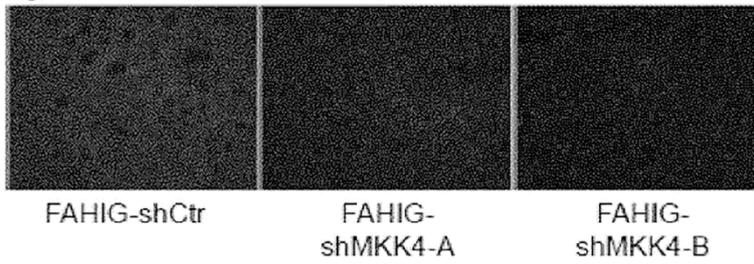


Fig. 7

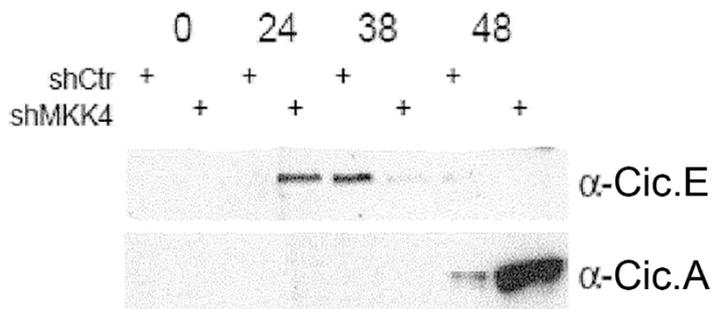


Fig. 8

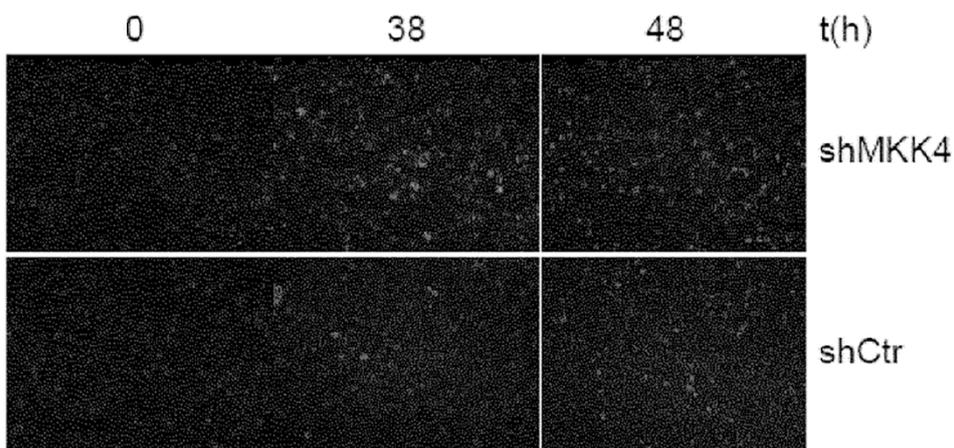


Fig. 9

