(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 739 637**

(51) Int. CI.:

A61K 31/396 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2014 PCT/EP2014/075980**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15079031**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2014 E 14808905 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3074007**

(54) Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de beta-talasemias**

(30) Prioridad:

28.11.2013 EP 13306628

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2020

(73) Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (20.0%);
FONDATION IMAGINE (20.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%)

(72) Inventor/es:

HERMINE, OLIVIER;
GUILLEM, FLAVIA;
ARLET, JEAN-BENOÎT y
COURTOIS, GENEVIÈVE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de beta-talasemias

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de beta-talasemias.

Fundamentos de la invención.

La Hg de mamífero adulto es una proteína multimérica que incluye dos cadenas de globina α y dos de β que forman juntas la molécula de hemoglobina (Hb) tetramérica $(\alpha/\beta)_2$. Las beta-talasemias son un grupo de trastornos sanguíneos hereditarios causados por un defecto cuantitativo en la síntesis de las cadenas β de la hemoglobina. En individuos con este trastorno, la síntesis de cadenas de β-globina está reducida o ausente. Se han descrito tres formas principales de la enfermedad: β-talasemia mayor (β-TM o β^0-TM) en la que no se produce ninguna cadena β, y β-talasemia intermedia y β-talasemia menor, en las que se produce la cadena β pero en cantidades inferiores a lo normal. Estas condiciones causan fenotipos variables que van desde anemia severa hasta individuos clínicamente asintomáticos. Los individuos con β-TM aparecen normalmente en los dos primeros años de vida con anemia severa, crecimiento deficiente y anomalías esqueléticas durante la infancia. Los niños afectados necesitarán transfusiones de sangre toda su vida. La β-talasemia intermedia es menos grave que la β-talasemia mayor y puede requerir transfusiones de sangre episódicas. Los pacientes dependientes de transfusiones desarrollarán una sobrecarga de hierro y requerirán una terapia de quelación para eliminar el exceso de hierro.

A pesar del amplio conocimiento de los defectos moleculares que causan la β-talasemia mayor (TM), se sabe menos sobre los mecanismos responsables de una eritropoyesis ineficaz. Esta última se caracteriza por el aceleramiento de la diferenciación eritroide, apoptosis y detención de la maduración en la etapa policromatofílica. Explica, al menos en parte, la profunda anemia observada en esta enfermedad. Aunque se ha propuesto que tanto la precipitación de cadenas de globina no coincidentes como la acumulación de hierro no unido podrían conducir a estrés oxidativo y subsiguiente hemólisis, sigue sin aclararse el mecanismo por el cual se induce la apoptosis y la detención de la maduración.

Los presentes inventores han esclarecido las consecuencias de una acumulación citoplásmica de cadena α y la cascada de reacciones fallidas que resultan de ella que en última instancia causan síntomas de β-TM tales como la anemia. El descubrimiento se basa en la aclaración adicional de las funciones de la proteína chaperona HSP70 y la proteína de maduración de eritrocitos GATA-1 (https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper48181.html). Los presentes inventores han descubierto que la HSP70 tiene funciones importantes tanto en el citoplasma como en el núcleo de los eritroblastos. Una función primaria de la HSP70 en el núcleo es unirse a la proteína GATA-1 y prevenir su escisión y degradación proteolítica (por la proteasa caspasa-3). La HSP70 evita así la inactivación de GATA-1 y preserva su función como factor clave en la maduración de eritrocitos. Una función secundaria de la HSP70 es unirse a una globina en el citoplasma y asegurar que las cadenas de proteínas estén adecuadamente plegadas y puedan formar Hb $(\alpha/\beta)_2$ tetraméricas. Normalmente, hay suficiente HSP70 disponible en la célula para llevar a cabo estas dos funciones. Sin embargo, en las células β-TM, la HSP70 está monopolizada por el exceso de cadenas α libres que se acumulan en el citoplasma. Por lo tanto, una cantidad desproporcionada de HSP70 es secuestrada en el citoplasma, y no hay suficiente HSP70 disponible para unirse y proteger GATA-1 en el núcleo. La GATA-1 no protegida se escinde y se inactiva proteolíticamente y no tiene lugar una maduración adecuada de los eritrocitos. Más bien, la ausencia de GATA-1 activa da como resultado la detención de la maduración y la apoptosis de eritrocitos inmaduros en la etapa policromatofílica. Por tanto, esta secuencia de eventos se desencadena inicialmente por falta de cadenas β de hemoglobina y, en última instancia, tiene por resultado una producción baja (o nula) de eritrocitos, provocándose anemia.

Sumario de la invención.

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de beta-talasemias. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas diseñadas para intervenir en este proceso deficiente y para promover o restablecer la maduración de eritrocitos en individuos que sufren de β-TM. Se observa que, debido a que la globina β no se forma en los eritrocitos β-TM, el tipo de eritrocitos que se producen en individuos tratados con los métodos y composiciones descritos en el presente documento contienen $(\alpha/\gamma)_2$ Hb, y la invención proporciona métodos y composiciones para aumentar la producción de eritrocitos de $(\alpha/\gamma)_2$ Hb en células β-TM e individuos β-TM. Los métodos implican mantener la actividad de GATA-1 a través de la prevención de la exportación nuclear de HSP70 en el citoplasma. Por consiguiente, un objeto de esta invención es proporcionar métodos para restablecer o incrementar la maduración de eritrocitos en un sujeto que padece β-talasemia mayor (β-TM) mediante

la prevención de la inactivación proteolítica de GATA-1. En algunas realizaciones, la prevención se logra administrando al sujeto un compuesto que inhibe el transportador nuclear XPO1.

La presente invención se refiere a un inhibidor de XPO1 para su uso en un método para el tratamiento de la beta-talasemia en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

La presente invención se refiere a un inhibidor de XPO1 para uso en un método para promover o restablecer la maduración de eritrocitos en un sujeto que padece beta-talasemia.

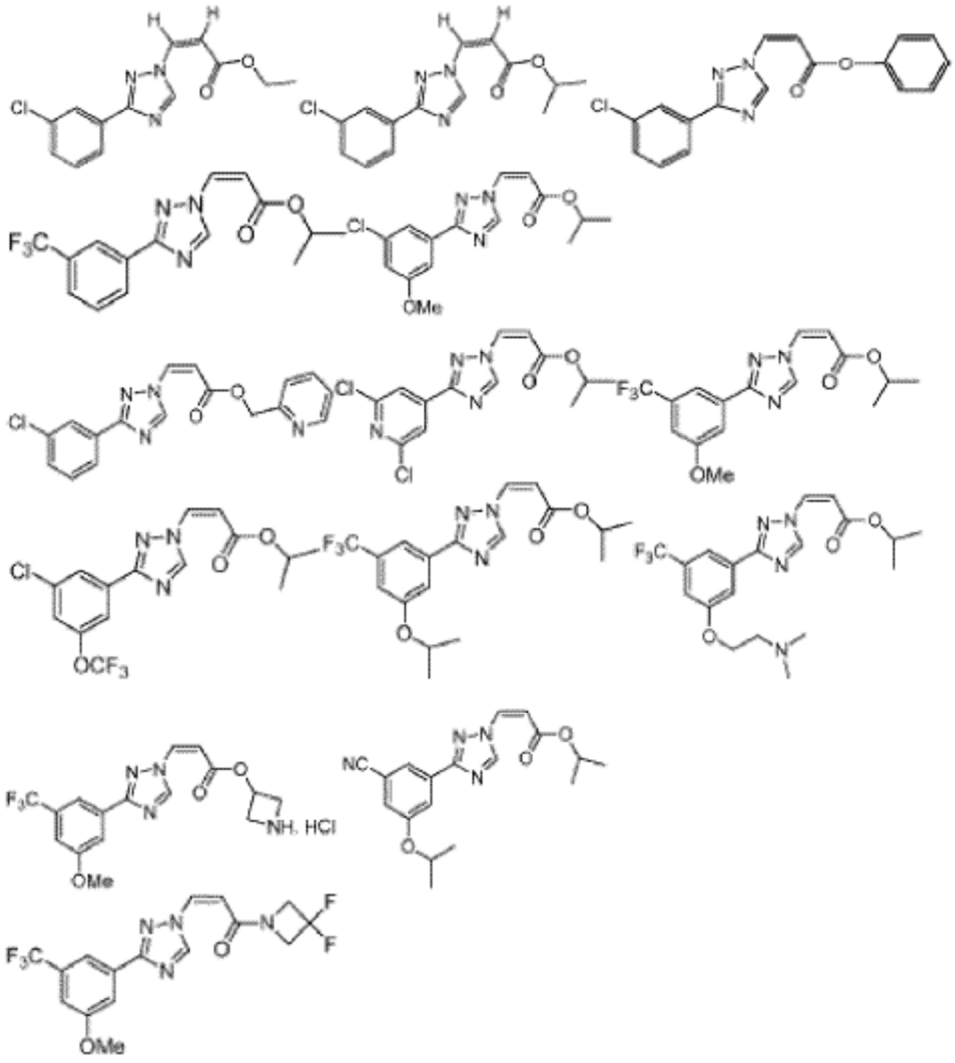
La presente invención se refiere a un inhibidor de XPO1 para uso en un método para aumentar la producción de eritrocitos $(\alpha/\gamma)_2$ Hb en un sujeto que padece beta-talasemia.

Como se usa en el presente documento, el término "XPO1" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína exportina 1. La proteína media en el transporte de proteínas dependiente de la señal de exportación nuclear (NES) rica en leucina. La proteína también se llama Mantenimiento de la Región Cromosómica 1 (Crm1).

Como se usa en este documento, el término "inhibidor de XPO1" designa cualquier compuesto o tratamiento que reduce o bloquea la actividad de XPO1. El término también incluye inhibidores de la expresión XPO1.

Los inhibidores de XPO1 son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones de la invención, el inhibidor de XPO1 se selecciona entre compuestos de molécula pequeña que se han descrito en las publicaciones WO2011109799, WO2012099807, WO2013020024, WO 2013019548 y WO2013019561.

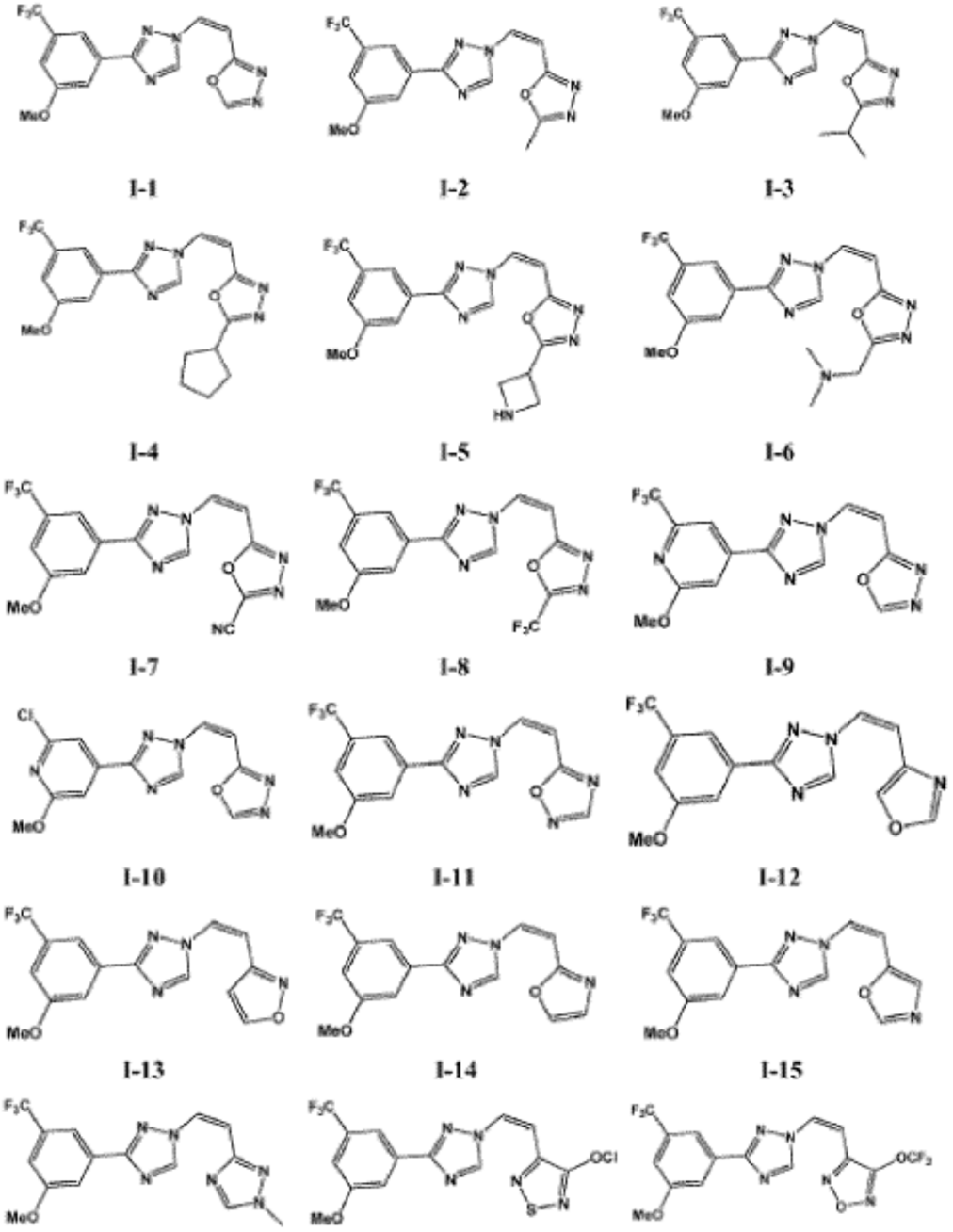
En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en los siguientes compuestos:

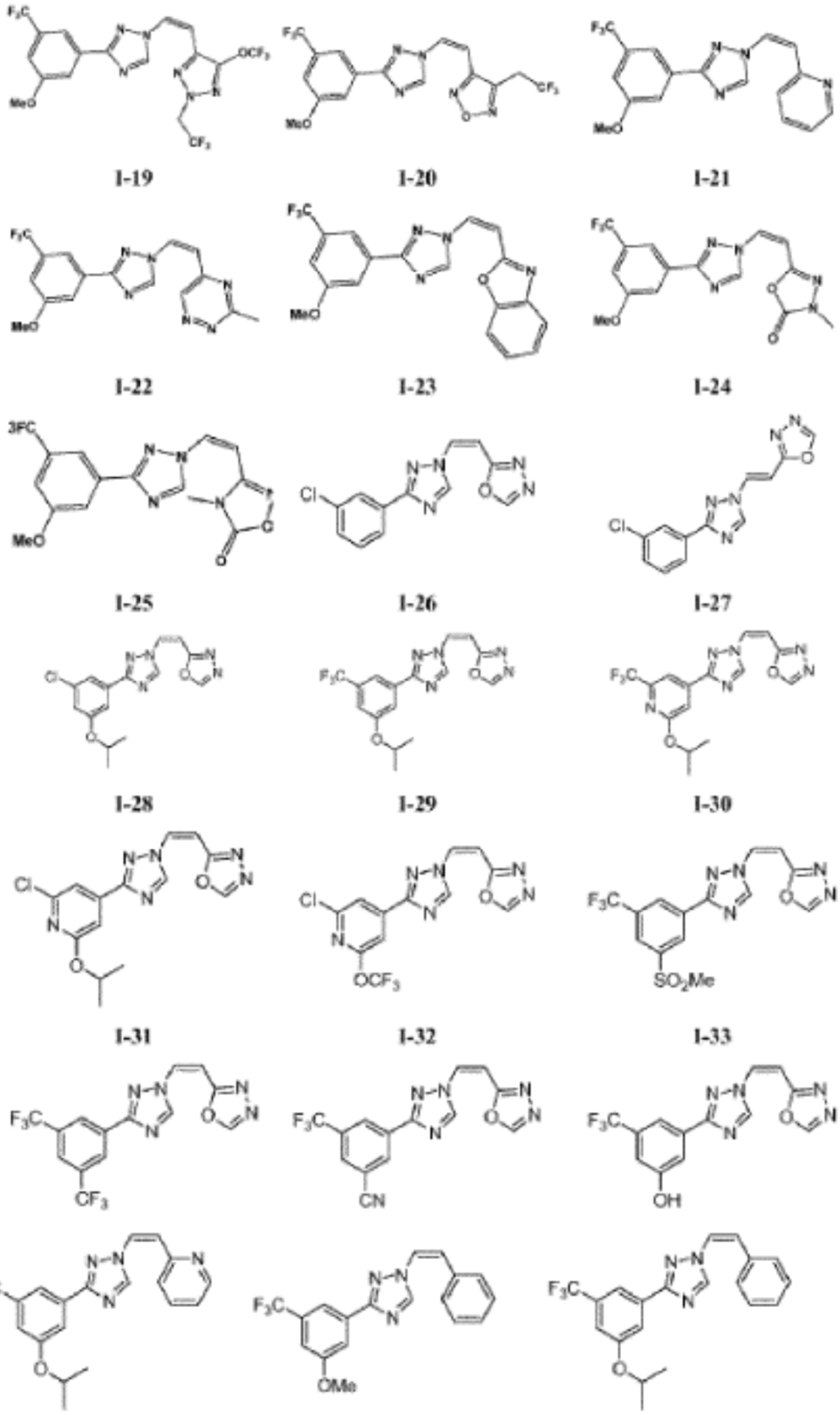


y sales de los mismos aceptables farmacéuticamente.

En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en éster etílico del ácido (Z)-3-[3-(3-cloro-fenil)-[1,2,4]-triazol-1-il]-acrílico; éster etílico del ácido (E)-3-[3-(3-cloro-fenil)-[1,2,4]-triazol-1-il]-acrílico; éster isopropílico del ácido (Z)-3- [3-(3-cloro-fenil)- [1,2,4] -triazol-1-il]-acrílico; éster isopropílico del ácido (E) -3-[3- (3-cloro-fenil)-[1,2,4] -triazol-1-il]-acrílico; éster terc-butílico del ácido (Z)-3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrílico; éster terc-butílico del ácido (Z) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrílico; (E) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4]-triazol-1-il] -N-fenil-acrilamida; (E)-N-(2-cloro-fenil) -3- [3- (3-cloro-fenil)-[1,2,4] -triazol-1-il]-acrilamida; éster terc-butílico del ácido (4- {(E)-3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acriloilamino} -fenil)-carbámico; (E)-3-[3-(3-cloro-fenil)-[1,2,4]-triazol-1-il]-N-(4-metoxi-fenil) -acrilamida; (E)-3- [3- (3-cloro-fenil)-[1,2,4]-triazol-1-il]-N-metil-N-fenil-acrilamida; (E) -3- [3-(3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -N-metil-N-fenil-acrilamida; (E) -N- (4-amino-fenil) -3- [3- (3-cloro-fenil)-[1,2,4] -triazol-1-il]-acrilamida y/o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos:



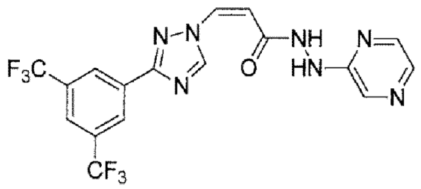


o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

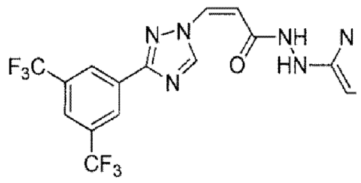
En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 se selecciona del grupo que consiste en un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en 1-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2,5-diona; 1-(4-bromo-2,5-difluorofenil) -1H-pirrol-2,5-diona;

3-metil-1-(1-metil-1H-pirazol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona; 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(5-metilisoxazol-3-il) bencenosulfonamida; 1- (3-benzoil-4-metiltiofen-2-il)-1H-pirrol-2,5-diona; 1-(4- (3- (trifluorometil) -1H-pirazol-1-il) fenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1-(4- (4-clorofenil) tiazol-2-il) -3-metil-1H-pirrol-2,5-diona; 1- (benzo [b] tiofen-3-ilmetil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (3,4-dimetoxifenetil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (naftalen-1-il) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-ciclohexilfenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1-(2-benzoilfenil)-1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-morfolinofenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-clorofenetil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (2- (tiofen-2-il) etil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1 - ([3,4] metilendioxibencil) -1H-pirrol-2,5-diona amida y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

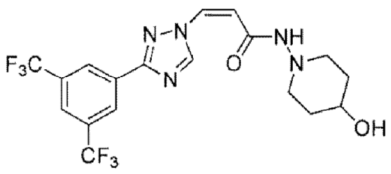
En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en los siguientes compuestos:



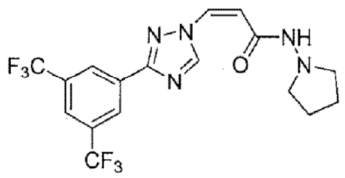
I-3,



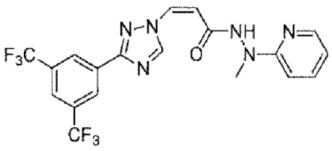
I-4,



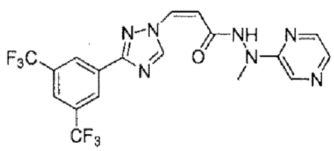
I-5,



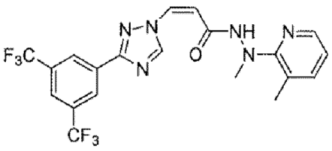
I-6,



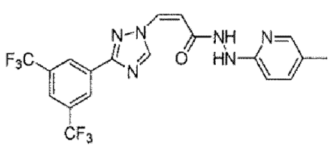
I-7,



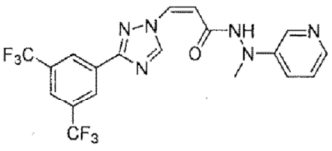
I-8,



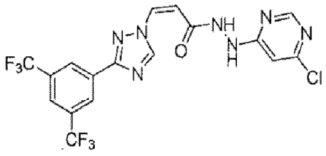
I-9,



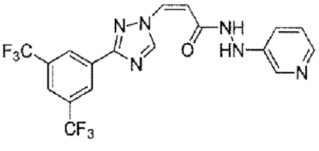
I-10,



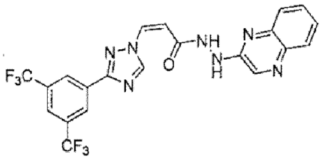
I-11,



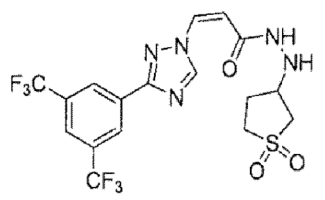
I-12,



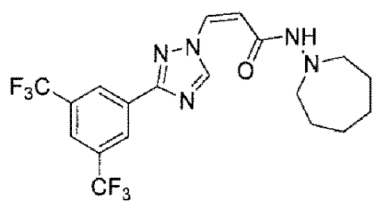
I-13,



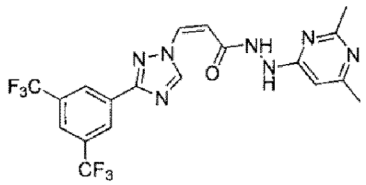
I-14,



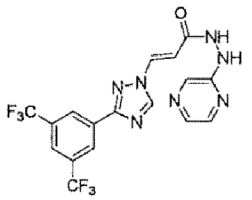
I-15,



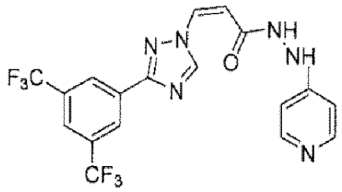
I-16,



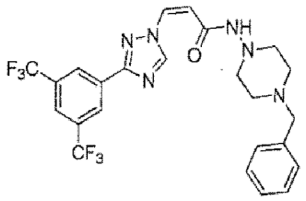
I-17,



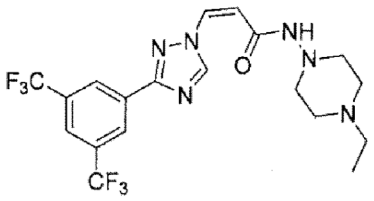
I-18,



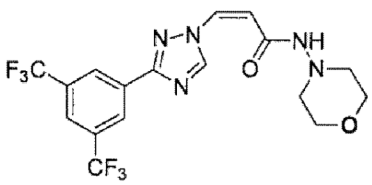
I-19,



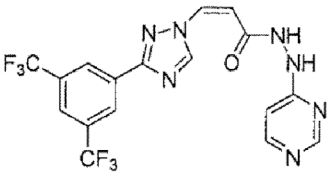
I-20,



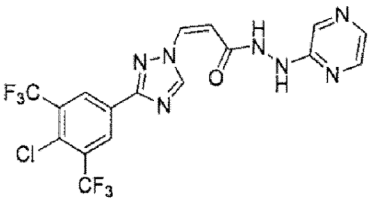
I-21,



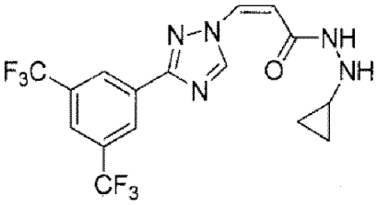
I-22,



I-23,

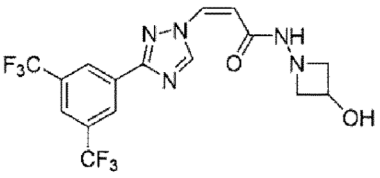


I-24,



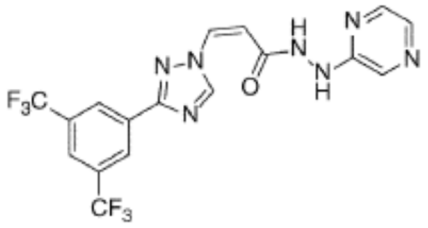
I-25

o



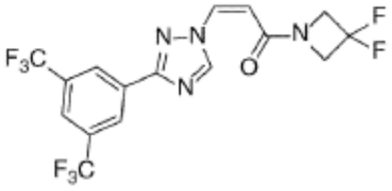
I-26.

En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 es KPT-330 (Etchin J, Sanda T, Mansour MR, Kentsis A, Montero J, Le BT, Christie AL, McCauley D, Rodig SJ, Kauffman M, Shacham S, Stone R, Letai A , Kung AL, Thomas Look A. El inhibidor KPT-330 de la exportación nuclear mediada por CRM1 (XPO1) tiene actividad anti-leucémica selectiva en modelos preclínicos de leucemia linfoblástica aguda de células T y leucemia mieloide aguda. Br J Haematol. 2013 abril; 161; (1): 117-27. Doi : 10.1111 / bjh.12231. Epub 4 de febrero 2013).



KPT-330

En algunas realizaciones, el inhibidor de XPO1 es KPT-276 (Schmidt J, Braggio E, Kortuem KM, Egan JB, Zhu YX, Xin CS, Tiedemann RE, Palmer SE, Garbitt VM, McCauley D, Kauffman M, Shacham S, Chesi M, Bergsagel PL, Stewart A K. Los estudios de todo el genoma en mieloma múltiple identifican XPO1/CRM1 como una diana crítica validada utilizando el inhibidor selectivo de la exportación nuclear KPT-276. Leucemia. 11 Jun. 2013. doi : 10.1038 / leu.2013.172.).



KPT-276

Un "inhibidor de la expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen.

En una realización preferida de la invención, dicho inhibidor de la expresión génica es un siRNA, un oligonucleótido antisentido o una ribozima.

Los inhibidores de la expresión génica para uso en la presente invención pueden basarse en constructos de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluidas moléculas de RNA antisentido y moléculas de DNA antisentido, actuarían bloqueando directamente la traducción del mRNA seleccionado al unirse al mismo y evitar así la traducción de proteínas o aumentar la degradación del mRNA, disminuyendo así el nivel de la proteína diana (es decir, XPO1), y por tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcripción de mRNA que codifica la proteína diana, por ejemplo mediante técnicas de fosfodiéster convencionales, y ser administrados por ejemplo por inyección intravenosa o infusión. Los métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce, son bien conocidos en la técnica (p. ej., véanse las patentes de EE. UU. nº 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

Los RNAs inhibitorios pequeños (siRNAs) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión génica para su uso en la presente invención. La expresión génica se puede reducir al poner en contacto el tumor, el sujeto o la célula con un pequeño RNA bicatenario (RNAds), o un vector o construcción que cause la producción de un pequeño RNA bicatenario, de modo que la expresión génica se inhiba específicamente (es decir, la interferencia del RNA o iRNA). Los métodos para seleccionar un dsRNA apropiado o un vector que codifique dsRNA son bien conocidos en la técnica para los genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véase Tuschi, T. et al. (1999); Elbashir, SM et al. (2001); Hannon, G J. (2002); McManus, M T. et al. (2002); Brummelkamp, T R. et al. (2002); Patentes de EE. UU. Nos. 6.573.099 y 6.506.559; y Publicación de Patente Internacional números WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión génica para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del RNA. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de la ribozima con el RNA diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima de horquilla o de cabeza de martillo construidas que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de mRNA dirigidas son por tanto útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios específicos de escisión de la ribozima dentro de cualquier diana potencial de RNA se identifican inicialmente escaneando la molécula diana para

sitios de escisión de la ribozima, que típicamente incluyen las secuencias GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de RNA de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse para determinar las características estructurales predichas, como la estructura secundaria, que pueden hacer que sea inadecuada la secuencia de oligonucleótidos. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión génica pueden prepararse por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química como, p. ej., mediante síntesis química de fosforamadita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de RNA antisentido pueden generarse por transcripción in vitro o in vivo de secuencias de DNA que codifican la molécula de RNA. Tales secuencias de DNA pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de RNA polimerasa adecuados, tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones a los oligonucleótidos de la invención como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la vida mitad. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitarse a ellas, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en vez de enlaces de fosfodiesterasa dentro del esqueleto de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos antisentido siRNAs y ribozimas de la invención se pueden administrar in vivo solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido siRNA o del ácido nucleico de la ribozima a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida en relación con la magnitud de la degradación que daría como resultado la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a ellos, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que han sido manipulados por la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido siRNA o secuencias de ácido nucleico de ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a ellos, secuencias de ácido nucleico procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la polio y virus de RNA tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no mencionados pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que se han reemplazado genes no esenciales con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej. lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del RNA viral genómico en el DNA con la integración proviral posterior en el DNA de la célula hospedadora. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral alterados genéticamente tienen una utilidad general para la transducción de genes de alta eficacia in vivo. Protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluidos las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, la transfección de una célula de empaquetamiento forrada con plásmido, la producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, la recolección de partículas virales de medios de cultivo de tejidos, y la infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en KRIEGLER (A Laboratory Manual, "W. H. Freeman C. O., New York, 1990) y en MURRY ("Methods in Molecular Biology", volumen 7, Humana Press, Inc., Cliffton, N.J., 1991).

Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adeno-asociados, que son virus de DNA de doble cadena que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adenoasociado puede ser diseñado para que sea deficiente en la replicación y es capaz de infectar una amplia gama de tipos de células y especies. Además tiene ventajas tales como estabilidad al calor y del solvente de lípido; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo las células hematopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adeno-asociado puede integrarse en el DNA celular humano de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adeno-asociados de tipo silvestre se han seguido en el cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un evento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores de plásmidos. Los vectores de plásmidos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en este campo. Véase, por ejemplo, SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, los vectores de plásmidos se han utilizado como vacunas de DNA para administrar genes que codifican antígenos a las células en vivo. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso

común incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los plásmidos pueden diseñarse a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y agregar fragmentos específicos de DNA. Los plásmidos pueden ser administrados por una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de DNA puede inyectarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También se puede administrar por medio de aerosoles o gotas intranasales, supositorios rectales, y oralmente. También se puede administrar en la epidermis o en la superficie de la mucosa con una pistola de genes. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de DNA que incluye, pero sin limitarse a ellos, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

Típicamente, el inhibidor de XPO1 se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Por "cantidad terapéuticamente efectiva" del inhibidor de XPO1 de la invención, como se describe anteriormente, se entiende una cantidad suficiente del compuesto. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance de un buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente efectiva específica para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o en coincidencia con el polipéptido específico empleado; y como factores bien conocidos en el campo médico. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica iniciar dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un amplio margen de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Generalmente, una cantidad efectiva del fármaco se suministra a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

El inhibidor de XPO1 de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o cualquier otra reacción desafortunada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según el caso. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga no sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, para animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes subcutáneos, transdérmicos, tópicos, intraperitoneales, intramusculares, intravenosos, subdérmicos, transdérmicos, formas de administración intratecal e intranasal y formas de administración rectal. Se pueden hacer adaptaciones galénicas para un suministro específico en el intestino delgado o en el colon.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que pueda ser inyectada. Estos pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente composiciones liofilizadas que, dependiendo del caso, al añadir agua o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil manipulación con jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden inhibidores de XPO1 de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo, tal como

hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El inhibidor de XPO1 de la invención se puede formular en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifusolubles, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo previamente sometida a filtración estéril.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser adecuadamente tamponada, si es necesario, y el diluyente líquido primero debe ser isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, podría disolverse una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarse a 1000 ml de líquido hipodermoclítico o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Se producirá necesariamente cierta variación en la dosis dependiendo de la condición del sujeto que está en tratamiento. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto concreto.

El inhibidor de XPO1 de la invención puede formularse en una mezcla terapéutica para que comprenda de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0, o incluso de aproximadamente 10 miligramos por dosis, poco más o menos. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los inhibidores de XPO1 de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada en la actualidad.

Un objeto adicional de la invención se refiere a un método para el cribado de un fármaco adecuado para el tratamiento de beta-talasemia, que comprende las etapas que consisten en i) proporcionar un compuesto candidato, ii) probar si el compuesto candidato es capaz de inhibir la actividad o la expresión del XPO1 y iii) seleccionar el compuesto candidato que sea capaz de inhibir la actividad o expresión de XPO1.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras.

Figura 1: Expresión del gen XPO1 en los precursores de eritroides CD36+ (inmunotransferencia) N = Núcleo, C = Citoplasma. Desde el día 3 hasta el día 6 del cultivo CD36+.

Figura 2: Expresión del gen XPO1 (y HSP70) en los precursores de eritroides CD36+ (microscopía de fluorescencia).

Figura 3A. KPT no es tóxico para los progenitores eritroides CD36+ de la sangre del cordón umbilical en el día 6 (D6) del cultivo, cuando se diluye en concentraciones 33 nM, 100 nM, 333 nM y 1000 nM en medios de cultivo CD36+, con concentraciones normales de eritropoyetina (EPO), hasta 20 h de tratamiento.

Figura 3B. La inanición de EPO durante 20 h da como resultado un 80% de muerte celular. El tratamiento de D6 CD36+ con KPT a 100 nM, 333 nM durante la inanición de EPO disminuye la muerte celular, de 49% y 39% respectivamente, en comparación con la ausencia de tratamiento con KPT.

Figura 4: KPT induce la retención nuclear de HSP70 en CD36+ D6 de la sangre del cordón umbilical, en condiciones de inanición de EPO, después de 20 h de tratamiento.

Figura 5: En las células CD36+ D8 de beta-talasemia, KPT induce la localización nuclear de HSP70 después de 72 h de tratamiento a 100 nM en comparación con las células no tratadas.

Figura 6. Las células CD36+, derivadas de células CD34+ circulantes del paciente de talasemia beta mayor, se trataron o no con una molécula KPT (KPT 0 = DMSO, KPT 100 = 100 nM, KPT 1000 = 1000 nM) y se analizaron a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de tratamiento. El día 0 de tratamiento corresponde al día 5 del cultivo CD36+. a) Proliferación de células CD36+ entre 24 h y 96 h, para las diferentes condiciones de tratamiento con KPT. b) Muerte celular de células CD36+ entre 48 h y 96 h, para las diferentes condiciones de tratamiento con KPT. c) Análisis de citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) para la proteína Banda 3, en células CD36+, en las diferentes condiciones de tratamiento con KPT. d) Recuento de MGG de inmaduros, policromatófilos y acidófilos + reticulocitos a las 96 h de tratamiento, para las diferentes condiciones del tratamiento con KPT y e) índices de maduración correspondientes.

