

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 069 201**

21 Número de solicitud: 202430991

51 Int. Cl.:

**A61K 31/26** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.11.2024**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.06.2026**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E  
INVESTIGACIÓN SANITARIAS DE LA REGIÓN DE  
MURCIA (80,00%)**

**Pabellón Docente del Hospital Clínico  
Universitario Virgen de la Arrixaca, C/ Campo 12,  
3ª planta  
30120 El Palmar (Murcia) ES y  
UNIVERSIDAD DE MURCIA (20,00%)**

72 Inventor/es:

**PÉREZ OLIVA, Ana Belén;  
SALIDO FIÉRREZ, Eduardo;  
SÁNCHEZ VILLALOBOS, María;  
MARTÍNEZ BALSALOBRE, Elena;  
PINILLA MARQUÍNEZ, Miriam;  
CAMPOS BAÑOS, Eulalia;  
NAVARRO RAMÍREZ, Verónica;  
MARTÍNEZ ESPARZA ALVARGONZÁLEZ, María  
Concepción y  
BLANQUER BLANQUER, Miguel**

74 Agente/Representante:

**SAN MARTÍN ALARCIA, Esther**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la  
página web de la OEPM para su descarga en  
formato electrónico

54 Título: **Sulforafano para el tratamiento de la talasemia y la anemia sideroblástica**

57 Resumen:

Sulforafano para el tratamiento de la talasemia y la anemia sideroblástica.

La presente invención se refiere al uso del sulforafano como inhibidor de NLRP1 y de inflamasomas que comprenden NLRP1 como proteína sensor, y a su uso como medicamento en el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan con la activación de inflamasomas que comprenden NLRP1 como proteína sensor. En concreto, se describe el uso del sulforafano para el tratamiento de la talasemia y la anemia sideroblástica.

ES 3 069 201 A1

## DESCRIPCIÓN

### Sulforafano para el tratamiento de la talasemia y la anemia sideroblástica

#### CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular, al tratamiento de la  
5 talasemia y de la anemia sideroblástica con un compuesto inhibidor del inflammasoma.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La **hematopoyesis** es el proceso por el que se producen todos los tipos de células  
sanguíneas a partir de células madre hematopoyéticas (CMH) en la médula ósea. Este  
proceso, complejo y altamente regulado, garantiza la reposición continua de las células  
10 sanguíneas, que tienen una vida útil limitada y son esenciales para diversas funciones  
fisiológicas, como el transporte de oxígeno, la defensa inmunitaria y la coagulación de la  
sangre. La médula ósea proporciona un microentorno o nicho especializado que favorece la  
hematopoyesis. Incluye células estromales, componentes de la matriz extracelular y  
diversas moléculas de señalización que interactúan con las CMH y las células progenitoras  
15 para regular su función.

La **eritropoyesis** es el proceso por el que se producen los glóbulos rojos (eritrocitos). Se  
produce principalmente en la médula ósea y está estrechamente regulada para mantener  
una capacidad adecuada de transporte de oxígeno en la sangre. La función principal de los  
eritrocitos es transportar oxígeno de los pulmones a los tejidos y devolver dióxido de  
20 carbono de los tejidos a los pulmones para su exhalación.

El proceso de eritropoyesis comienza con las CMH multipotentes, que pueden diferenciarse  
en varios tipos de células sanguíneas. Las CMH dan lugar a progenitores mieloides  
comunes, que son células precursoras comprometidas con el linaje mieloide. A partir de los  
progenitores mieloides comunes, la vía se estrecha aún más para formar progenitores  
25 eritroides, concretamente unidades eritroides formadoras de estallidos (BFU-E) y unidades  
eritroides formadoras de colonias (CFU-E). Las células CFU-E se diferencian en  
proeritroblastos, que son los primeros precursores eritroides reconocibles. Tras la extrusión  
nuclear, la célula se convierte en un reticulocito, que aún contiene algo de ARN residual y  
puede sintetizar hemoglobina. Los reticulocitos abandonan la médula ósea y pasan al  
30 torrente sanguíneo. En el torrente sanguíneo, los reticulocitos pierden el ARN restante y

maduran completamente hasta convertirse en eritrocitos. Los eritrocitos maduros son discos bicóncavos sin núcleo, optimizados para el intercambio de gases.

En la regulación de la eritropoyesis interviene la eritropoyetina (EPO), una hormona clave producida por los riñones en respuesta a niveles bajos de oxígeno (hipoxia) que estimula la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea. El hierro también juega un papel esencial en la síntesis de hemoglobina. La carencia de hierro puede provocar una reducción de la eritropoyesis y anemia. Por su parte la vitamina B12 y el folato son necesarias para la síntesis de ADN en los progenitores eritroides. La deficiencia de estas vitaminas puede provocar anemia megaloblástica, caracterizada por la presencia de glóbulos rojos anormalmente grandes e inmaduros. Otro factor a tener en cuenta en desarrollo de los eritrocitos es el microambiente de la médula ósea cuyo papel consiste en proporcionar apoyo y señales que regulan la eritropoyesis, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas e interacciones con células estromales.

Existen diversas enfermedades ligadas a un proceso de eritropoyesis deficiente, entre las que destaca la **anemia**. La anemia es una enfermedad caracterizada por una disminución del número de glóbulos rojos o hemoglobina, lo que reduce la capacidad de transporte de oxígeno. Sus causas pueden ser deficiencias nutricionales (hierro, vitamina B12, folato), trastornos de la médula ósea, enfermedades crónicas y afecciones genéticas como la anemia sideroblástica y la talasemia.

La **talasemia** engloba un grupo de trastornos sanguíneos hereditarios caracterizados por una producción anormal de hemoglobina, la proteína de los glóbulos rojos responsable del transporte de oxígeno. El trastorno es el resultado de mutaciones en los genes que producen la hemoglobina, que conducen a una producción reducida o ausente de uno de sus dos componentes: las cadenas de globina alfa o beta. Este desequilibrio provoca la formación de glóbulos rojos defectuosos, lo que causa anemia y otras complicaciones. Dentro de la talasemia encontramos diversos tipos:

- Alfa Talasemia: causada por mutaciones o deleciones en los genes responsables de la producción de cadenas de globina alfa. Normalmente, hay cuatro genes implicados en la producción de globina alfa (dos en cada cromosoma 16). La gravedad de la alfa talasemia depende del número de genes afectados.

- Portador silencioso: un gen afectado, normalmente sin síntomas.

- Rasgo de alfa talasemia (menor): dos genes afectados, causando anemia leve.

- Hemoglobinopatía H: tres genes afectados.

- Alfa Talasemia Mayor (Hemoglobina de Bart): los cuatro genes están afectados, lo que suele provocar una enfermedad grave, a menudo mortal en el útero o poco después del nacimiento si no se interviene.

5 -Beta Talasemia: causada por mutaciones en los genes responsables de producir cadenas de beta globina. Los humanos tienen dos genes para la beta globina (uno en cada cromosoma 11). La gravedad de la beta talasemia depende de si las mutaciones reducen o eliminan por completo la producción de beta globina:

- Beta talasemia menor (rasgo): un gen afectado, que suele provocar una anemia leve.

10 - Beta Talasemia Intermedia: dos genes afectados pero con mutaciones más leves, que provocan una anemia moderada y síntomas variables.

- Beta Talasemia Mayor (Anemia de Cooley): dos genes afectados con mutaciones graves, que provocan una anemia severa, que requiere transfusiones de sangre regulares y otros tratamientos.

15 Los pacientes con talasemia mayor tienen anemia más severa desde temprana edad y requieren transfusiones sanguíneas periódicas asociadas a un tratamiento quelante intensivo del hierro de por vida, mientras que la talasemia menor, la manifestación menos severa, se caracteriza por individuos con anemia asintomática leve (rasgo talasémico). Las formas intermedias constituyen un grupo con un espectro clínico muy variable, desde  
20 anemia leve a moderada a moderadamente severa, pero que no requieren transfusiones sanguíneas de manera regular, solo ocasionalmente, aunque sí desarrollan diversas complicaciones propias de la talasemia mayor como sobrecarga férrica, osteoporosis y alteraciones esqueléticas, hematopoyesis extramedular, hepatopatía, afectación de órganos endocrinos, úlceras en extremidades inferiores, hipertensión pulmonar etc.

25 En 2012 la Federación Internacional de Talasemia adoptó una nueva terminología para la clasificación clínica de la talasemia con la finalidad de conseguir adaptarla a una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y mejorar el manejo clínico y las complicaciones. Así tenemos la talasemia dependiente de transfusión (TDT) y la talasemia no dependiente de transfusión (NTDT), dependiendo de si los pacientes precisan recibir  
30 terapia transfusional regular de por vida para su supervivencia (como por ejemplo los pacientes con  $\beta$ -talasemia mayor o hemoglobina E/ $\beta$ -talasemia grave) o si no requieren transfusiones regulares durante toda la vida para sobrevivir (como los pacientes con  $\beta$ -

talasemia intermedia o hemoglobina E/ $\beta$ -talasemia leve o moderada, hemoglobinopatía H y otras combinaciones) aunque pueden requerir transfusiones ocasionales o incluso frecuentes en ciertos entornos clínicos y durante períodos de tiempo definidos.

Los síntomas de la talasemia varían en función del tipo y la gravedad de la talasemia y pueden incluir formas leves (portador silencioso, menor), a menudo asintomáticas o con anemia leve; y formas de moderadas a graves (intermedia, mayor) que pueden presentar anemia grave, fatiga, debilidad, piel pálida o amarillenta (ictericia), retraso del crecimiento y desarrollo en niños, deformidades óseas, especialmente en cara y cráneo, bazo agrandado (esplenomegalia) y mayor riesgo de infecciones.

10 Diferenciar a un paciente nuevo con una talasemia como TDT o NTDT es esencial y requiere una evaluación médica precisa utilizando varios indicadores como parámetros hematológicos, en particular los niveles basales de hemoglobina, y se recomienda un seguimiento de al menos 3 a 6 meses para determinar la gravedad clínica antes de realizar el diagnóstico de TDT o NTDT.

15 La talasemia no tratada o tratada de forma inadecuada puede provocar complicaciones como anemia grave, insuficiencia cardíaca, enfermedades hepáticas, diabetes, retrasos en el crecimiento y deformidades óseas. La atención médica regular y el cumplimiento de los regímenes de tratamiento son cruciales para controlar la enfermedad y mejorar la calidad de vida, ya que estas enfermedades raras suelen presentar complicaciones.

20 La **anemia sideroblástica** es un grupo de trastornos caracterizados por la incapacidad del organismo para incorporar correctamente el hierro a la hemoglobina, a pesar de tener reservas adecuadas o excesivas de hierro. Esto da lugar a la presencia de sideroblastos anillados en la médula ósea: glóbulos rojos inmaduros con mitocondrias cargadas de hierro dispuestas en forma de anillo alrededor del núcleo. La enfermedad puede ser congénita (hereditaria) o adquirida, con una amplia gama de causas subyacentes y gravedad variable.

La anemia sideroblástica congénita puede ser anemia sideroblástica ligada al cromosoma X. La forma congénita más frecuente es la causada por mutaciones en el gen ALAS2, que codifica la enzima sintasa 2 del ácido delta-aminolevulínico, enzima es crucial para el primer paso en la síntesis del grupo hemo.

30 La anemia sideroblástica congénita también puede ser de herencia autosómica recesiva y mitocondrial, que implican mutaciones en otros genes implicados en el metabolismo del

hierro y la síntesis del grupo hemo, siendo formas menos comunes de anemia sideroblástica.