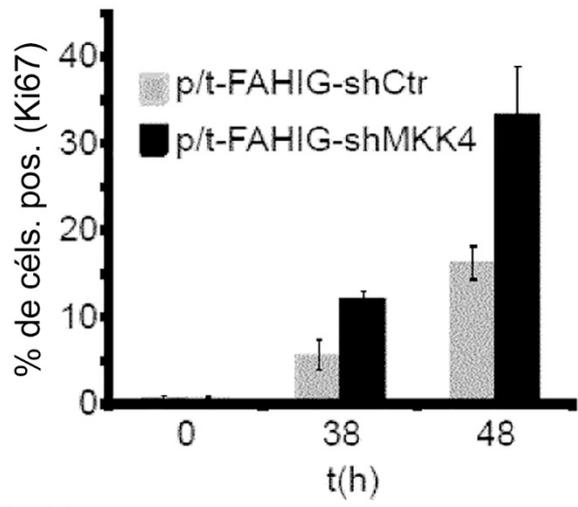


Fig. 10

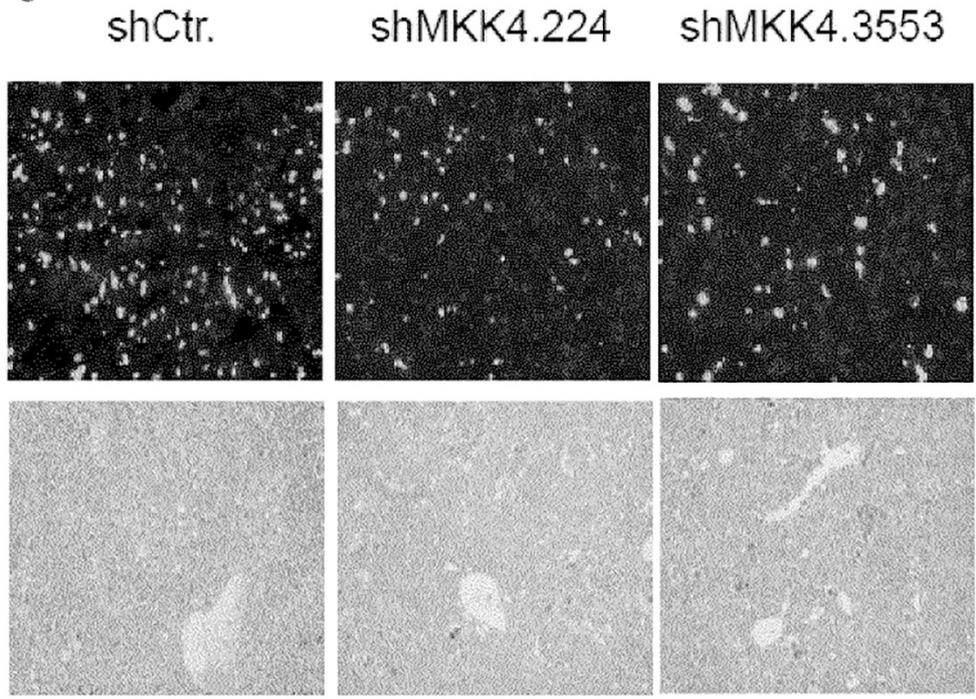


Fig. 11

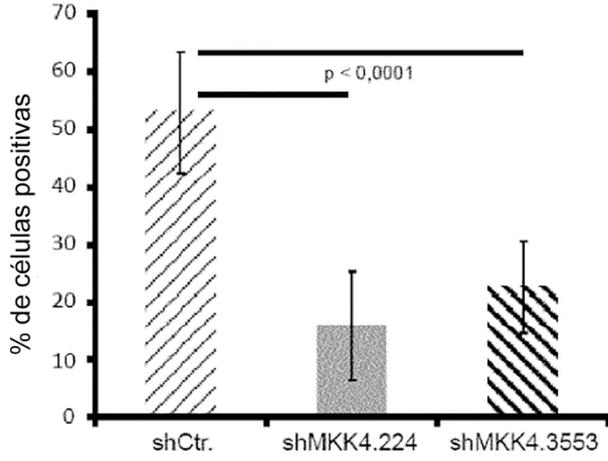


Fig. 12

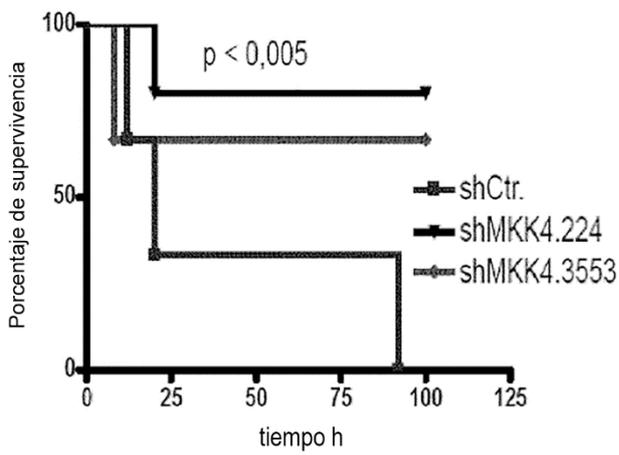