Figura 7: células CD36+, derivadas de células CD34+ circulantes del paciente con talasemia beta mayor, se trataron o no con una molécula KPT (KPT 0 = DMSO, KPT 100 = 100 nM, KPT 1000 = 1000 nM) y se analizaron a las 24 h, 48 h, y 72 h de tratamiento. El día 0 de tratamiento corresponde al día 6 del cultivo CD36+. a) Proliferación de células CD36+ entre 24 h y 72 h, para las diferentes condiciones de tratamiento con KPT. b) Muerte celular de células CD36+ entre 24 h y 72 h, para las diferentes condiciones de tratamiento con KPT. c) Análisis de citometría de flujo de MFI para la proteína Banda 3, en células CD36+, en las diferentes condiciones del tratamiento con KPT. d) Análisis de citometría de flujo de la cantidad de células CD36+ pequeñas, vivas, positivas para hemoglobina fetal en las diferentes condiciones del tratamiento con KPT. e) Recuento de MGG de policromatófilos y acidófilos + reticulocitos inmaduros a las 48 h de tratamiento, para las diferentes condiciones KPT 0 y KPT 100 nM y e) los índices de maduración correspondientes.

Figura 8. Células CD36+ del mismo experimento que la Figura 8, a las 24 h de tratamiento. Porcentajes de células que contienen HSP70 ubicadas en el núcleo (negro) o en el citoplasma (gris), agrupadas en la población total de células analizadas, para las diferentes condiciones de tratamiento: KPT 0 (a), KPT 100 nM (b) y KPT 1000 nM (c). d) Relación HSP70 citoplasma/nuclear para las tres condiciones de tratamiento. e) Intensidad media y desviación estándar para la fluorescencia del factor de transcripción GATA1.

Ejemplo 1.

Fundamento.

El laboratorio de los autores de la presente invención ha publicado (Ribeil et al., Nature 2007) que la leptomicina B (LMB), un inhibidor químico de XPO1, induce la retención nuclear de HSP70 en células precursoras de eritroides. Esta observación sugiere que XPO1 podría estar involucrada en la exportación nuclear de la proteína HSP70 en el precursor eritroide.

Durante la diferenciación de células precursoras de eritroides, la acumulación nuclear de la proteína HSP70 es esencial. De hecho HSP70 protege en el núcleo el factor de transcripción GATA1 de la degradación de la caspasa-3.

En el caso de dos patologías con diseritropoyesis: síndrome mielodisplásico (MDS) y beta-talasemia, se ha establecido un defecto en la localización nuclear de HSP70 en células progenitoras eritroides (Frisan et al., Blood 2012, Arlet et al., datos no publicados). Por lo tanto, los autores sugieren que sería de interés reprimir la exportación nuclear de HSP70 inducida por XPO1 para restablecer la localización nuclear de la proteína HSP70 en células precursoras de eritroides y por tanto mejorar la diferenciación de los precursores de eritroides.

KPT-330 (Selinexor*) es el primer inhibidor selectivo de XPO1 y producido por Karyopharm. El análisis in vitro y los estudios de seguridad en pacientes humanos han mostrado una buena tolerabilidad de la molécula.

Los autores de la presente invención sugieren evaluar el efecto de la molécula KPT (KPT-251 adecuada para pruebas in vitro) tanto en las células beta-talasemia como en las células precursoras de eritroides MDS.

Materiales y métodos:

Material.

Se obtuvieron unidades de sangre del cordón umbilical de partos normales a término, previo consentimiento de la madre, de la Unidad de Obstetricia del Hôpital Necker-Enfants Malades. Los progenitores eritroides CD36+, generados a partir de progenitores CD34 cultivados 7 días con IL-6 + IL3 + SCF aislados de sangre del cordón umbilical (Miltenyi CD34 Progenitor Cell Isolation Kit) se cultivaron en presencia de IL3 + SCF + Epo en IMDM (cultivo de células Gibco) suplementado con 15% BIT 9500 (Stem Cell Technologies).

Análisis de inmunotransferencia.

Se extrajeron fracciones de proteínas nucleares y citoplásmicas separadas de los progenitores eritroides usando reactivos de extracción nuclear y citoplásmica NE-PER (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante.

Se resolvieron 40 µg de proteínas de extractos nucleares o citoplásmicos en geles de acrilamida al 14% y se analizaron mediante inmunotransferencia. Los antígenos se visualizaron por quimioluminiscencia usando SuperSignal West Dura (Thermo Scientific).

Reactivos.

Los anticuerpos utilizados son el clon de ratón anti HDAC 3F3 # 05-814 (Millipore), anti HSP70 de conejo ADI SPA 812 (Enzo lifesciences) y anti CRM1 (XPO1) de conejo # ST1100 (Calbiochem).

Permeabilización celular y etiquetado para microscopía de fluorescencia.

Se hilaron 5 x 10^4 células en portaobjetos, se fijaron con acetona, se hidrataron con 1X PBS 1% de BSA frío durante 30 minutos, se trataron con formaldehído durante 15 minutos (Sigma) y luego con metanol (Prolabo) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron luego con 1X PBS 0,2% de triton X100 (Sigma) durante 10 minutos a 4 ºC, se lavaron y se incubaron en BSA al 10% durante 30 minutos. Luego se incubaron secuencialmente con anticuerpos diluidos en 1X PBS 1% de BSA al 0,1% de tween (Sigma). Los núcleos se tiñeron con DAPI y los portaobjetos se examinaron con un microscopio láser confocal (LSM 700 Carl Zeiss).

Resultados:

Los presentes autores investigaron la expresión de la proteína XPO1 en progenitores eritroides CD36+ de sangre de cordón umbilical mediante inmunotransferencia (Figura 1) y microscopía de fluorescencia (Figura 2). En la Figura 1, la proteína XPO1 está presente mayoritariamente en el citoplasma (C) y, en menor medida, en el compartimento del núcleo (N) de los progenitores eritroides CD36+, desde el día 3 (D3) hasta el día 6 (D6) de cultivo. En la Figura 2, la expresión de la proteína XPO1 observada por inmunotransferencia se confirma por microscopía confocal, en progenitores eritroides CD36+ permeabilizados, en el día 6 de cultivo en Epo. Aquí los autores de la presente invención presentan por primera vez la expresión de XPO1, una proteína de exportación nuclear de la familia beta importina, en células progenitoras eritroides CD36+.

Ejemplo 2.

Los datos de las Figuras 6 y la Figura 7 son de dos experimentos diferentes en células CD36+ de un paciente con beta talasemia. Los datos de la Figura 8 se han obtenido con células del experimento de la Figura 7. Los eritroblastos de beta-talasemia se generaron in vitro a partir de células CD34+ circulantes de sangre periférica de un paciente adulto con beta-talasemia mayor (β^0-TM). Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinky con la aprobación del comité de ética de la institución de los presentes autores.

El tratamiento con KPT a 1000 nM muestra una disminución de la proliferación en comparación con KPT 0 y KPT 100 nM, solo en el experimento en el que las células del paciente tienen una alta tasa de proliferación en condiciones de control (Figura 6a y Figura 7a). El tratamiento con KPT a 1000 nM muestra poca citotoxicidad en comparación con KPT 0 y KPT 100 nM (Figura 6b, Figura 7b).

In vitro, la maduración se detiene en la etapa policromatofílica en los progenitores eritroides de beta-talasemia. Para cuantificar la detención de la maduración en las células de beta talasemia, los autores de la presente invención utilizan un índice de maduración terminal como el número (células acidófilas + reticulocitos por portaobjetos) * 100 dividido por el número de células policromatofílicas por portaobjetos (Arlet Jb et al. Nature oct 2014). Demuestran que el índice de maduración de las células de beta-talasemia aumenta con el tratamiento con KPT a 100 nM y 1000 nM en comparación con la condición de control KPT 0 (Figura 6d, 6e, Figura 7e y 7f).

Los análisis de citometría de flujo muestran que la presencia de KPT 100 nM o 1000 nM en medios de cultivo de células de beta-talasemia CD36+ incrementa la intensidad de fluorescencia media (MFI) del marcaje de la proteína Banda 3, un marcador de diferenciación eritroide terminal (Hu J et al. Blood abril de 2013), a las 96 h de tratamiento (Figura 6c) y a las 72 h de tratamiento (Figura 7c).

En los pacientes con beta talasemia, la falta de síntesis de la cadena beta se compensa con una mayor proporción de células productoras de hemoglobina fetal (HbF: compuesta de dos subunidades alfa y gamma) y los únicos eritroblastos maduros supervivientes son las células HbF. Aquí los autores observan que después de 72 horas de tratamiento con 1000 nM de KPT, la proporción de HbF positiva, entre la población de células pequeñas vivas, es mayor en comparación con las condiciones de KPT 0 y KPT 100 nM.

La tecnología Amnis permite analizar la localización de fluorescencia en gran número de células previamente marcadas. Aquí se muestra el porcentaje de células positivas para el marcado de HSP70 en el núcleo, o en el citoplasma, para las condiciones KPT 0, 100 nM y 1000 nM (Figura 8). Se puede observar que la fracción de células positivas para HSP70 en el núcleo aumenta en condiciones de KPT 100 nM y 1000 nM (Figuras 8b y 8c), en comparación con KPT 0 (Figura 8a).

Esta observación se evidencia también por la disminución en la fracción cito/nuclear de HSP70 en condiciones KPT 100 nM y 1000 nM en comparación con KPT 0 (Figura 8d).

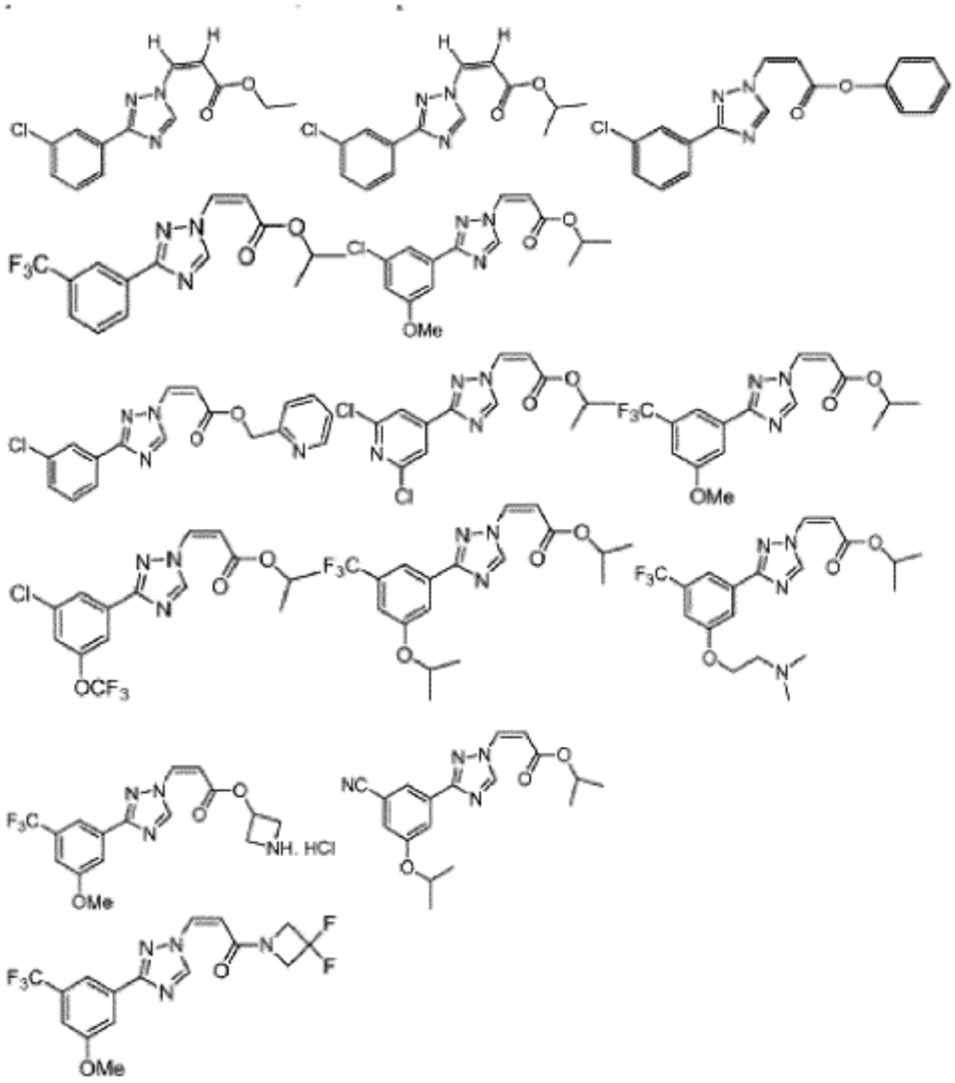
Durante la diferenciación eritroide terminal, se requiere la translocación nuclear HSP70 para proteger el factor de transcripción GATA1 de la escisión por la caspasa activada 3. En los progenitores eritroides de beta-talasemia, la HSP70 es secuestrada en el citoplasma por el exceso de cadenas de globina alfa (Arlet Jb et al. Nature oct 2014). Por tanto, GATA1 se escinde y esto tiene por resultado un paro de maduración y apoptosis de progenitores eritroides. Aquí se muestra que la fracción creciente de células con HSP70 nuclear coincide con un aumento en la media de la intensidad de fluorescencia del marcado de GATA1.