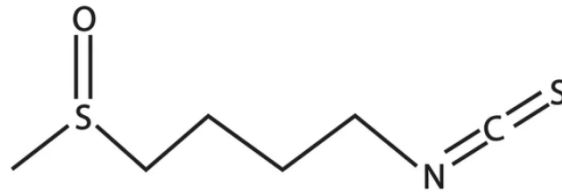
Dentro de la anemia sideroblástica adquirida encontramos la denominada como “primaria” o “clonal” que incluye los síndromes mielodisplásicos (SMD) con sideroblastos en anillo. Este subtipo de anemia sideroblástica adquirida se considera un trastorno neoplásico de la médula ósea. Por su parte, la denominada como “secundaria” o “reversible” se debe a factores externos como son el alcoholismo crónico (ya que el alcohol puede interferir en la síntesis del grupo hemo), el uso de algunos medicamentos (por ejemplo, isoniazida, cloranfenicol), algunas toxinas y metales pesados (por ejemplo, plomo, zinc) que pueden alterar el metabolismo del hierro y la síntesis del grupo hemo, deficiencias nutricionales como la deficiencia de vitamina B6 (piridoxina) que puede provocar anemia sideroblástica, ya que es un cofactor de la enzima ALAS2.

Los síntomas de la anemia sideroblástica pueden variar, pero suelen incluir fatiga y debilidad, piel pálida o amarillenta, dificultad para respirar, palpitaciones o latidos irregulares, signos de sobrecarga de hierro, como agrandamiento del hígado o problemas cardíacos, sobre todo en casos crónicos.

Entre los tratamientos actuales para la anemia encontramos las transfusiones de hematíes regulares para mantener los niveles de hemoglobina; las terapias de quelación para eliminar el exceso de hierro del organismo (que puede acumularse debido a las frecuentes transfusiones) y el trasplante de médula ósea o células madre, que constituye la única cura potencial para la enfermedad, aunque no es adecuada para todos los pacientes.

La posibilidad de utilizar terapia génica en el tratamiento de la anemia es un área emergente de tratamiento, pero todavía en gran parte en fase experimental.

El **sulforafano** es un compuesto natural que se encuentra sobre todo en las verduras crucíferas, y en grandes cantidades en el brécol, las coles de Bruselas, la col, la coliflor, la col rizada y el bok choy. Pertenece a un grupo de compuestos vegetales conocidos como isotiocianatos, que derivan de los glucosinolatos. En concreto se trata del 1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano), o compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

El sulforafano es bien conocido por sus posibles beneficios para la salud, especialmente en relación con sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

- 5 En el mercado existen actualmente suplementos de sulforafano, normalmente derivados del extracto de semillas de brócoli. Aunque estos suplementos pueden ser una forma cómoda de aumentar la ingesta, en general se recomienda obtener los nutrientes de los alimentos integrales siempre que sea posible. En general, el sulforafano se considera seguro para el consumo a través de la dieta.
- 10 Hasta la fecha se han asociado al sulforafano propiedades antioxidantes, ya que se ha probado que ayuda a inducir la producción de enzimas de desintoxicación de fase II, como la glutatión S-transferasa. Estas enzimas mejoran la capacidad del organismo para neutralizar las especies reactivas del oxígeno y desintoxicar las sustancias nocivas.

Varios estudios han demostrado que el sulforafano induce la apoptosis (muerte celular programada) en las células cancerosas e inhibe el crecimiento de tumores por lo que se le ha propuesto como un compuesto útil en la prevención del cáncer. También puede inhibir la histona deacetilasa, una enzima implicada en la regulación de la expresión génica, lo que podría afectar al crecimiento de las células cancerosas.

Otras investigaciones sugieren que el sulforafano puede tener efectos neuroprotectores y proteger contra las enfermedades neurodegenerativas mediante la activación de la vía Nrf2, que aumenta la producción de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo desencadenado por la inflamación.

También se le han atribuido efectos antiinflamatorios, principalmente debido a su capacidad para modular varias vías y moléculas clave implicadas en la inflamación, entre ellas destacan:

- La activación de Nrf2; se sabe que el sulforafano activa la vía del factor 2 relacionado con el factor eritroide nuclear (Nrf2). El Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión

de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo desencadenado por las lesiones y la inflamación. Al promover la expresión de estas enzimas antioxidantes, el sulforafano ayuda a reducir el estrés oxidativo, que está estrechamente relacionado con los procesos inflamatorios.

5 - La inhibición de NF- $\kappa$ B; el factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) es un complejo proteico que desempeña un papel central en la regulación de la respuesta inmunitaria a la infección y la inflamación. La activación de NF- $\kappa$ B conduce a la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión. Se ha demostrado que el sulforafano inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, reduciendo así la producción de estos mediadores  
10 inflamatorios.

- La supresión de citoquinas proinflamatorias; el sulforafano puede reducir la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y otras. Estas citoquinas intervienen en la propagación de la respuesta inflamatoria y suelen estar elevadas en las enfermedades inflamatorias crónicas.

15 - La modulación de las enzimas implicadas en la inflamación; el sulforafano puede inhibir la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), enzimas que contribuyen a los procesos inflamatorios al producir mediadores proinflamatorios como las prostaglandinas y el óxido nítrico.

- La modulación epigenética; el sulforafano puede influir en la inflamación alterando la  
20 expresión de los genes a través de mecanismos epigenéticos, como la inhibición de la histona deacetilasa (HDAC). Esto puede dar lugar a cambios en la expresión de genes implicados en la inflamación.

Además, algunos ensayos clínicos sugieren que el sulforafano puede reducir los marcadores de inflamación en afecciones como la obesidad, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones  
25 inflamatorias crónicas.

Aunque prometedora, la mayor parte de la investigación sobre su efecto antiinflamatorio se encuentra aún en sus primeras fases, y son necesarios más estudios clínicos para determinar la dosis óptima, la seguridad y la eficacia del sulforafano para tratar afecciones relacionadas con la inflamación en seres humanos.

30 Algunos estudios han señalado la posibilidad de utilizar el sulforafano para promover la producción de glóbulos blancos y tratar así la anemia causada por el estrés oxidativo que

resulta de la exposición a los rayos X gamma o a la radiación de protones [WO2007131973A2]. También se ha descrito el sulforafano como componente de composiciones complejas que incluyen otros compuestos naturales como triglicéridos de cadena media, extracto de té verde y curcumina para tratar la anemia desarrollada como efecto secundario indeseado de la radioterapia utilizada en tratamientos contra el cáncer [US11020372B2], sin establecer su relevancia dentro de la composición, ni describir una vía de acción clara que pueda atribuir estas propiedades de forma específica al sulforafano.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe por primera vez el **uso del sulforafano para tratar la talasemia y la anemia sideroblástica** gracias a sus propiedades como potente **inhibidor del inflammasoma NLRP1**. Se ha identificado el sulforafano como un potente **inhibidor de NLRP1**. NLRP1 es una proteína sensor que forma parte de los inflamasomas.

Los **inflammasomas** son complejos multiproteicos que desempeñan un papel crucial en el sistema inmunitario innato, sobre todo en la respuesta a las infecciones y al daño celular. Son responsables de la activación de los procesos inflamatorios, promoviendo la maduración de citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1- $\beta$  e interleucina 18. Se ha demostrado que inducen la piroptosis celular, un proceso de muerte programada distinto a la apoptosis.

Se componen de una proteína sensor, una proteína adaptadora y una proteína efectora.

La **proteína sensor** es típicamente un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que detecta microorganismos patógenos o señales de estrés. Algunos ejemplos de estos receptores son los receptores de tipo NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos), NLR (receptores que contienen repeticiones ricas en leucina) como el NLRP3 (receptor de la familia NLR que contiene un dominio de pirina o PYD 3) y el **NLRP1** (receptor de la familia NLR que contiene un dominio de pirina 1), y AIM2 (ausente en melanoma 2).

La **proteína adaptadora** es típicamente una proteína similar a una mota que contiene un CARD (dominio de activación y reclutamiento de caspasas). Es una proteína asociada a la apoptosis que facilita el ensamblaje del inflammasoma uniendo la proteína sensor a la proteína efectora. Estas proteínas adaptadoras también se conocen como ASC o PYCARD.

La **proteína efectora** es típicamente Caspasa-1, una enzima que, una vez activada, procesa citoquinas proinflamatorias.

La activación de los inflamasomas puede medirse mediante la oligomerización de ASC y la formación de specks o motas.

El papel del NLRP1 en la hematopoyesis se ha relacionado con la anemia asociada a la inflamación crónica. Estudios recientes señalan que NLRP1 regula críticamente la  
5 hematopoyesis [1].

**NLRP1** se corresponde con la proteína de cualquiera de las secuencias SEQ. ID. No. 1 a SEQ. ID. No. 5 que se exponen a continuación:

Isoforma 5 de NLRP1, con número de acceso NP\_001028225.1, que corresponde a **SEQ. ID. No. 1:**

10 LISTA DE SECUENCIAS

MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSGMEVASYLVAQ  
YGEQRAWDLALHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFPYSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMP  
WIHELPAAGCTQGSERRVLRQLPDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTST  
AVLGSWGSPPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDETSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVG  
15 PPQAHTSLQPHHPWEPSVRESLCSTWPWKNEFDNQKFTQLLLLQRPHPRSQDPLVKRS  
WPDYVEENRGHLIEIRDLFGPGLDTEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEAWGRGQLYGDRF  
QHVFYFSCRELAQSKVVSLAELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQEPSS  
ELCLHWSQPQPADALLGSLGKTLPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRK  
EYFYRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKELWALCLVPWVSWLACTCLMQQMKRKEKLTLSKTTT  
20 TLCLHYLAQALQAQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKTLFSPDDLKHKGLDGAIISTFLKMGILQ  
EHPIPLSYSFIHLCFQEFAAMSIVLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTEAYGIHGLFGASTTRFLL  
GLLSDEGEREMENIFHCRLSQQGRNLMQWVPSLQLLLQPHSLESLSLHCLYETRNKTFLLTQVMA  
HFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKLQIEGRQHRSTWSPTMVVLFWRVVPVTDAY  
WQILFSVLKVTRNLKELDLGNSLSHSAVKSLCKTLRRPRCLLETLRLAGCGLTAEDCKDLA  
25 FGLRANQTLTELDLSFNVLTDAGAKHLCQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDCCQDLASVLS  
ASPSLKELDLQNNLDDVGVRLLCGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMQRQELRALEQEKPKQ  
LLIFSRRKPSVMTPEGLDTGEMSNSTSSLKRQRLGSEARAASHVAQANLKLDDVSKIFPIAEI  
AGKSHEESSPEVVPVELLCVPSPASQGDHLTKPLGTDDDFWGPVATEVVDKEKNLYR  
VHFPVAGSYRWPNTGLCFVMREAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQHSMVMVAGPLLDIKAEPG  
30 AVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEEGMLLEKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLK  
MIHNALRFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFHLYLIPSDCSIRKAIDDLEMKFQFVRIHKPPPLTPLY  
MGCRTYVSGSGSGMLEILPKELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHGSGIRLQVKDKKDETLVW  
EALVKPGRNTSQPWNLRNDRDARRY

Isoforma 2 de NLRP1, con número de acceso NP\_055737.1, que corresponde a **SEQ. ID.**