Fig. 13

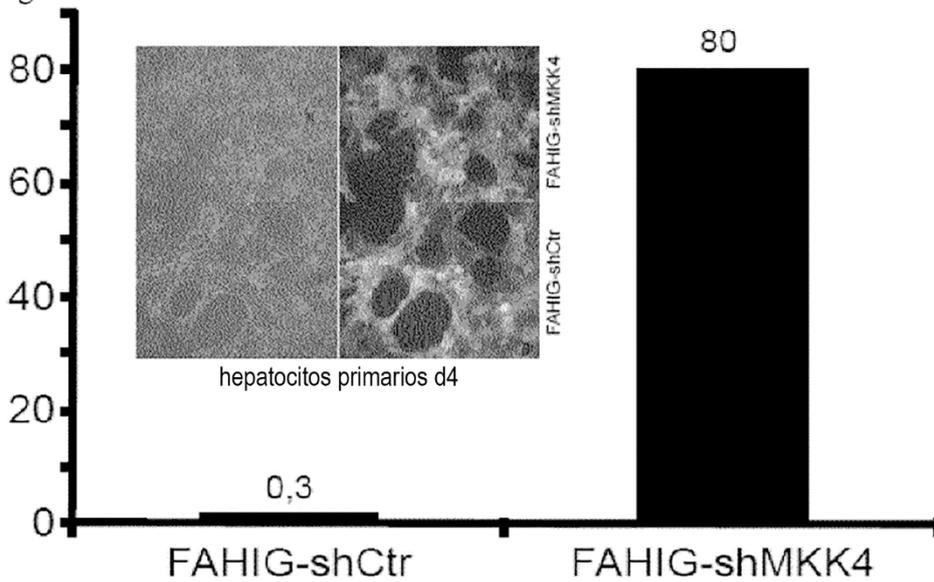


Fig. 14

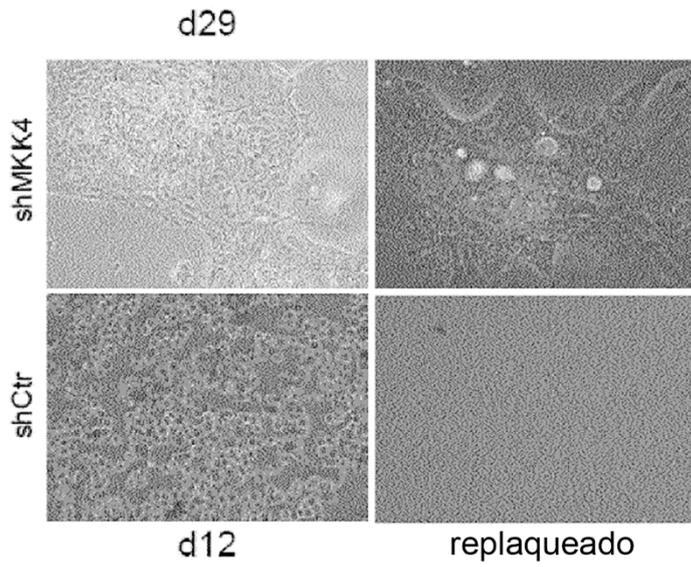


Fig. 15

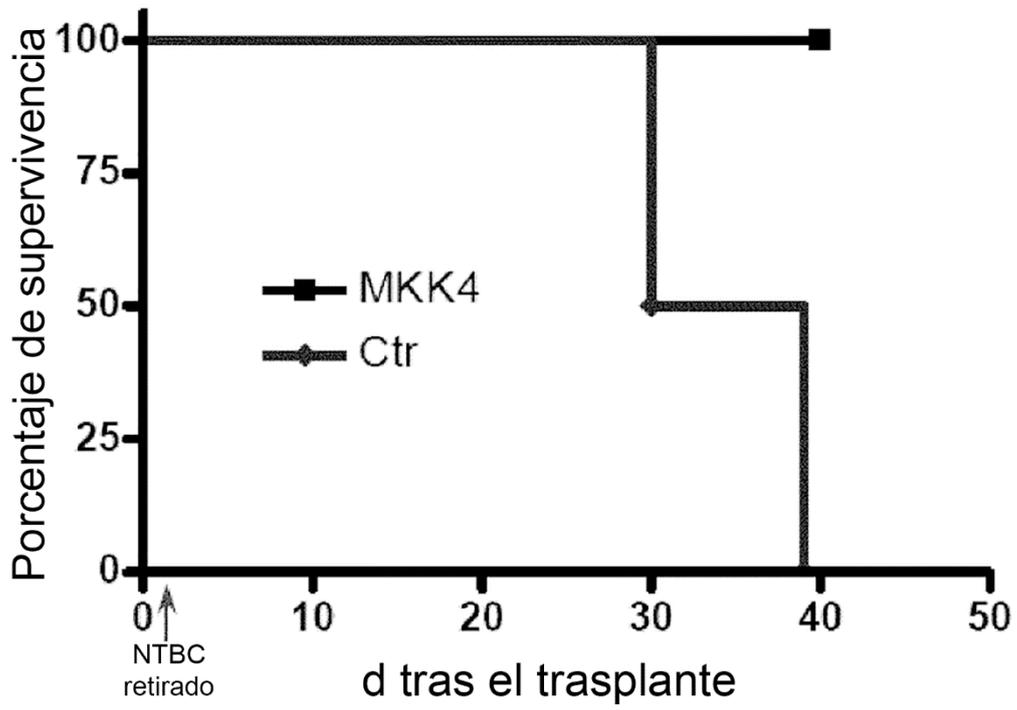


Fig. 16