Tomados en su conjunto, estos datos muestran que el tratamiento de células CD36+ de pacientes con beta-talasemia in vitro con KPT, un inhibidor específico de la exportina XPO1, muestra poca citotoxicidad y puede mejorar la diferenciación eritroide terminal mediante la represión de la exportación de HSP70 desde el núcleo de progenitores eritroides. Esta translocación nuclear de HSP70 está asociada con la protección de la escisión del factor de transcripción eritroide GATA1.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de XPO1 para uso en un método de tratamiento de beta-talasemia en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

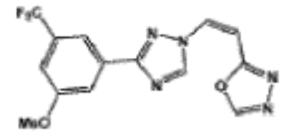
2. El inhibidor de XPO1 para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en los siguientes compuestos:



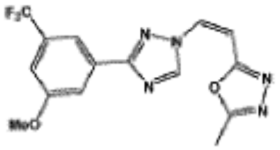
y sus sales aceptables farmacéuticamente.

3. El inhibidor de XPO1 para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en éster etílico del ácido (Z)-3- [3-(3-cloro-fenil)-[1,2,4]-triazol-1-il]-acrílico; éster etílico del ácido (E)-3- [3-(3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il]-acrílico; éster isopropílico del ácido (Z)-3- [3-(3-cloro-fenil)- [1,2,4] -triazol-1-il]-acrílico; éster isopropílico del ácido (E)-3-[3-(3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrílico; éster terc-butílico del ácido (Z)-3-[3-(3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrílico; éster terc-butílico del ácido (Z) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrílico; (E) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4]-triazol-1-il] -N-fenil-acrilamida; (E) -N- (2-cloro-fenil) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrilamida; éster terc-butílico del ácido (4-{(E)-3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acriloilamino} -fenil) -carbámico; (E) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -N- (4-metoxi-fenil) -acrilamida; (E) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -N-metil-N-fenil-acrilamida; (E) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -N-metil-N-fenil-acrilamida; (E) -N- (4-amino-fenil) -3- [3- (3-cloro-fenil) - [1,2,4] -triazol-1-il] -acrilamida, y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

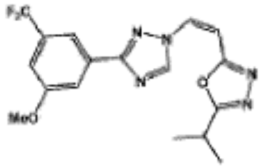
4. El inhibidor de XPO1 para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en los compuestos siguientes:



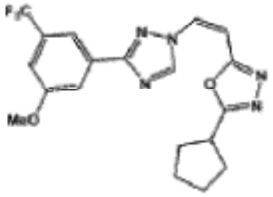
I-1



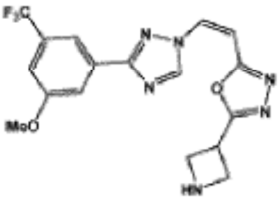
I-2



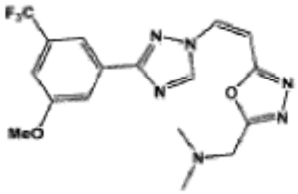
I-3



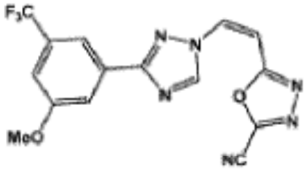
I-4



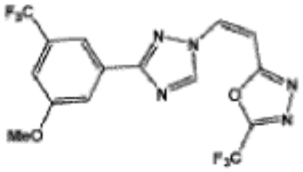
I-5



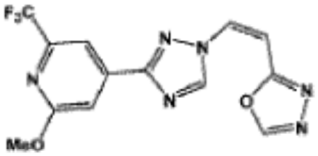
I-6



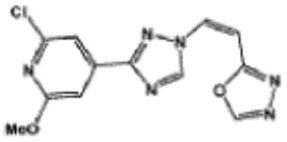
I-7



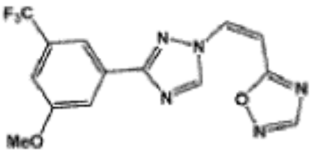
I-8



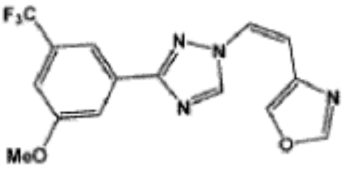
I-9



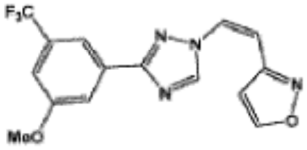
I-10



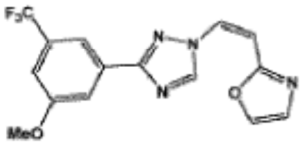
I-11



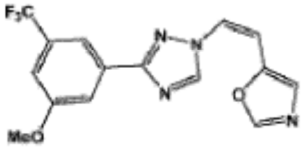
I-12



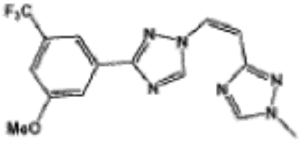
I-13

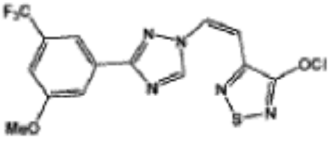


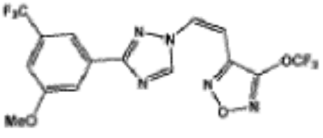
I-14

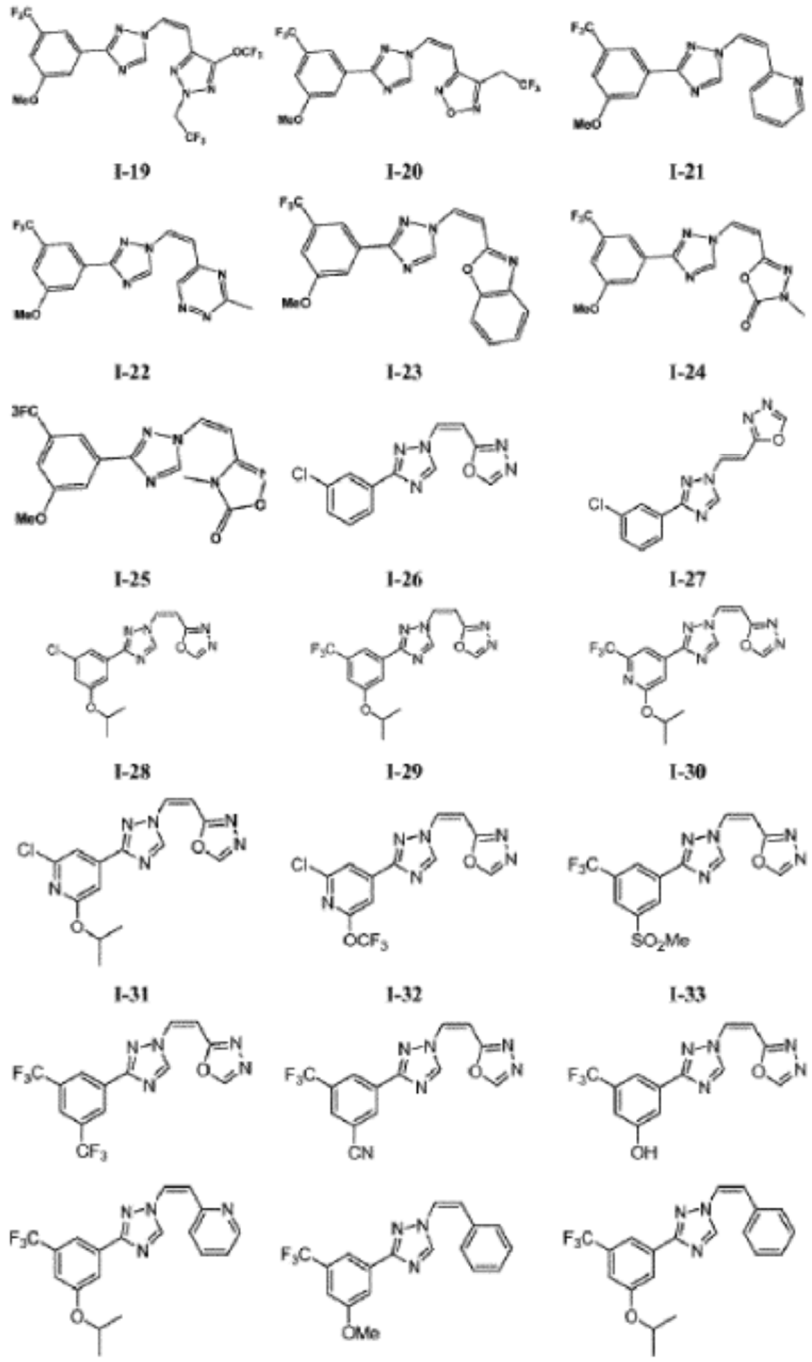


I-15





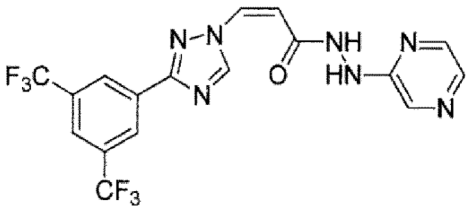




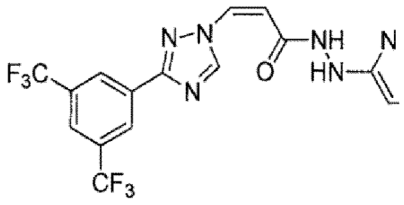
y sus sales aceptables farmacéuticamente.

5. El inhibidor de XPO1 para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en 1- (4-metoxifenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-bromo-2,5-difluorofenil)-1H-pirrol-2,5-diona; 3-metil-1-(1-metil-1H-pirazol-3-il) -1H-pirrol-2,5-diona; 4- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(5-metilisoxazol-3-il) bencenosulfonamida; 1- (3-benzoil-4-metiltiofen-2-il) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4- (3- (trifluorometil) -1H-pirazol-1-il) fenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4- (4-clorofenil) tiazol-2-il) -3-metil-1H-pirrol-2,5-diona; 1- (benzo [b] tiofen-3-ilmetil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (3,4-dimetoxifenetil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (naftalen-1-il) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-ciclohexilfenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (2-benzoilfenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-morfolinofenil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (4-clorofenetil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1- (2- (tiofen-2-il) etil) -1H-pirrol-2,5-diona; 1-([3,4] metilendioxibencil) -1H-pirrol-2,5-diona amida y sales farmacéuticamente aceptable de los mismos.