**No. 2:**

MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSGMEVASYLVAQ  
YGEQRAWDLALHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFPYSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMP  
5 WIHELPAGCTQGSERRVLRQLPDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTST  
AVLGSWGSPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDETSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVG  
PPQAHTSLQPHHPWEPSVRESLCSTWPWKNEFDNQKFTQLLLLQRPHPRSQDPLVKRS  
WPDYVEENRGLHIEIRDLFGPGLDTQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEAWGRGQLYGDRF  
QHVFYFSCRELAQSKVVS LAELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQEPSS  
10 ELCLHWSQPQPADALLGSLLGKTILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRK  
EYFYRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKELWALCLVPWVSWLACTCLMQQMKRKEKLTLSKTTT  
TLCLHYLAQALQAQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKKTTFSPDDLKHXGLDGAISTFLKMGILQ  
EHPIPLSYSFIHLCFQEFAAMS YVLEDEKGRGKHSNCIIDEKTELEAYGIHGLFGASTTRFLL  
GLLSDEGEREMENIFHCRLSQGRNLMQWVPSLQLLLQPHSLES LHCLYETRNKTF LTQVMA  
15 HFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQ LIEGRQHRSTWSPTMVVLFWRWVPVTDAY  
WQILFSVLKVTRNLKELDL SGNLSHSAVKSLCKTLRRPRCLLET LRLAGCGLTAEDCKDLA  
FGLRANQTLTELDLSFNVLTDAGAKHLCQRLRQP SCKLQRLQLVSCGLTSDCCQDLASVLS  
ASPSLKELDLQNNLDDVGVRLLC EGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEM RQELRALEQEKPQ  
LLIFSRRKPSVMTPT EGLDTGEMSNSTSSLKRQRLG SERAASHVAQANL KLLDVSKIFPIAEI  
20 AEESPEVVPVELLCVPSPASQGD LHTKPLGTDDDFWGP TG PVATEVVDKEKNLYRVHFPV  
AGSYRWPNTGLCFVMREAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQH SWMVAGPLLDIKAEPGAVEAV  
HLPHFVALQGGHVDTS LFQMAHFKEEGMLLEKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNAL  
RFIPVTSVLLYHRVHPEEVT FHLYLIPSDCSIRKELELCYRSPGEDQLFSEFYVGH LGSGIRL  
QVKDKKDETLVWEALVKPGDLMPATTLIPPARI AVPSPLDAPQLLHFVDQYREQLIARVTSVE  
25 VVLDKLGQVLSQEYERVLAENTRPSQMRKLF SLSQSWDRKCKDGLYQALKETHPHLIM  
ELWEKGSKKGLLPLSS

Isoforma 1 de NLRP1, con número de acceso NP\_127497.1, que corresponde a **SEQ. ID.**

**No. 3:**

MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSGMEVASYLVAQ  
30 YGEQRAWDLALHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFPYSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMP  
WIHELPAGCTQGSERRVLRQLPDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTST  
AVLGSWGSPPQP SLAPREQEAPGTQWPLDETSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVG  
PPQAHTSLQPHHPWEPSVRESLCSTWPWKNEFDNQKFTQLLLLQRPHPRSQDPLVKRS  
WPDYVEENRGLHIEIRDLFGPGLDTQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEAWGRGQLYGDRF

QHVYFYFSCRELAQSKVVSLAELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQEPSS  
ELCLHWSQPQPADALLGSLLGKTILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRK  
EYFYRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKELWALCLVPWVSWLACTCLMQQMKRKEKLTLSKTTT  
TLCLHYLAQALQAQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKKTLPSPDDLKXGLDGAIISTFLKMGILQ  
5 EHPIPLSYSFIHLCFQEFFAAMSYVLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTEAYGIHGLFGASTTRFLL  
GLLSDEGEREMENIFHCRLSQQGRNLMQWVPSLQLLLQPHSLESLSHCLYETRNKTFLLTQVMA  
HFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQIEGRQHRSTWSPTMVVLFWRWVPVTDAY  
WQILFSVLKVTRNLKELDLSGNSLSHSAVKSLCKTLRRPRCLLETLRLAGCGLTAEDCKDLA  
FGLRANQTLTELDLSFNVLTDAGAKHLCQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDCCQDLASVLS  
10 ASPSLKELDQQNNLDDVGVRLLEGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMRELRALAEQEKPKQ  
LLIFSRRKPSVMTPTTEGLDTGEMSNSTSSLKRQRLGSERAASHVAQANLKLDDVSKIFPIAEI  
AEESPEVVPVELLCVPSPASQGDHHTKPLGTDDDFWGPTGPVATEVVDKEKNLYRVHFPV  
AGSYRWPNTGLCFVMREAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLLDIKAEPGAVEAV  
HLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEEGMLLEKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNAL  
15 RFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFHLYLIPSDCSIRKAIDLEMKFQFVRIHKPPPLTPLYMGCYR  
TVSGSGSGMLEILPKELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGIRLQVKDKKDETLVWEALVKP  
GDLMPATTLIPPARIAVPSPLDAPQLLHFVDQYREQLIARVTSVEVVLDKLHGQVLSQEQYE  
RVLAENTRPSQMRKLFSLSQSWDRKCKDGLYQALKETHPHLIMELWEKGSKKGLLPLSS

Isoforma 3 de NLRP1, con número de acceso NP\_127499.1, que corresponde a **SEQ. ID.**

20 **No.4:**

MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSGMEVASYLVAQ  
YGEQRAWDLALHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFPYSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMP  
WIHELPAGCTQGSERRVLRQLPDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTST  
AVLGSWGSPPQPAPREQEAPGTQWPLDETSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVG  
25 PPQAHTSLQPHHPWEPVRESLCSTWPWKNEFDNQKFTQLLLLQRPHPRSQDPLVKRS  
WPDYVEENRGHLIEIRDLFGPLDTQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEAWGRGQLYGDRF  
QHVYFYFSCRELAQSKVVSLAELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQEPSS  
ELCLHWSQPQPADALLGSLLGKTILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRK  
EYFYRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKELWALCLVPWVSWLACTCLMQQMKRKEKLTLSKTTT  
30 TLCLHYLAQALQAQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKKTLPSPDDLKXGLDGAIISTFLKMGILQ  
EHPIPLSYSFIHLCFQEFFAAMSYVLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTEAYGIHGLFGASTTRFLL  
GLLSDEGEREMENIFHCRLSQQGRNLMQWVPSLQLLLQPHSLESLSHCLYETRNKTFLLTQVMA  
HFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQIEGRQHRSTWSPTMVVLFWRWVPVTDAY  
WQILFSVLKVTRNLKELDLSGNSLSHSAVKSLCKTLRRPRCLLETLRLAGCGLTAEDCKDLA

FGLRANQTLTELDLSFNVLTDAGAKHLCQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDCCQDLASVLS  
ASPSLKELDLQQNNLDDVGVRLLCCEGLRHPACKLIRLGKPSVMTPTTEGLDGTGEMSNSTSSL  
KRQRLGSERAASHVAQANLKLLDVSKIFPIAIEIAEESSPEVVPVELLCVPSPASQGDHLTKPL  
GTDDDFWGPTGPVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVMREAVTVEIEFCVWD  
5 QFLGEINPQHSMVAGPLLDIKAEPGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEEGMLL  
EKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFHLYLIPSDCSI  
RKAIDDLEMKFQFVRIHKPPPLTPLYMGCRYTVSGSGSMLEILPKELELCYRSPGEDQLFS  
EFYVGHGSGIRLQVKDKKDETLVWEALVKPGDLMPATTLIPPARIAVPSPLDAPQLLHFVD  
QYREQLIARVTSVEVLDKLGQVLSQEYERVLAENTRPSQMRKLFSLSQSWDRKCKDG  
10 LYQALKETHPHLIMELWEKGSKKGLLPLSS

Isoforma 4 de NLRP1, con número de acceso NP\_127500.1, que corresponde a **SEQ. ID. No. 5:**

MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSGMEVASYLVAQ  
YGEQRAWDLALHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFPYSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMP  
15 WIHELPAAGCTQGSERRVLRQLPDTSGRRWREISASLLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTST  
AVLGSWGSPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDETSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVG  
PPQAHTSLQPHHPWEPSVRESLCSTWPWKNEFDNQKFTQLLLLQRPHPRSQDPLVKRS  
WPDYVEENRGLHIEIRDLFGPLDTEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEAWGRGQLYGDRF  
QHVFYFSCRELAQSKVVSLELIGKDGATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQEPSS  
20 ELCLHWSQPQPADALLGSLLGKTILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRK  
EYFYRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKELWALCLVPWVSWLACTCLMQMKRKEKLTLSKTTT  
TLCLHYLAQALQAQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKKTLSFDDLRKHGLDGAISTFLKMGILQ  
EHPIPLSYSFIHLCFQEFAAMSYLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTEAYGIHGLFGASTTRFLL  
GLLSDEGEREMENIFHCRLSQGRNLMQWVPSLQLLLQPHSLES LHCLYETRNKTFLTQVMA  
25 HFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQIEGRQHRSTWSPTMVVLFWRVVPVTDAY  
WQILFSVLKVTRNLKELDLSGNSLSHSAVKSLCKTLRRPRCLLETLRLAGCGLTAEDCKDLA  
FGLRANQTLTELDLSFNVLTDAGAKHLCQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDCCQDLASVLS  
ASPSLKELDLQQNNLDDVGVRLLCCEGLRHPACKLIRLGKPSVMTPTTEGLDGTGEMSNSTSSL  
KRQRLGSERAASHVAQANLKLLDVSKIFPIAIEIAEESSPEVVPVELLCVPSPASQGDHLTKPL  
30 GTDDDFWGPTGPVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVMREAVTVEIEFCVWD  
QFLGEINPQHSMVAGPLLDIKAEPGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEEGMLL  
EKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFHLYLIPSDCSI  
RKELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHGSGIRLQVKDKKDETLVWEALVKPGDLMPATTLIPPA

RIAVPSPLDAPQLLHFVDQYREQLIARVTSVEVVLDKLHGQVLSQEYERVLAENTRPSQM  
RKLFSLSQSWDRKCKDGLYQALKETHPHLIMELWEKGSKKGLLPLSS

En la presente invención se demuestra el papel del sulforafano como inhibidor de NLRP1 a partir de un cribado con una biblioteca de compuestos bioactivos, donde se comprobó que el  
5 compuesto 6 (correspondiente al sulforafano) tenía una potente capacidad para inhibir la activación de NLRP1 observada mediante la oligomerización de ASC. Para realizar estos ensayos se utilizaron células que expresaban la proteína de fusión ASC-GFP de forma estable para expresar NLRP1 y se observó el efecto inhibidor de la oligomerización de ASC dependiente de NLRP1 mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 1**).

10 A continuación, se probó la respuesta de estas células a distintas dosis de sulforafano para comprobar la eficacia de este compuesto inhibiendo la actividad NLRP1. Se observó una potente inhibición de sulforafano en la actividad NLRP1 con 5  $\mu$ M (**Figura 2**), capaz incluso de revertir la activación de la actividad NLRP1 mediada por la anisomicina (**Figura 3 y 4**).

Para verificar que la inhibición es específica de NLRP1, se utilizó una línea celular *Knockout*  
15 desarrollada que carece de NLRP1 en el contexto eritrocitario. La línea celular *Knockout* utilizada es la K562, la cual puede diferenciarse a eritrocitos utilizando hemina (**Figura 5**). Se detectó una mayor toxicidad en las células con NLRP1 que en las células en las que NLRP1 está ausente, indicativo de la especificidad del sulforafano sobre NLRP1.