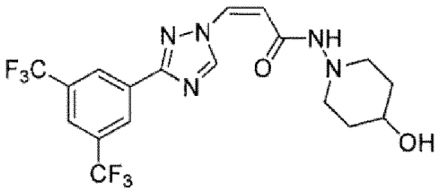
6. El inhibidor de XPO1 para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 se selecciona entre el grupo que consiste en los siguientes compuestos:



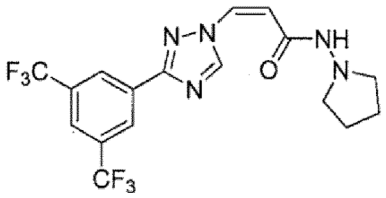
I-3,



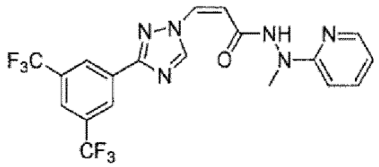
I-4,



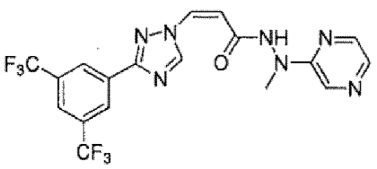
I-5,



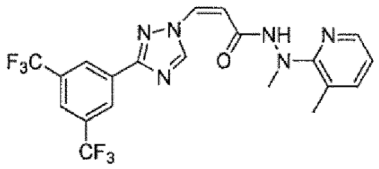
I-6,



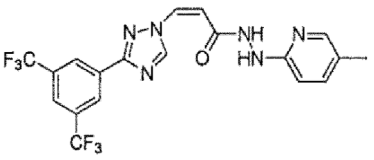
I-7,



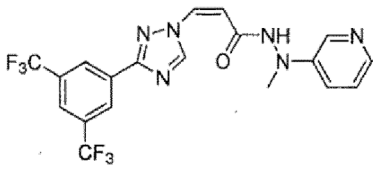
I-8,



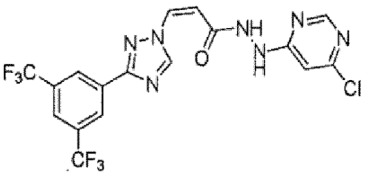
I-9,



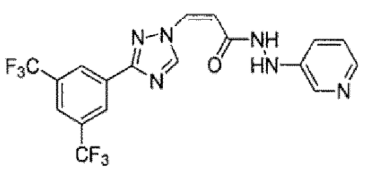
I-10,



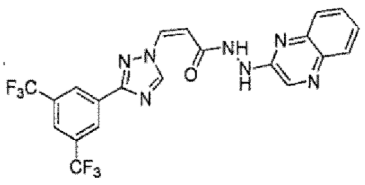
I-11,



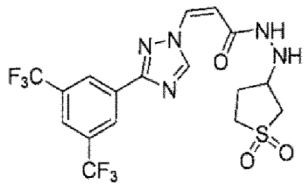
I-12,



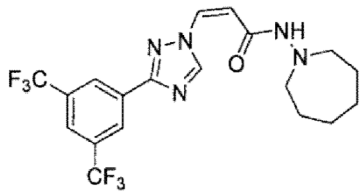
I-13,



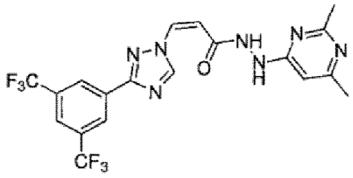
I-14,



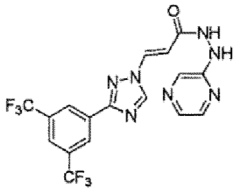
I-15,



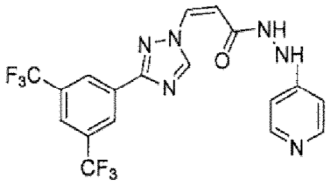
I-16,



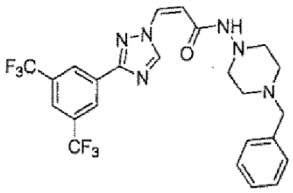
I-17,



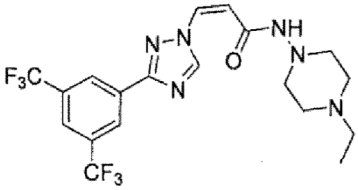
I-18,



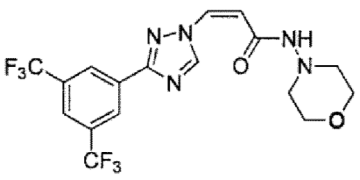
I-19,



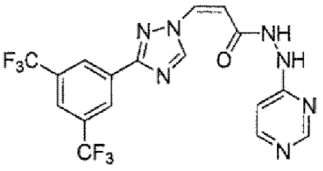
I-20,



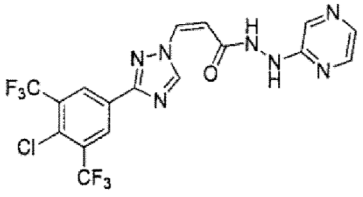
I-21,



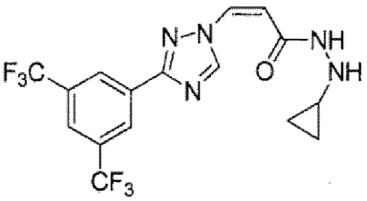
I-22,



I-23,

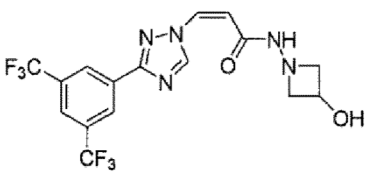


I-24,



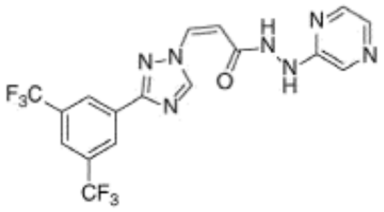
I-25

o

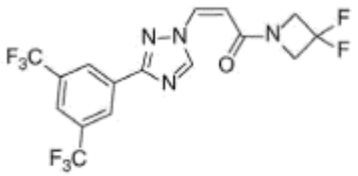


I-26.

7. El inhibidor de XPO1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 es KPT-330 que tiene la fórmula:



8. El inhibidor de XPO1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 es KPT-276 que tiene la fórmula:



9. El inhibidor de XPO1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de XPO1 es un inhibidor de la expresión de XPO1.

10. El inhibidor de XPO1 para su uso según la reivindicación 9, en donde el inhibidor de la expresión génica es un siRNA, un oligonucleótido antisentido o una ribozima.