Tras observar el efecto de sulforafano en la inhibición de NLRP1, se probó el potencial de  
20 esta inhibición para restaurar la eritropoyesis. Para ello se realizaron varios ensayos de formación de colonias eritroides con muestras *ex vivo* de pacientes con talasemia y anemia sideroblástica. **Se comprobó que la inhibición de NLRP1 con sulforafano tenía un efecto positivo en la producción de eritrocitos (Figura 6)**. Estos resultados avalan una nueva función de sulforafano por un lado inhibiendo la activación de NLRP1, y por otro lado,  
25 restaurando la eritropoyesis en pacientes con talasemia y anemia sideroblástica.

Por tanto, en un **primer aspecto** de la presente invención se describe el sulforafano para su uso como inhibidor de NLRP1.

En un **segundo aspecto** de la presente invención se describe el sulforafano para su uso como inhibidor de inflamomas caracterizados por comprender NLRP1 como proteína  
30 sensor.

Los términos "inhibir" e "inhibición" se refieren a ralentizar, detener o revertir una actividad, vía de activación o mecanismo de acción de una molécula. La inhibición puede ser mayor de aproximadamente 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95% o 99%, por ejemplo, en comparación con la actividad que ocurre en ausencia del tratamiento.

5 En un **tercer aspecto** de la invención se describe el sulforafano para su uso como medicamento en el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan con la activación de inflamomas caracterizados por comprender NLRP1 como proteína sensor.

Un **cuarto aspecto** de la presente invención describe el sulforafano para su uso en el tratamiento y/o prevención de la talasemia y la anemia sideroblástica.

10 Un **quinto aspecto** de la invención refiere a una composición que comprende sulforafano para su uso en el tratamiento y/o prevención de la talasemia y la anemia sideroblástica.

Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica y más preferiblemente, además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier sustancia utilizada para el diagnóstico, prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en un ser humano o en animales. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas.

20 El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica que comprende la composición de la invención, estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda en la fabricación de la misma en el sentido de darle consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así, los excipientes podrían tener la función de mantener unidos los ingredientes, como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función colorante, una función protectora, como por ejemplo aislarla del aire y/o de la humedad, una función de relleno para un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de formulación, una función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

30 Un "soporte farmacéuticamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") se refiere a cualquier sustancia, o combinación de sustancias, conocida en el sector farmacéutico,

utilizada en la fabricación de formas farmacéuticas de administración e incluye, entre otros, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El portador puede ser una sustancia inerte o tener una acción similar a cualquiera de los compuestos de la presente invención, teniendo la función de facilitar la incorporación del fármaco, así como de otros compuestos, 5 permitiendo una mejor dosificación y administración o proporcionando consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma farmacéutica es líquida, el portador es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere al hecho de que el compuesto al que se refiere está permitido y evaluado para que no cause daño a los organismos a los que se administra.

10 La composición farmacéutica de la invención puede administrarse a través de cualquier vía de administración, y como tal, dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Así, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal, intravenosa o intraperitoneal.

15 La composición farmacéutica puede comprender además otro principio activo o compuesto útil en el tratamiento de la anemia en general, y de la talasemia y la anemia sideroblástica, en particular.

La composición farmacéutica puede incluir una composición única o composiciones separadas.

20 La composición farmacéutica puede incluir una cantidad eficaz sulforafano.

El término "cantidad eficaz" utilizado en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para bloquear o inhibir NLRP1 y para prevenir o tratar así la talasemia y la anemia sideroblástica en un individuo que necesite dicha prevención o tratamiento.

La cantidad eficaz puede seleccionarse adecuadamente en función del individuo 25 seleccionado por un experto en la materia en función de la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, el peso corporal, las condiciones de salud, el sexo, la sensibilidad al fármaco del paciente, la duración de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento y otros factores, incluido el uso de un fármaco en combinación con la composición farmacéutica o al mismo tiempo que ésta, y otros factores 30 conocidos en el campo de la medicina. La terapia se considera "personalizada" cuando el compuesto que se administra al individuo para tratar una enfermedad está especialmente

adaptado a las características tanto genotípicas como fenotípicas del individuo que va a ser tratado, evitando así la pérdida de tiempo con terapias no efectivas.

El término "prevención", tal como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad del compuesto de la invención o de la composición farmacéutica de la invención, para evitar, minimizar o 5 dificultar la progresión de talasemia y la anemia sideroblástica.

El término "tratamiento", tal como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad del compuesto de la invención o de la composición farmacéutica de la invención, minimizar, disminuir o revertir total o parcialmente los efectos de la talasemia y la anemia sideroblástica.

El término "paciente", "individuo" o "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se 10 refiere a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, preferiblemente primates y seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Un último aspecto de la invención se refiere a un método de selección de agentes terapéuticos útiles en la prevención, mejora, alivio, y/o el tratamiento de la talasemia y la anemia sideroblástica, que comprende:

15 a) determinar la actividad de NLRP1 a una concentración establecida del compuesto a analizar o en ausencia de dicho compuesto,

b) determinar la actividad de NLRP1 a una concentración del compuesto a analizar diferente de la de a).

Los compuestos que inhiben la actividad de NLRP1 se identificarían como agentes 20 terapéuticos potenciales frente a la talasemia y la anemia sideroblástica.

Determinar la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad de NLRP1 puede realizarse, por ejemplo, determinando la capacidad de NLRP1 de unirse o interaccionar con una molécula diana de dicho compuesto, de manera directa o indirecta. Pueden ser también ensayos de actividad, midiendo de manera directa o indirecta la actividad de NLRP1.

25 También puede ser un ensayo de expresión, determinando de manera directa o indirecta la expresión del ARNm de NLRP1 o de la proteína NLRP1. Estos ensayos también pueden combinarse con un ensayo *in vivo* midiendo el efecto de un compuesto sobre los síntomas de enfermedades relacionadas con NLRP1, y en concreto de la anemia, y más concretamente de talasemia y la anemia sideroblástica (por ejemplo, pero sin limitarse, 30 sobre modelos animales u otros sistemas modelo conocidos en la técnica).

Los compuestos a testar empleados en el método de selección de agentes terapéuticos no se limitan a moléculas orgánicas de bajo peso molecular, proteínas (incluyendo anticuerpos), péptidos, oligonucleótidos, etc. Pueden ser compuestos naturales y/o sintéticos.

5 Por ejemplo, anticuerpos capaces de unirse a NLRP1, que pueden ser empleados terapéuticamente, como se ha expuesto anteriormente, pueden emplearse también en ensayos inmunohistoquímicos, como Western blots, ELISAs, radioinmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, u otros ensayos inmunohistoquímicos conocidos en el estado de la técnica. Los polipéptidos de NLRP1 pueden emplearse para inmunizar a un animal, para  
10 obtener anticuerpos policlonales. También se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas que permiten la producción de anticuerpos por líneas celulares en cultivo, entre las que se incluyen, pero sin limitarse, hibridomas, hibridomas de células B humanas. Técnicas para producir anticuerpos quiméricos, humanizados o sintéticos son conocidas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el  
15 presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas  
20 y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o podrán conocerse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1. Ensayo de inhibición del inflammasoma con una batería de compuestos. (A)** Imágenes de fluorescencia representativas de los compuestos testados como inhibidores de NLRP1 en la línea celular HEK293. **(B)** Cuantificación de células en las que ASC se encuentra oligomerizado (formación de specks o motas), lo que corresponde con una activación del inflammasoma NLRP1. El control positivo (+) se refiere a las células  
30 transfectadas con NLRP1 y ASC-GFP sin tratar, el control negativo (-) a células transfectadas únicamente con ASC-GFP y el control DMSO es similar al control positivo añadiendo el vehículo de los compuestos. Las células tratadas con el compuesto 6 presentan un menor número de specks o motas. Se realizaron tres experimentos

independientes (n=3). La estadística se ha realizado mediante el test ANOVA de una vía, comparando los compuestos con la condición DMSO. \*\* Valor de p menor de 0,01.

**Figura 2. Ensayo dosis-respuesta de sulforafano en la activación del inflamasoma NLRP1 en células HEK293 ASC-GFP.** Las células HEK293 ASC-GFP se transfectaron con NLRP1 y se trataron con sulforafano (SFN) durante 24 horas a diferentes concentraciones: 2,5µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM y sin sulforafano como control (C-). **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia GFP, tinción Hoescht y superposición de ambas. **(B)** Cuantificación de la formación de specks o motas de ASC-GFP, como indicativo de la activación de NLRP1. Se realizaron tres experimentos independientes (n=3). La estadística se ha realizado mediante el test ANOVA de una vía, comparando los compuestos con la condición control. \*\* Valor de p menor de 0,01 y \*\*\*\* valor menor de 0,0001.

**Figura 3. Ensayo dosis-respuesta de sulforafano en la activación del inflamasoma NLRP1 en células HEK293 activadas con anisomicina.** Las células HEK293 ASC-GFP NLRP1 se trataron a concentraciones 5 µM o 10 µM de sulforafano (SNF) o sin sulforafano como control (C-), durante 24 horas. 3 horas antes de su visualización se trataron con un activador descrito para NLRP1, la anisomicina (Aniso) a 10 µg/ml. **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia GFP, tinción Hoescht y superposición de ambas. **(B)** Cuantificación de la formación de specks o motas de ASC-GFP. Se realizaron tres experimentos independientes (n=3). La estadística se ha realizado mediante el test ANOVA de una vía, comparando los compuestos con la condición anisomicina (aniso). \*\*\*\* Valor de p menor de 0,0001.

**Figura 4. Ensayo dosis-respuesta de sulforafano en la activación del inflamasoma NLRP1 en células A549 activadas con anisomicina.** Las células A549 ASC-GFP NLRP1 se trataron a concentraciones de 2,5 µM, 25 µM, 40 µM y 50 µM de sulforafano (SNF) o sin sulforafano como control (C-), durante 24 horas. 3 horas antes de su visualización se trataron con un activador descrito para NLRP1, la anisomicina (Aniso) a 10 µg/ml. **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia GFP, tinción Hoescht y superposición de ambas. **(B)** Cuantificación de la formación de specks o motas de ASC-GFP. Se realizaron tres experimentos independientes (n=3). La estadística se ha realizado mediante el test ANOVA de una vía, comparando los compuestos con la condición anisomicina (aniso). \*\*\*\* Valor de p menor de 0,0001.

**Figura 5. Ensayo MTT para probar la toxicidad de sulforafano en células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) y aceleración de la diferenciación**

**eritroide *in vitro* con sulforafano. (A)** Western Blot. Expresión de proteína NLRP1 en dos clones diferentes de células K562 deficientes en NLRP1, generadas mediante la tecnología CRISPR-Cas9, comparadas con dos clones de la cepa silvestre (WT), Actina utilizada como control positivo. **(B)** Imagen representativa de células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) a las 0 y 24 horas tras el tratamiento con hemina. Las células deficientes en NLRP1 presentan una mayor acumulación de hemoglobina, lo que corresponde con un estado más avanzado de diferenciación eritroide. **(C)** Western Blot. Niveles de proteína de NLRP1, GATA1, NLRP3 y Actina (como control) a distintas horas (0, 24, 48, 96 h) después de la diferenciación con hemina en células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>). **(D)** Ensayo de MTT (estudio de la viabilidad) de células K562 tratadas durante 48 horas antes de realizar el ensayo con distintas concentraciones de sulforafano (SNF): 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM y 0 µM (control). Las medidas se muestran como unidades arbitrarias de fluorescencia (UA). **(E)** Western Blot. Niveles de proteína de NLRP1, GATA1 y Actina (control positivo) en células K562 a tiempo 0, 24 y 48 h después de la diferenciación con hemina. Se muestran los resultados de células tratadas con sulforafano a 25 µM o con DMSO (control). Se realizaron dos (D-E) o tres (A-C) experimentos independientes. La estadística se ha realizado mediante el test ANOVA de dos vías, comparando las células WT con las NLRP1<sup>-/-</sup>. \*\*\* Valor de p menor de 0,001 y \*\*\*\* menor de 0,0001.

**Figura 6. Efecto de sulforafano restaurando la producción de eritrocitos en células primarias de donantes sanos y pacientes de anemia sideroblástica.** Recuento de colonias eritroides en ensayos de metilcelulosa usando PBMCs de donantes sanos **(A)**, un paciente de anemia sideroblástica congénita **(B)** y cuatro pacientes de talasemia diferentes **(C)**. Se realizaron dos experimentos independientes con cada uno de los pacientes (n=2). La estadística se ha realizado mediante el test ANOVA de una vía, comparando el tratamiento con sulforafano a diferentes concentraciones con el control con DMSO. \*\* Valor de p menor de 0,01 y \*\*\*\* menor de 0,0001.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Cultivos celulares

Para los distintos ensayos de inhibición del inflammasoma se utilizaron células HEK293 (células embrionarias de riñón humano) que expresan de forma estable ASC-GFP, y células A549 (células de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano) que expresan de forma estable ASC-GFP y NLRP1.

Para los ensayos de toxicidad del sulforafano se utilizaron células K562 (células inmortalizadas de leucemia mieloide crónica humana) y se generó una línea celular K562 deficiente en NLRP1.

Se verificó que las diferentes líneas celulares estuvieran libres de contaminación por micoplasma y se autenticaron mediante perfilado STR. Las células se mantuvieron y subcultivaron antes de alcanzar la confluencia cada 72 horas.

### **Ensayo de inhibición del inflammasoma con una batería de compuestos.**

Células HEK293 se mantuvieron en medio de cultivo DMEN suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), 2 mM de glutamina y un 1% de penicilina-estreptomicina (Life Technologies).

Las células HEK293 a una confluencia del 70-80% en placas de 24 pocillos se transfectaron con NLRP1 y ASC-GFP usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El control negativo fue únicamente transfectado con ASC-GFP.

A las 4 horas tras la transfección se cambió el medio de cultivo y se añadió la batería de compuestos indicada a continuación: compuesto 1: ácido p-cumárico; compuesto 2: ácido ferúlico; compuesto 3: ácido cafeico; compuesto 4: ácido rosmarínico; compuesto 5: ácido vanílico; compuesto 6: sulforafano; compuesto 7: ácido siríngico; compuesto 8: ácido protocatéquico; compuesto 9: ácido clorogénico; compuesto 10: ácido sinapínico; compuesto 11: ácido homovanílico; compuesto 12: ácido 2-picolínico; compuesto 13: ácido nicotínico; compuesto 14: tirosol y compuesto 15: ácido deshidroacético.

Para la evaluación de la capacidad de inhibición de los compuestos, se observó mediante microscopía de fluorescencia la oligomerización de ASC. Tal y como se muestra en la **Figura 1A** se capturaron imágenes de los specks o motas (fluorescencia verde) utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMI8. La formación de specks o motas corresponde con una activación del inflammasoma NLRP1, con lo que a menor cantidad de specks o motas, mayor es la capacidad de inhibición de los compuestos testados. Las células tratadas con el compuesto 6 presentaron un menor número de specks o motas.

La cuantificación se realizó con el programa Fiji. Se aplicó un umbral y se utilizó el analizador de partículas para contar el número total de células. El instrumento multipunto se empleó para contar el número de puntos fluorescentes (specks o motas). Se creó un gráfico

calculando el porcentaje de puntos en relación con el número total de células y puntos (**Figura 1B**). Se realizaron tres experimentos independientes (n=3). Se observa claramente como las células tratadas con el compuesto 6 presentaron un menor número de specks o motas respecto al control positivo (células transfectadas con NLRP1 y ASC-GFP y sin tratar) y respecto al resto de compuestos probados. El resultado del compuesto 6 fue similar al del control negativo (células transfectadas únicamente con ASC-GFP, no transfectadas con NLRP1, y que por tanto no expresan NLRP1).

#### **Efecto del sulforafano en la activación del inflammasoma NLRP1.**

Se utilizó la línea celular HEK293 que expresa de forma estable ASC-GFP y la línea celular A549 que expresa de forma estable ASC-GFP y NLRP1 (donadas por el Dr. E. Meunier). Se mantuvieron y cultivaron en las mismas condiciones que las células HEK293.

Se llevaron a cabo ensayos sobre el efecto de distintas concentraciones de sulforafano con la línea celular HEK293 transfectada con NLRP1 (**Figura 2**), la línea celular HEK293 transfectada con NLRP1 y activada con anisomicina (un activador descrito para NLRP1 humano) (**Figura 3**) y con la línea celular A549, que expresan de forma estable ASC-GFP y NLRP1, activada con anisomicina (**Figura 4**).

#### Evaluación de la oligomerización de ASC mediante microscopía de fluorescencia

A las 24 horas de la transfección se realizó una tinción con Hoechst (H3570, Invitrogen) y se capturaron imágenes a 4X y 20X de los núcleos (fluorescencia azul) y los puntos (fluorescencia verde) utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (**Figura 2A, 3A y 4A**).

La cuantificación se realizó con el programa Fiji. Se aplicó un umbral y se utilizó el analizador de partículas para contar el número total de células. El instrumento multipunto se empleó para contar el número de puntos fluorescentes (specks o motas). La formación de specks o motas de ASC-GFP es indicativa de la activación de NLRP1.

Se creó un gráfico calculando el porcentaje de puntos en relación con el número total de células y puntos (**Figura 2B, 3B y 4B**). Se realizaron tres experimentos independientes (n=3).

Ensayo dosis-respuesta de sulforafano

Células HEK293 con expresión estable de ASC-GFP transfectadas con NLRP1 se trataron con sulforafano durante 24 horas a diferentes concentraciones: 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M, incluyendo una condición sin sulforafano como control.

En la **Figura 2A** se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia cuyos resultados se pueden comprobar en el gráfico de la **Figura 2B**, donde observa una clara inhibición de NLRP1 respecto al control a partir de una concentración de sulforafano de 5  $\mu$ M.

Ensayo dosis-respuesta de sulforafano en células activadas con anisomicina

Células HEK293 con expresión estable de ASC-GFP se transfectaron con NLRP1 y se trataron con sulforafano a concentraciones de 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M durante 24 horas, incluyendo una condición sin sulforafano como control.

3 horas antes de su visualización se trataron con un activador descrito para NLRP1, la anisomicina, a 10  $\mu$ g/ml.

En la **Figura 3A** se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia cuyos resultados se pueden comprobar en el gráfico de la **Figura 3B**, donde observa el efecto activador de la anisomicina respecto al control y como el tratamiento con sulforafano a 5  $\mu$ M logra revertir dicha activación, volviendo a los valores del control. El tratamiento con 10  $\mu$ M tiene un efecto inhibitorio tal que, además de revertir totalmente la activación debida a la anisomicina, reduce los valores de células con ASC incluso por debajo de los valores del control.

La línea celular A549, que expresa de forma estable ASC-GFP y NLRP1, se trató con sulforafano a 2,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, durante 24 horas, incluyendo una condición sin sulforafano como control, y 3 horas antes de su visualización se trató con anisomicina a 10  $\mu$ g/ml. Las dosis empleadas fueron superiores que en células HEK293 porque estas células son más resistentes al tratamiento.

En la **Figura 4A** se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia cuyos resultados se pueden comprobar en el gráfico de la **Figura 4B**, donde observa que el sulforafano es capaz de anular el efecto activador de la anisomicina a una concentración de 2,5  $\mu$ M, y de provocar una inhibición en el inflamasoma, a pesar del uso de la anisomicina, a concentraciones a partir de 25  $\mu$ M.

**Ensayo MTT para probar la toxicidad de sulforafano en células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) y aceleración de la diferenciación eritroide *in vitro* con sulforafano.**

Generación de la línea celular K562 deficiente en NLRP1

5 Las células K562 mantuvieron en medio de cultivo RPMI suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), 2 mM de glutamina y un 1% de penicilina-estreptomicina (Life Technologies).

Para llevar a cabo el *Knock-out* de NLRP1 en células K562 se utilizó el electroporador NEPA21 para introducir en las células la proteína Cas9 y las guías. Las células se lavaron  
10 con Optimem para eliminar el exceso de suero y restos de antibióticos antes de la electroporación, y no se añadieron antibióticos durante el proceso de electroporación ni inmediatamente después de este. La electroporación se realizó a 200 V y 3,0 ms, logrando un 80% de células positivas. Para las células K562 se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de Optimem. La Cas9 D10A y las guías fueron adquiridas de IDT. Se  
15 seleccionaron dos combinaciones de guías diferentes 5'-ccaccgcagtgctaatgcc-3' (**SEQ. ID. No. 6**), 5'-accccaggtgggggttcactt-3' (**SEQ. ID. No. 7**), y 5'-ctggatccatgaattgccgg-3' (**SEQ. ID. No. 8**), 5'-attagcactgcggtggaggt-3' (**SEQ. ID. No. 9**).

Análisis de expresión proteica por inmunotransferencia

Se determinó el nivel de expresión de la proteína NLRP1 (usando actina como control  
20 positivo) en diferentes clones de células K562 deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) comparadas con clones de la cepa silvestre (WT) (**Figura 5A**).

Posteriormente, las células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) se diferenciaron a eritrocitos con hemina 50  $\mu$ M (**Figura 5B**) para observar la acumulación de hemoglobina tras 24h, que corresponde con un estado avanzado de diferenciación eritroide.

25 También se determinó el nivel de expresión de las proteína NLRP1, GATA1 y NLRP3 (usando actina como control positivo) en células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) diferenciadas con hemina 50  $\mu$ M, tras 24, 48 y 96 h (**Figura 5C**).

Finalmente se determinó el nivel de expresión de las proteína NLRP1 y GATA1 (usando actina como control positivo) en células K562 silvestres (WT) y deficientes en NLRP1  
30 (NLRP1<sup>-/-</sup>) diferenciadas con hemina 50  $\mu$ M, tras 24 y 48 h, tratadas con sulforafano a 25  $\mu$ M o con DMSO (control) (**Figura 5E**).

Para cuantificar los niveles de expresión de proteínas, tras los distintos tratamientos, las células se lisaron en una solución de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% (p/v) NP-40 y un cóctel de inhibidores de proteasas fresco (1/20, #P8340, Sigma-Aldrich). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit BCA, con BSA como estándar. Los lisados celulares (40 µg) en buffer de muestra SDS se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas PVDF. Las membranas se incubaron durante 1 hora con TTBS que contenía 5% (p/v) de leche desnatada en polvo o 2% (p/v) de BSA. Posteriormente, se inmunodetectaron en el mismo buffer durante 16 horas a 4°C con los distintos anticuerpos primarios diluidos 1/1000. Luego, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con HRP, diluidos 1/2500 en 5% (p/v) de leche desnatada en TTBS. La señal se detectó con un reactivo de quimioluminiscencia mejorada y el sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad). Los anticuerpos primarios usados fueron GATA1 (#3535, Cell Signaling), NLRP1 (#AF6788, R&D Systems), NLRP3 (#AG-20B-0014, Adipogen) y β-ACTINA (ACTB-HRP) (#sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Anti-oveja (#31480, Thermo Fisher), Anti-conejo (#A6154, Sigma-Aldrich) y Anti-ratón (#A4416, Sigma-Aldrich).