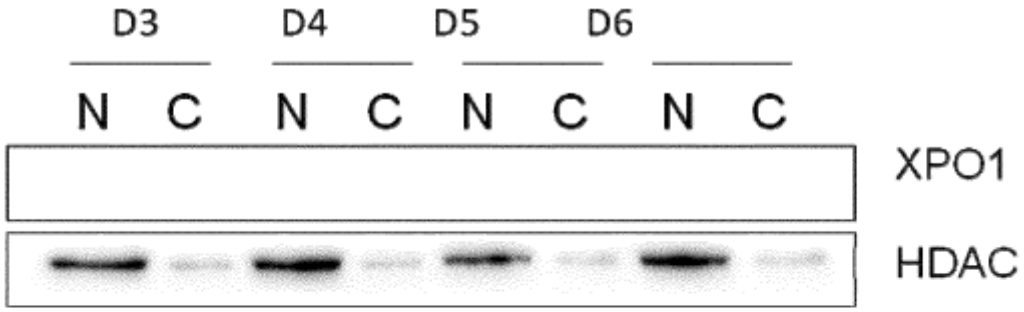


Figura 1

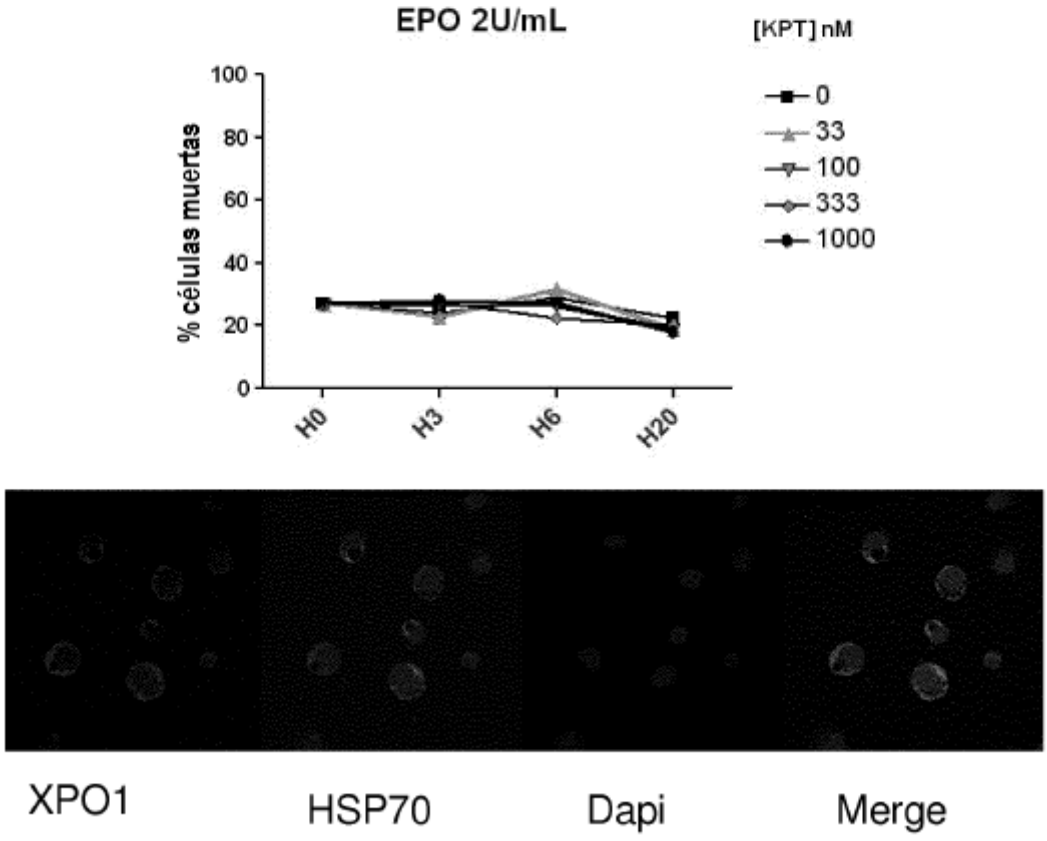


Figura 2

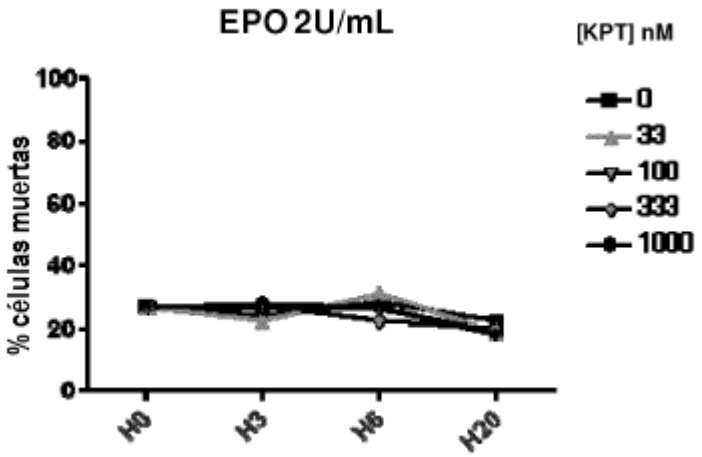


Figura 3A

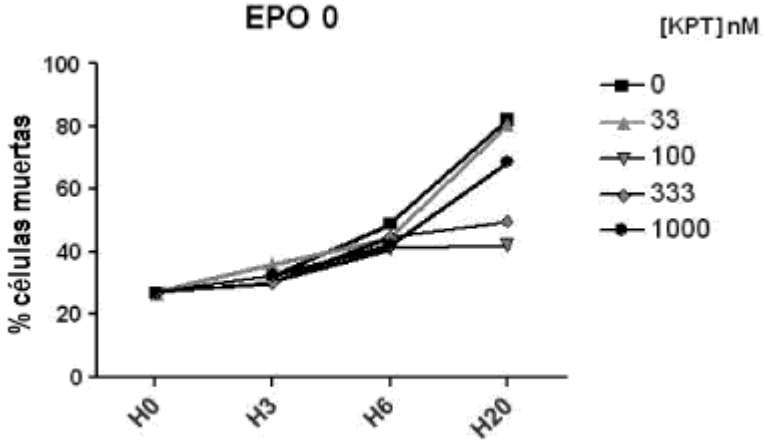


Figura 3B

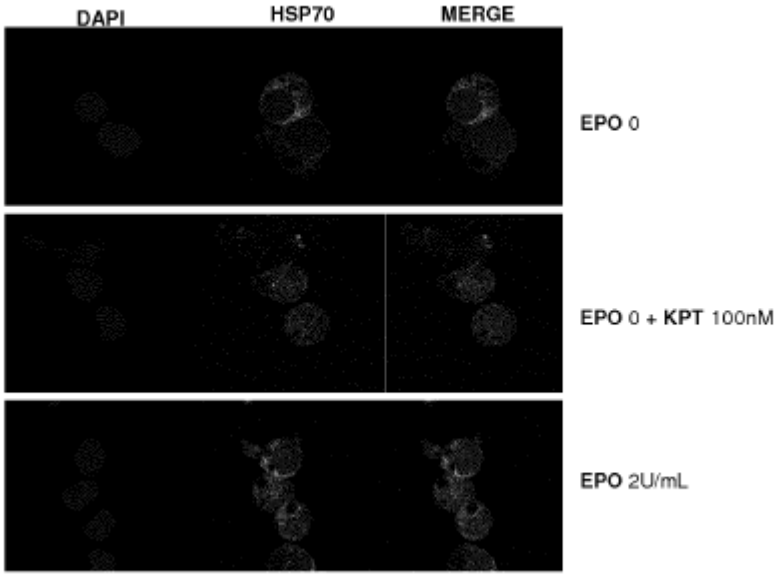


Figura 4

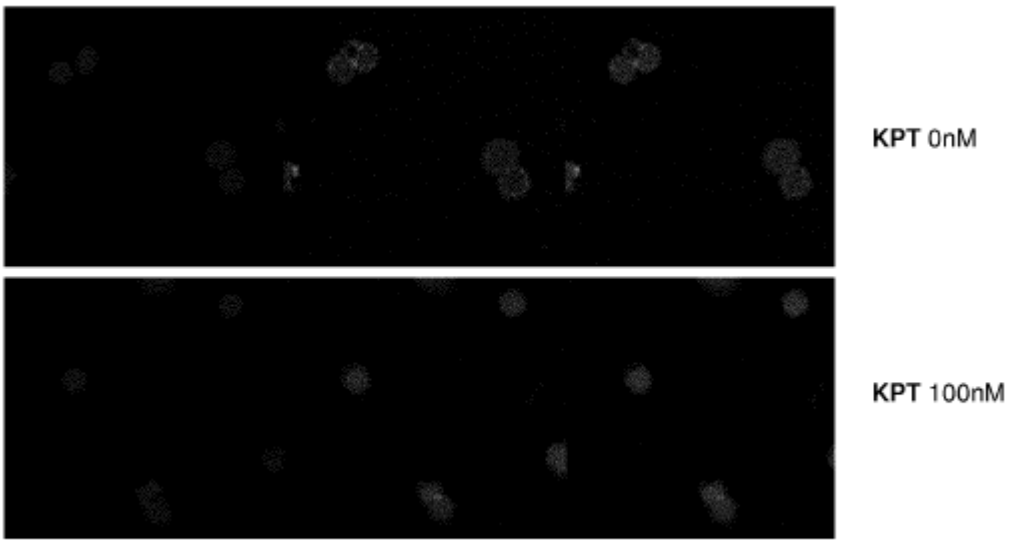


Figura 5

Estudio de proliferación de células CD36+ de paciente con beta talasemia mayor, tratado o no con KPT

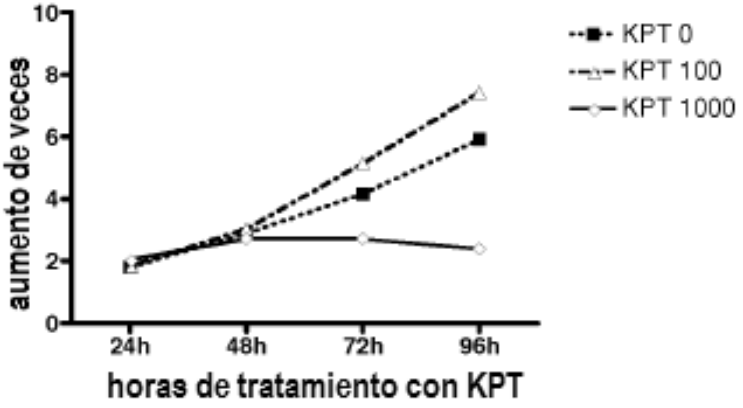


Figura 6A

Muerte celular de células CD36- de paciente con betatalasemia mayor tratado o no con KPT