Tal y como se puede apreciar en la **Figura 5A** las células K562 deficientes en NLRP1 (NLRP1<sup>-/-</sup>) no expresaban la proteína NLRP1, tal y como cabía esperar.

La diferenciación con hemina tuvo como efecto una progresión del estado de diferenciación eritroide (**Figura 5B**) que fue mayor en el caso de células K562 deficientes en NLRP1, lo que avala la inhibición de NLRP1 humano como una estrategia para promover la diferenciación eritroide.

En células tratadas con hemina (**Figura 5C**) se observó la inhibición de la expresión de GATA1 a partir de las 24 h, tanto en células silvestres como deficientes en NLRP1. GATA1 es un factor de transcripción esencial en la diferenciación eritroide y su aceleración en la degradación indica una mayor diferenciación eritroide como se observa también en la acumulación de hemoglobina en los pellets tratados 24h con hemina (**Figura 5B**).

NLRP1 solamente se expresó en células silvestres, como cabía esperar, mostrándose un pico de expresión a las 48 horas de la administración de la hemina.

NLRP3, el inflammasoma más estudiado, no se expresa en ninguno de los dos tipos celulares (ni en silvestres, ni en deficientes en NLRP1), lo que indicaría que no juega ningún papel en este proceso.

La administración de sulforafano (**Figura 5E**) inhibió la expresión de NLRP1 a tiempo 24h y 48h, llegando casi a inhibirse totalmente a tiempo 24h. Lo que de nuevo llevo a una reducción significativa de los niveles de GATA1 en las células con sulforafano e indicativo de una mayor diferenciación eritroide.

## 5 Ensayo de MTT

La viabilidad de las células diferenciadas en presencia de distintas concentraciones de sulforafano, medida como la capacidad metabólica celular, se evaluó mediante ensayos de MTT (reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, un tetrazolio amarillo, a formazán púrpura por enzimas mitocondriales). En resumen, 100.000 células  
10 K562 se sembraron en placas de 96 pocillos, tratadas con sulforafano a concentraciones de 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 0  $\mu$ M (control) durante los tiempos 48 horas.

Se añadió MTT (Alfa Aesar, Thermo Fisher, Karlsruhe, Alemania) a una concentración final de 483  $\mu$ M (0.2 mg/ml) y las células se incubaron por 1 h a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se añadió a cada pocillo una solución de solubilización de isopropanol  
15 acidificado que contenía 0,04 M de ácido clorhídrico y 0,1% de detergente NP-40 para lisar las células y disolver el producto insoluble de formazán púrpura formado dentro de las células, obteniendo una solución coloreada.

Finalmente, se midió la absorbancia a 550 nm con un espectrofotómetro lector de placas (Spectrostar Nano; BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Las medidas se muestran como  
20 unidades arbitrarias de fluorescencia (UA). La viabilidad de las células tratadas se determinó comparándola con las condiciones de control (100% de viabilidad, 0% de citotoxicidad), en las cuales las células solo estuvieron expuestas a medio con la dosis equivalente de vehículo (DMSO).

Tal y como se puede apreciar en la **Figura 5D**, tanto las células silvestres como las  
25 deficientes en NLRP1 empiezan a decaer a partir de 5 $\mu$ M de sulforafano, siendo más acuciante la pérdida de viabilidad en células WT a partir de una concentración de 10  $\mu$ M, pero resultando claramente tóxicas concentraciones a partir de 25  $\mu$ M de independientemente del tipo celular. La mayor toxicidad del sulforafano en las células con NLRP1 respecto a las células en las que NLRP1 está ausente, que se puede observar a  
30 partir de concentraciones de 10  $\mu$ M, es indicativa de la especificidad del sulforafano sobre NLRP1.

**Efecto *in vitro* de sulforafano restaurando la producción de eritrocitos en células primarias de donantes sanos y pacientes con anemia sideroblástica y talasemia.**

Se obtuvieron muestras de sangre de donantes sanos o de pacientes de  $\beta$  talasemia y anemia sideroblástica proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Clínico 5 Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) bajo los números de aprobación ética (2021-11-9-HCUVA; 2023-3-5-HCUVA).

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se purificaron mediante centrifugación en gradiente estándar con Ficoll-Paque (Cytiva).

Ensayo de formación de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E)

10 Se cultivaron PBMCs de donantes sanos o de pacientes de  $\beta$  talasemia y anemia sideroblástica ( $1 \times 10^5$  células) en 1 ml de medio a base de metilcelulosa MethoCult™ (Stemcell) en presencia de sulforafano a concentración de  $2.5 \mu\text{M}$ , y usando DMSO como control de vehículo. Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) se contaron tras 14 días 15 de cultivo.

Tal y como se puede apreciar en la **Figura 6A**, en células de pacientes sanos la administración de sulforafano a concentraciones de  $2,5 \mu\text{M}$ , tiene un efecto potenciador de la generación de unidades formadoras de colonias eritroides.

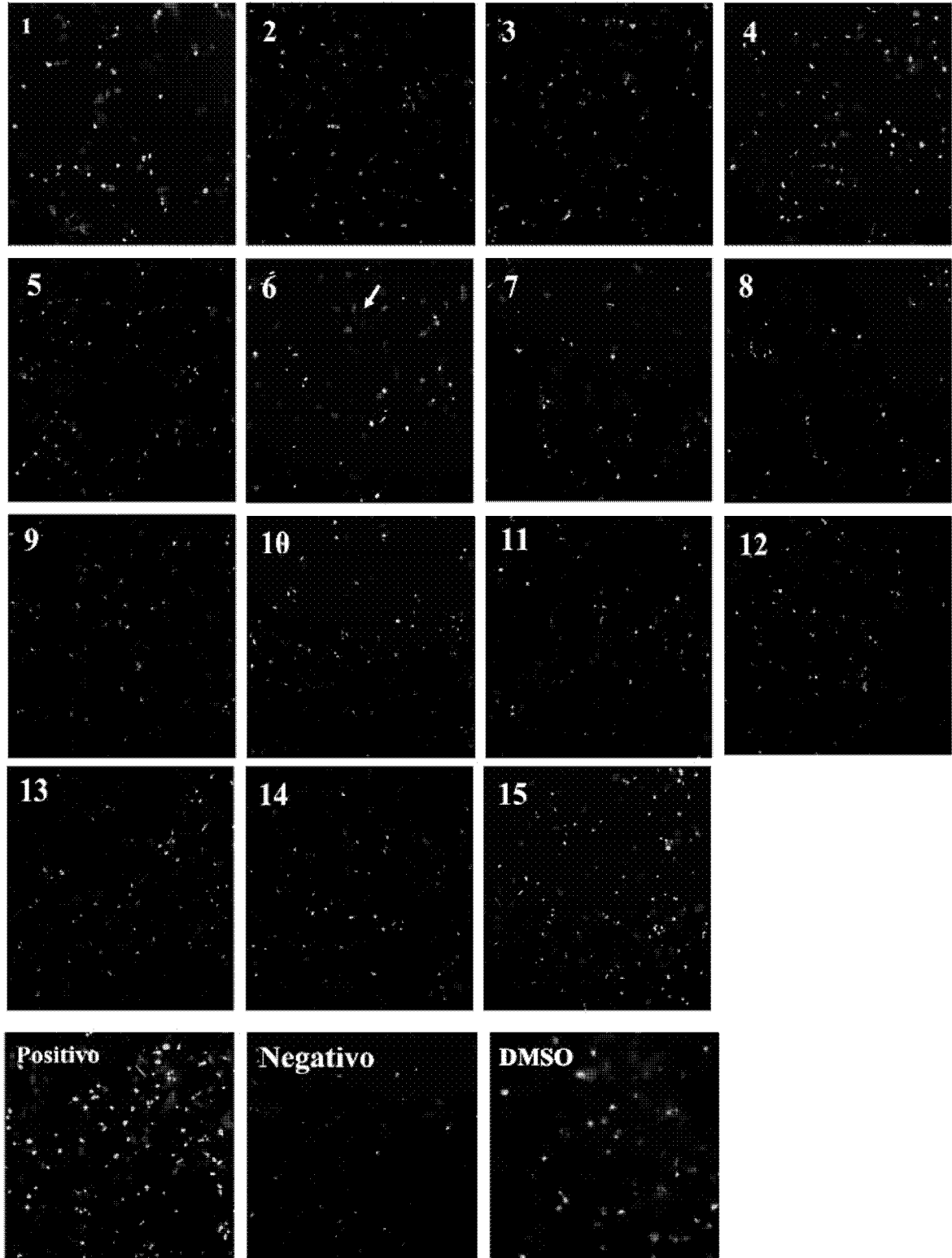
Este efecto se ve igualmente en células de pacientes con anemia sideroblástica (**Figura 6B**) 20 y con talasemia (**Figura 6C**) tratadas con sulforafano a concentraciones de  $2,5 \mu\text{M}$  donde se restaura la eritropoyesis.

**Referencias**

1. Rodríguez-Ruiz, L. et al. ZAK and P38 kinase signaling pathway regulates hematopoiesis by activating the NLRP1 inflammasome. EMBO Molecular Medicine. 25 2023/10/11. <https://doi.org/10.15252/emmm.202318142>.

**REIVINDICACIONES**

1. Sulforafano para su uso como medicamento inhibidor del NLRP1 humano.
2. Sulforafano para su uso como medicamento inhibidor de inflammasomas humanos  
5 caracterizados por comprender NLRP1 como proteína sensor.
3. Sulforafano para su uso como medicamento en el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan con la activación de inflammasomas humanos caracterizados por comprender NLRP1 como proteína sensor.
- 10 4. Sulforafano para su uso en el tratamiento y/o prevención de la talasemia humana y la anemia sideroblástica humana.
5. Composición que comprende sulforafano para su uso en el tratamiento y/o  
15 prevención de la talasemia humana y la anemia sideroblástica humana.
6. Composición que comprende sulforafano para su uso según la reivindicación 5, que además comprende excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 20 7. Método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento y/o prevención de la talasemia humana y la anemia sideroblástica humana:
  - a) determinar la actividad de NLRP1 a una concentración establecida del compuesto a analizar o en ausencia de dicho compuesto, y
  - b) determinar la actividad de NLRP1 a una concentración del compuesto a analizar  
25 diferente de la de a), de forma que los compuestos capaces de inhibir la actividad de NLRP1 se identifican como agentes terapéuticos frente a la talasemia y la anemia sideroblástica.



**FIG. 1A**

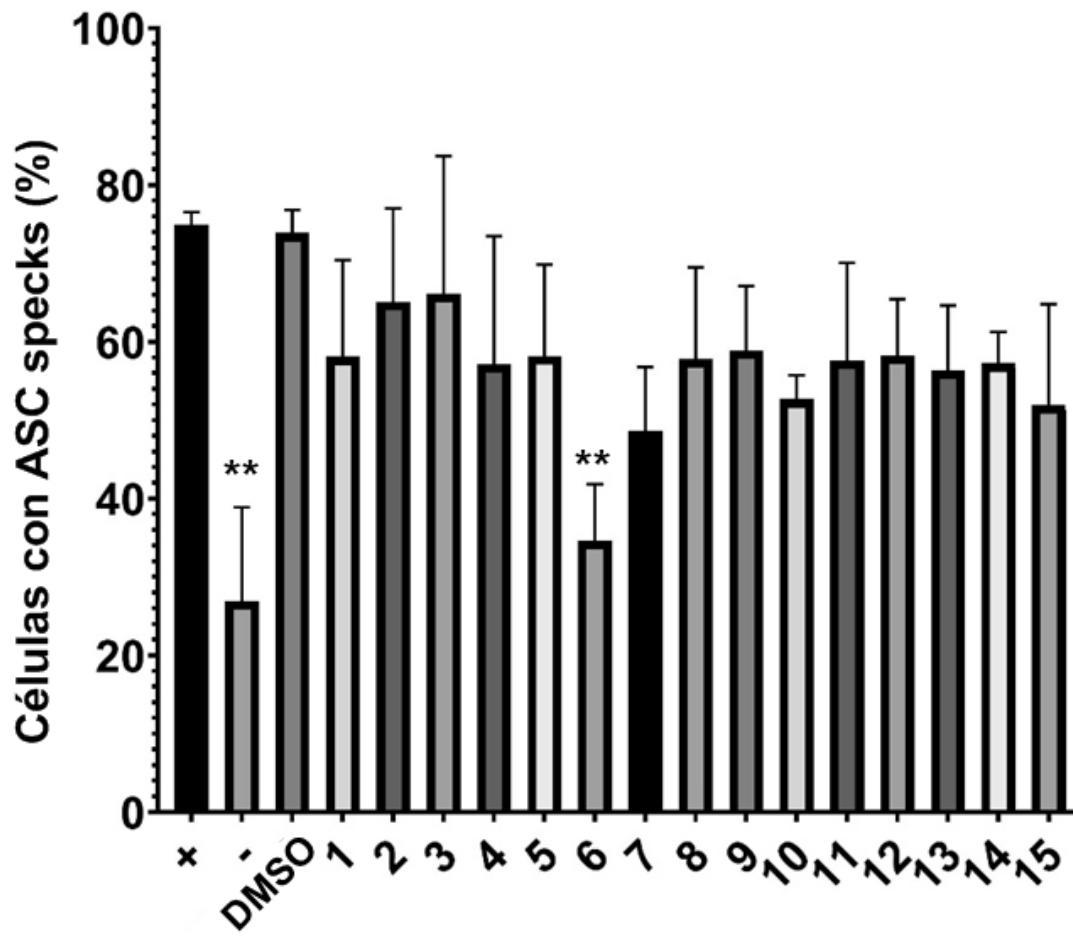
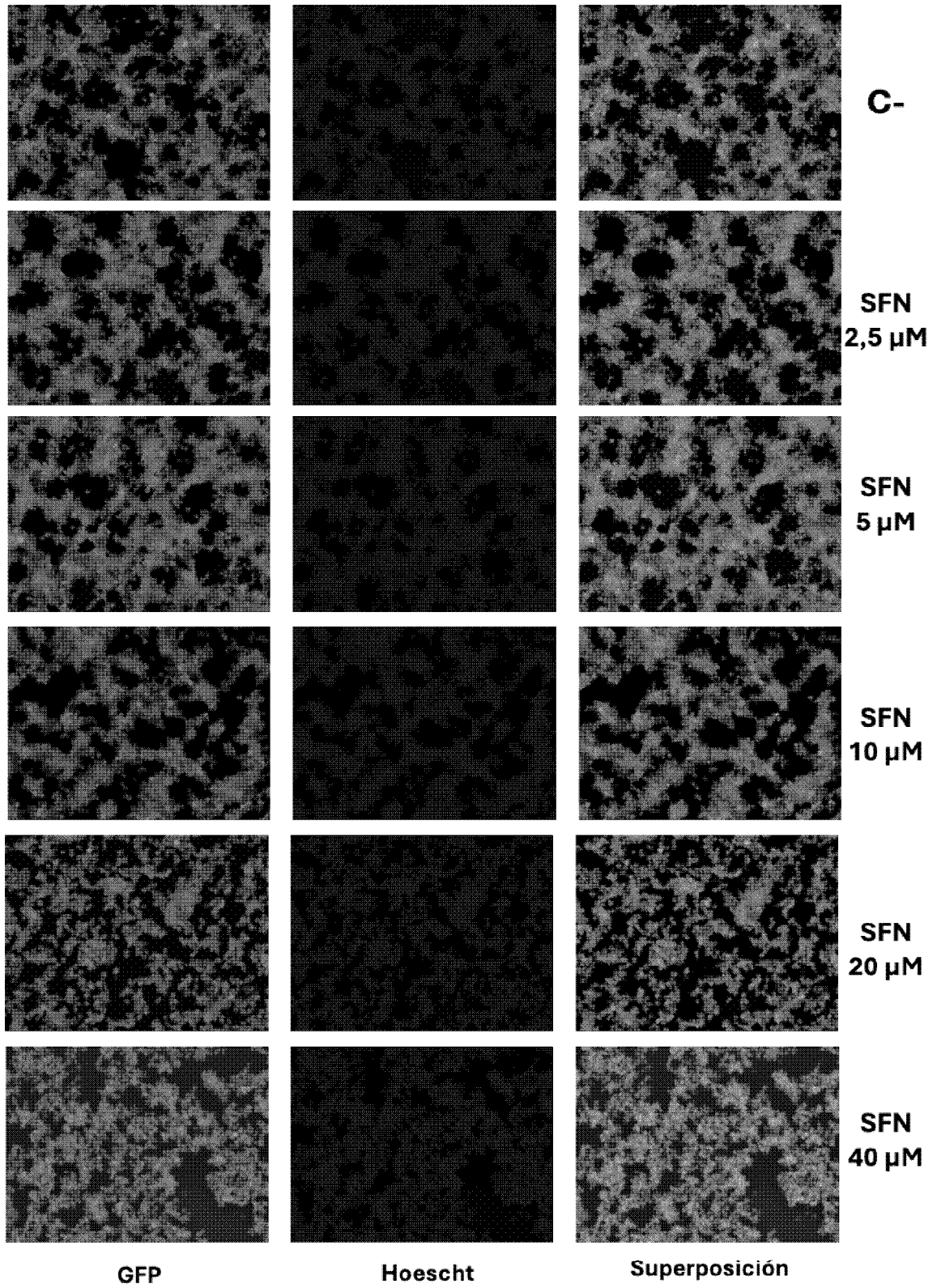
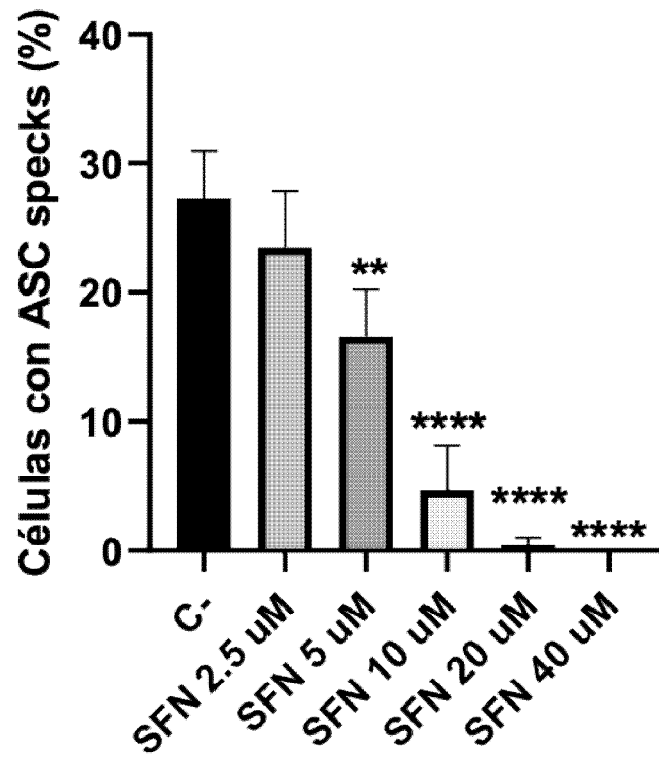