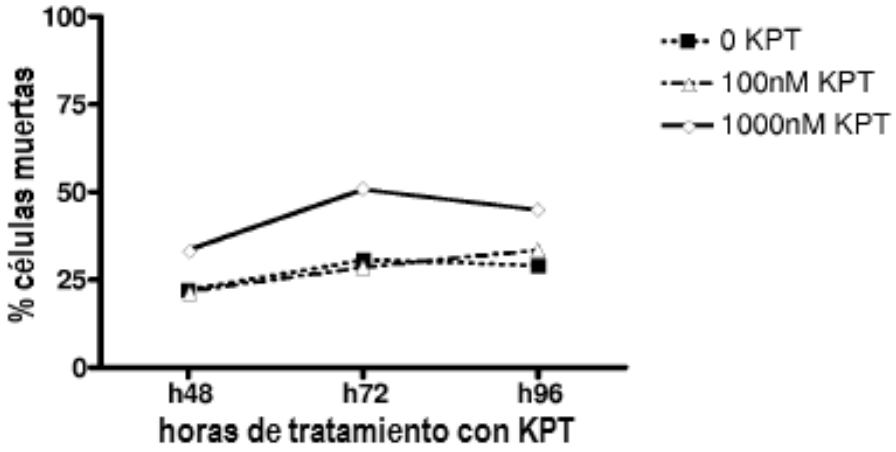


Figura 6B

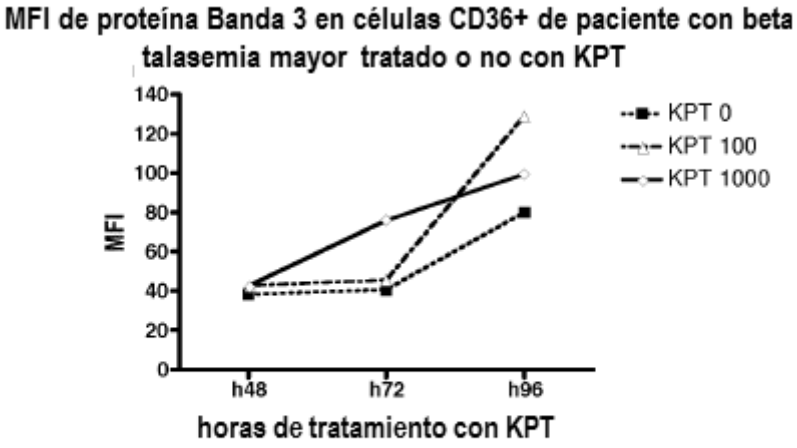


Figura 6C

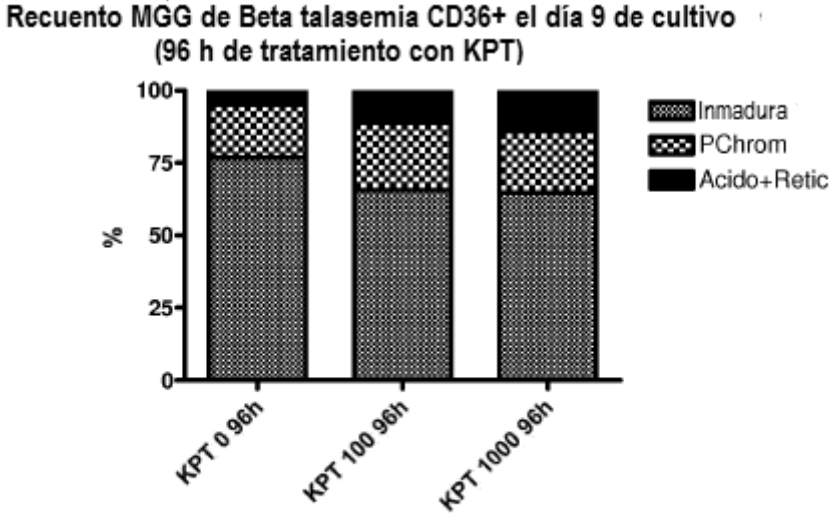


Figura 6D

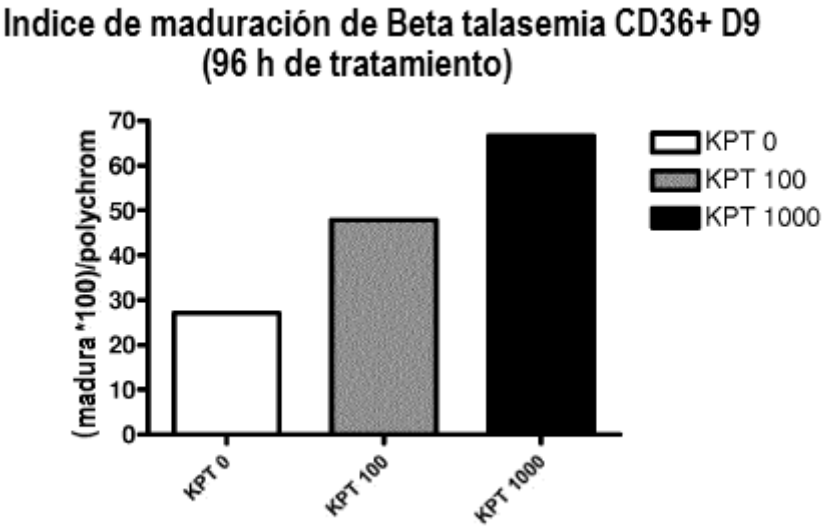


Figura 6E

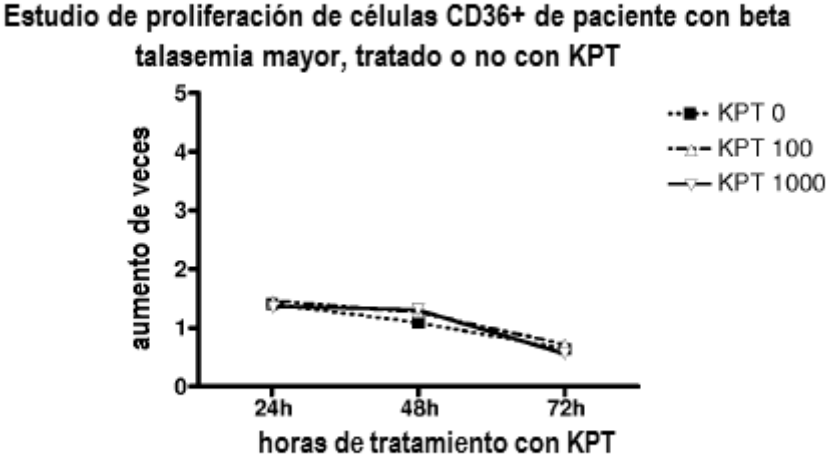


Figura 7A

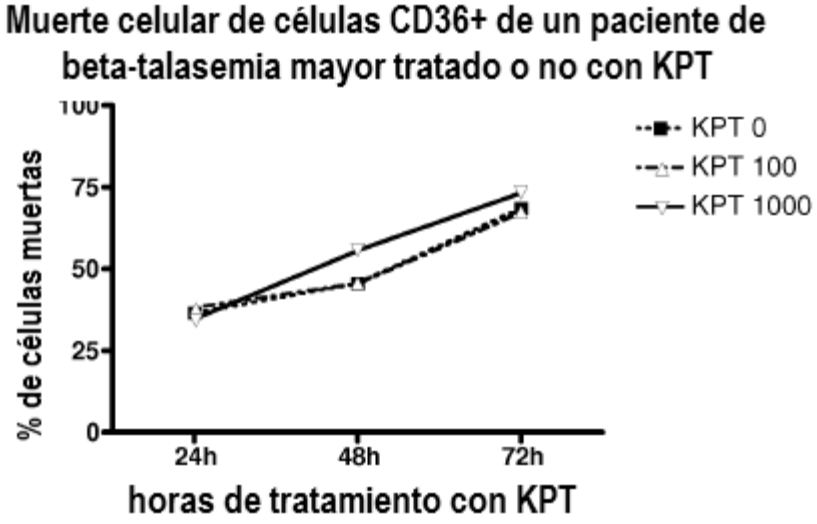


Figura 7B

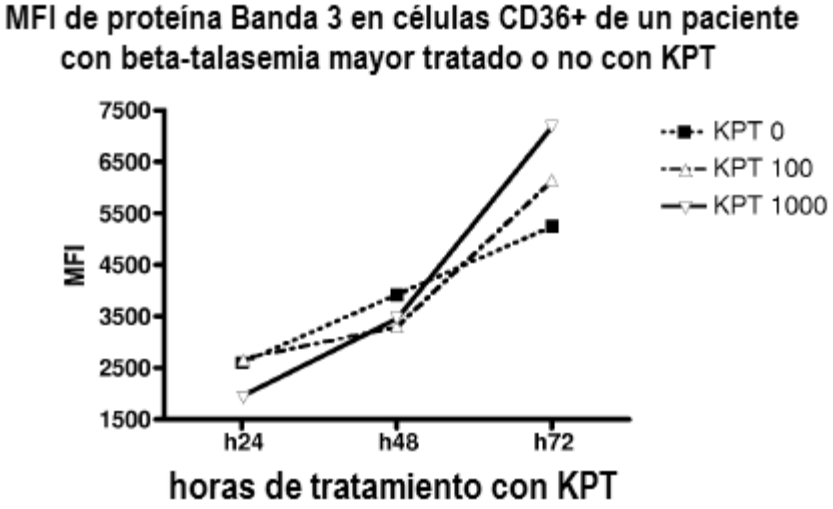


Figura 7C

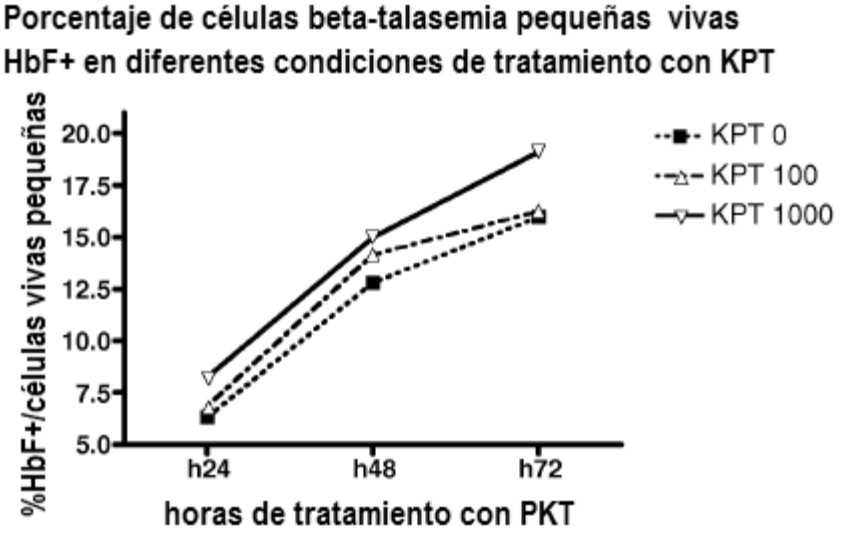


Figura 7D

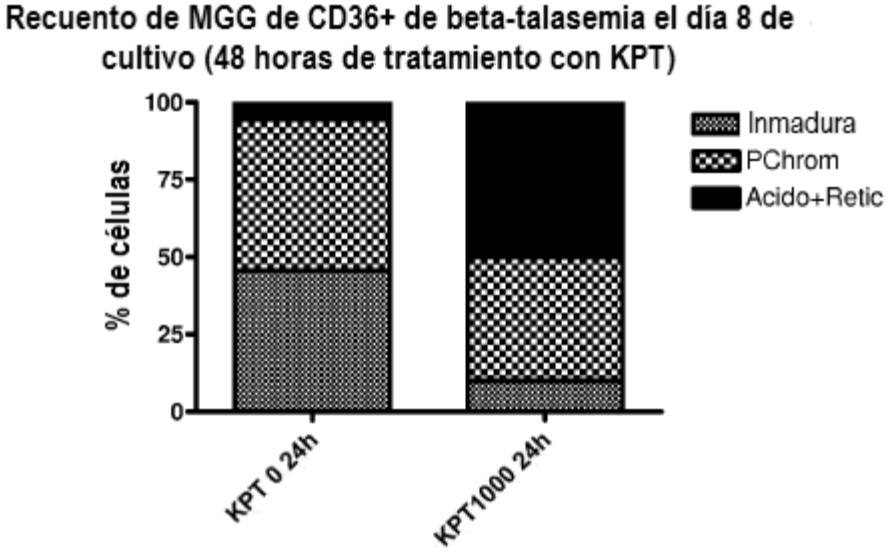


Figura 7E

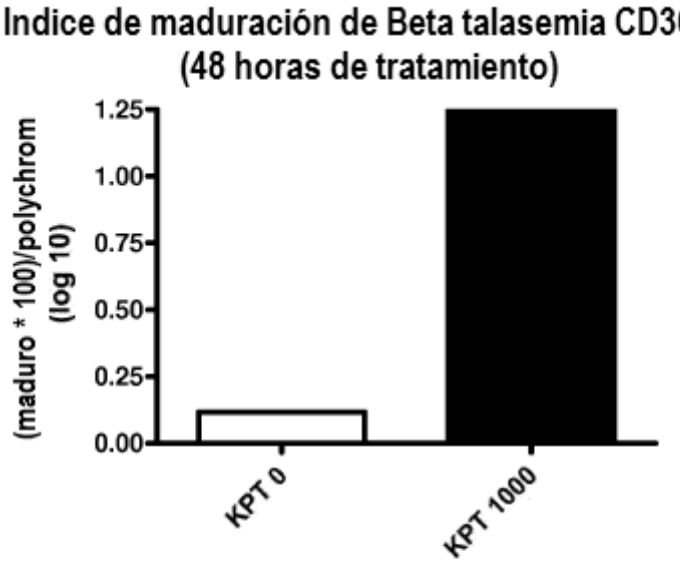


Figura 7F

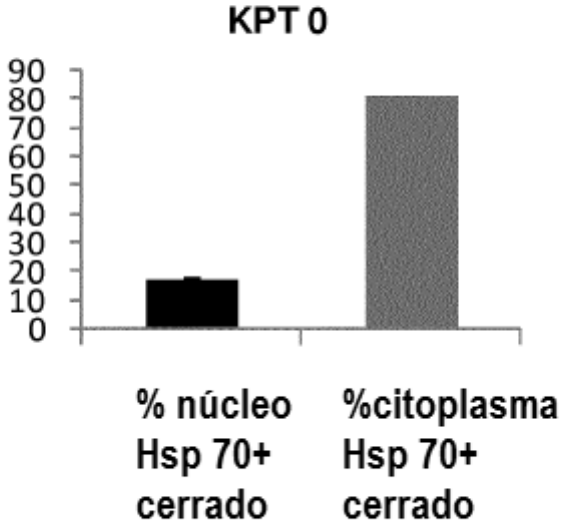


Figura 8A

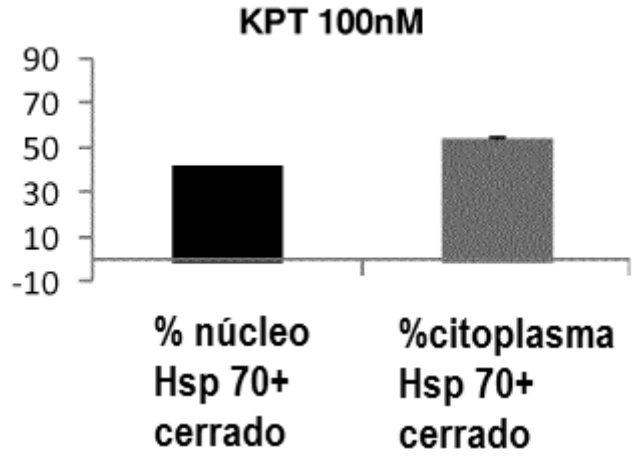


Figura 8B

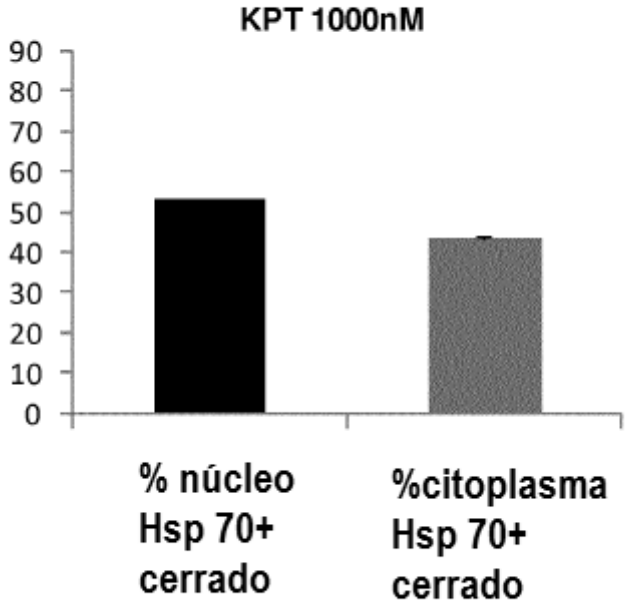


Figura 8C

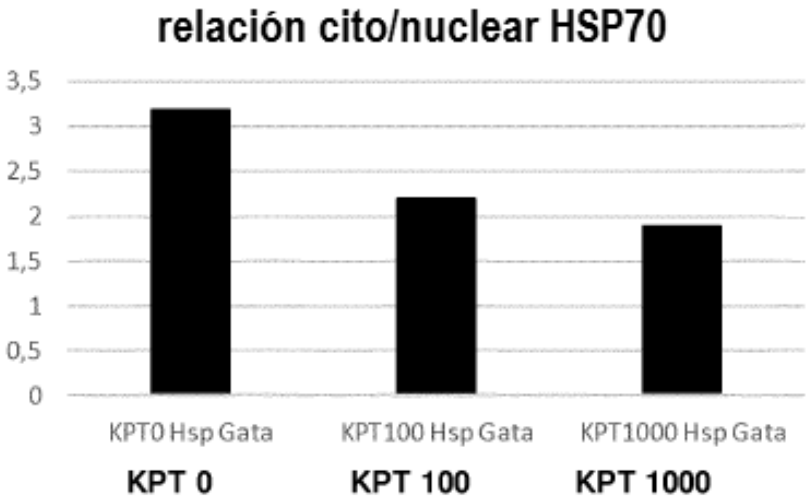


Figura 8D

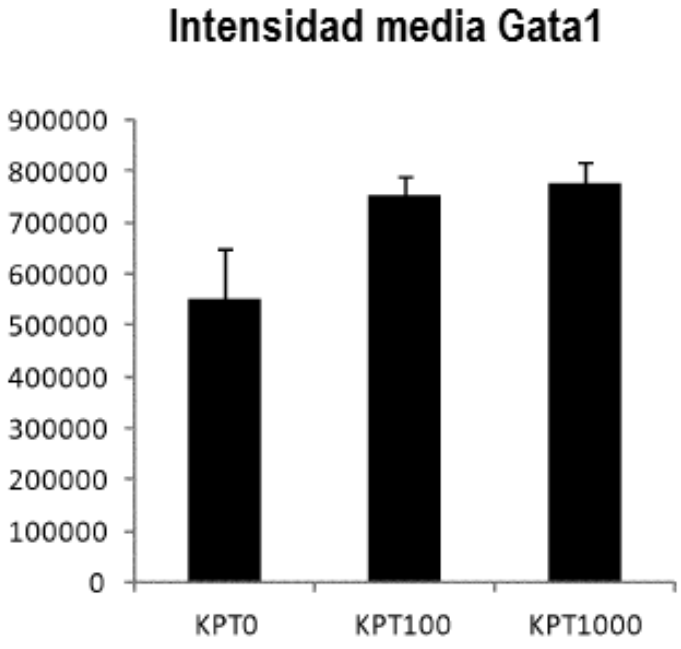


Figura 8E