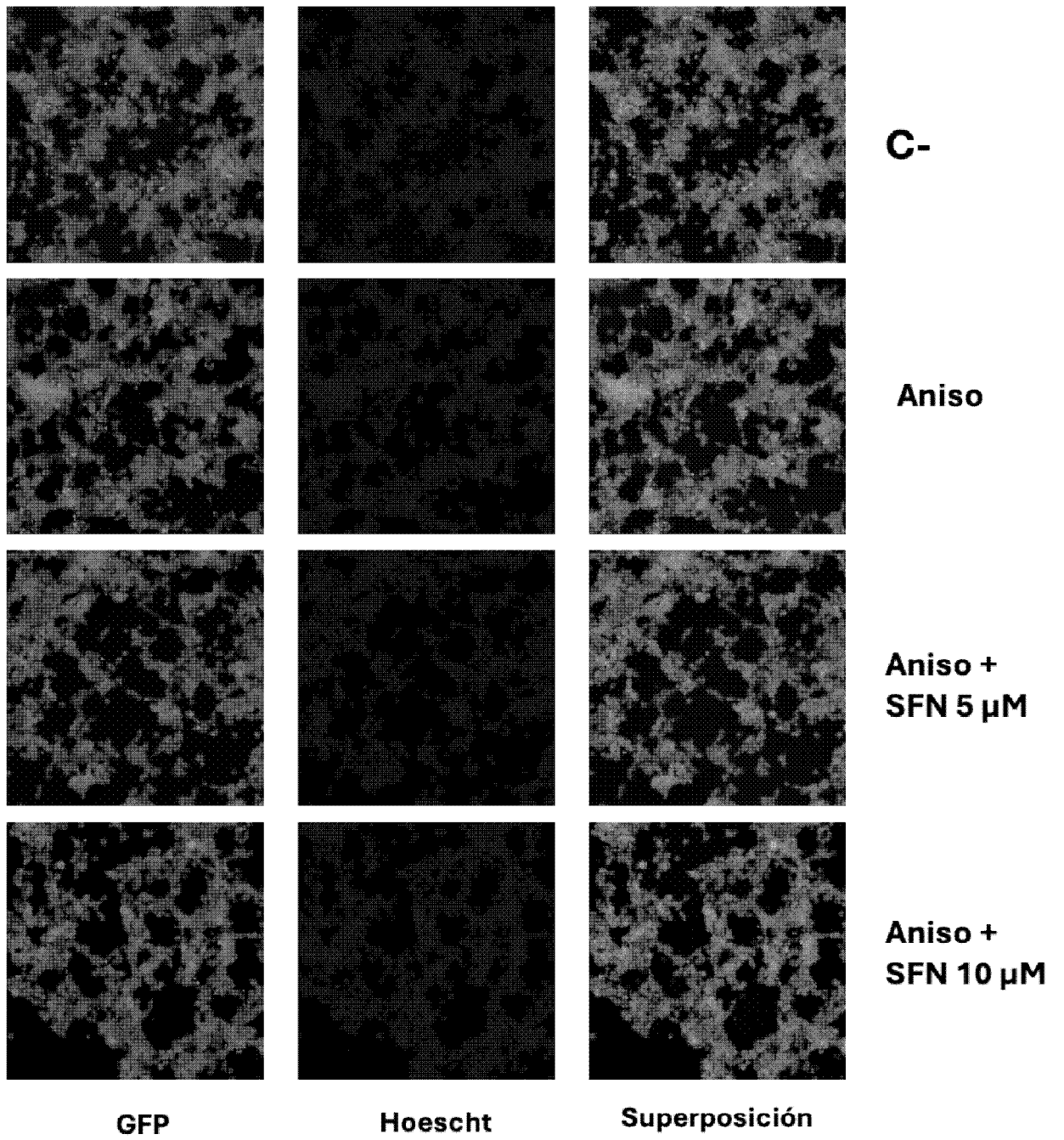
FIG. 1B



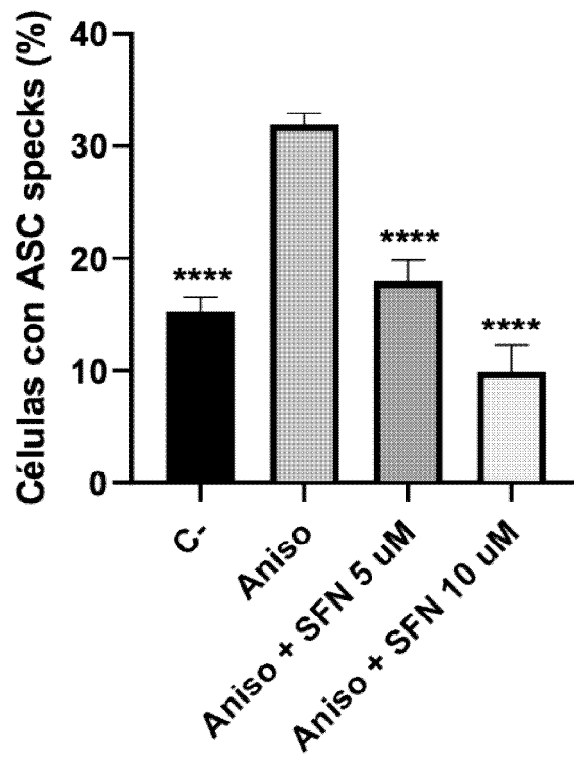
**FIG. 2A**



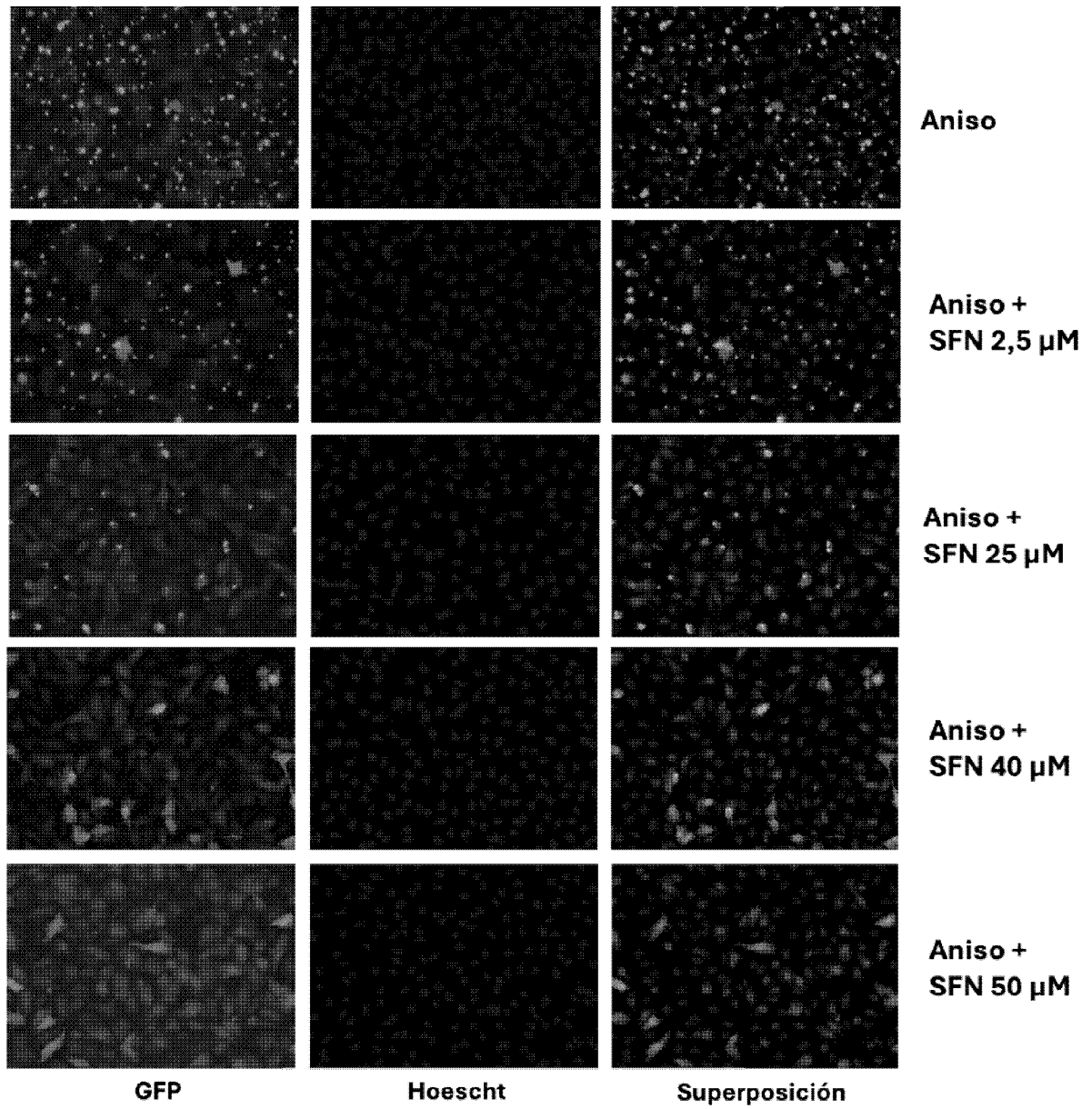
**FIG. 2B**



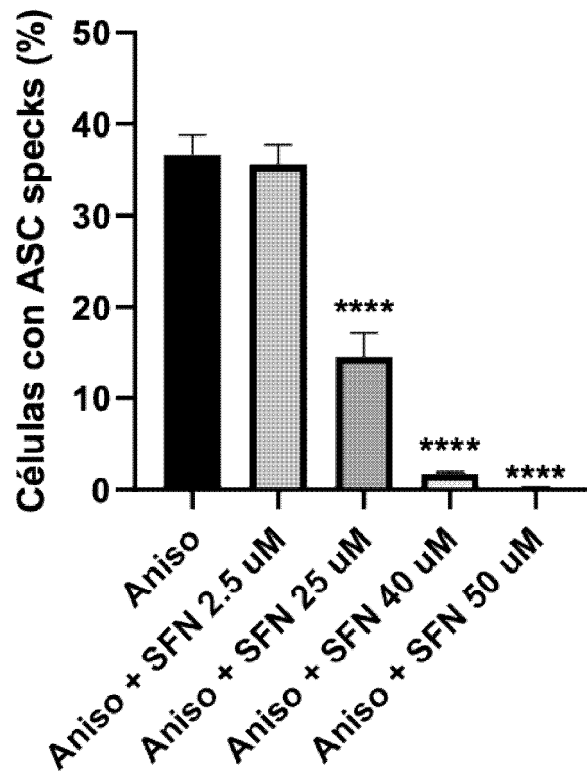
**FIG. 3A**



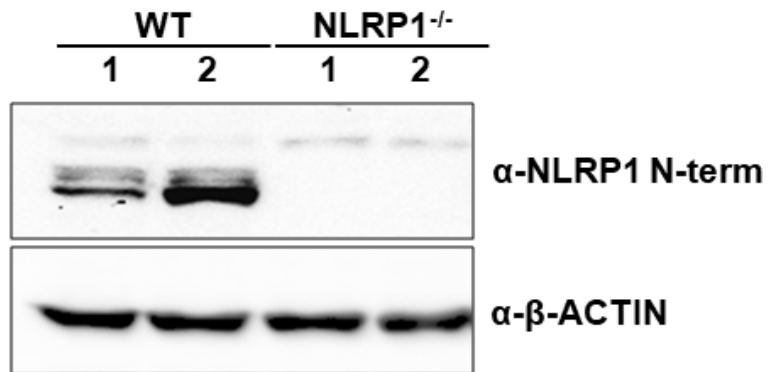
**FIG. 3B**



**FIG. 4A**

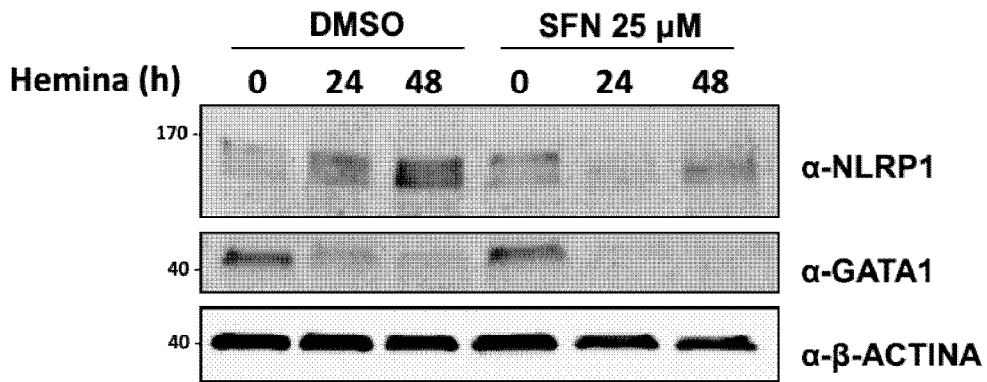


**FIG. 4B**

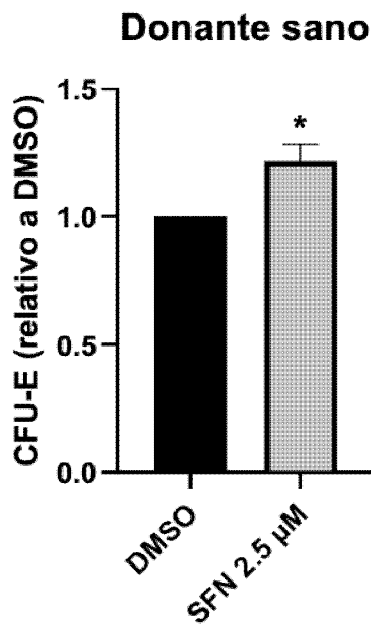


**FIG. 5A**

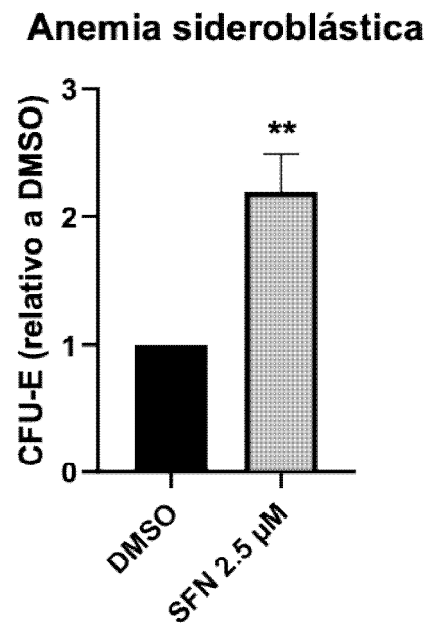




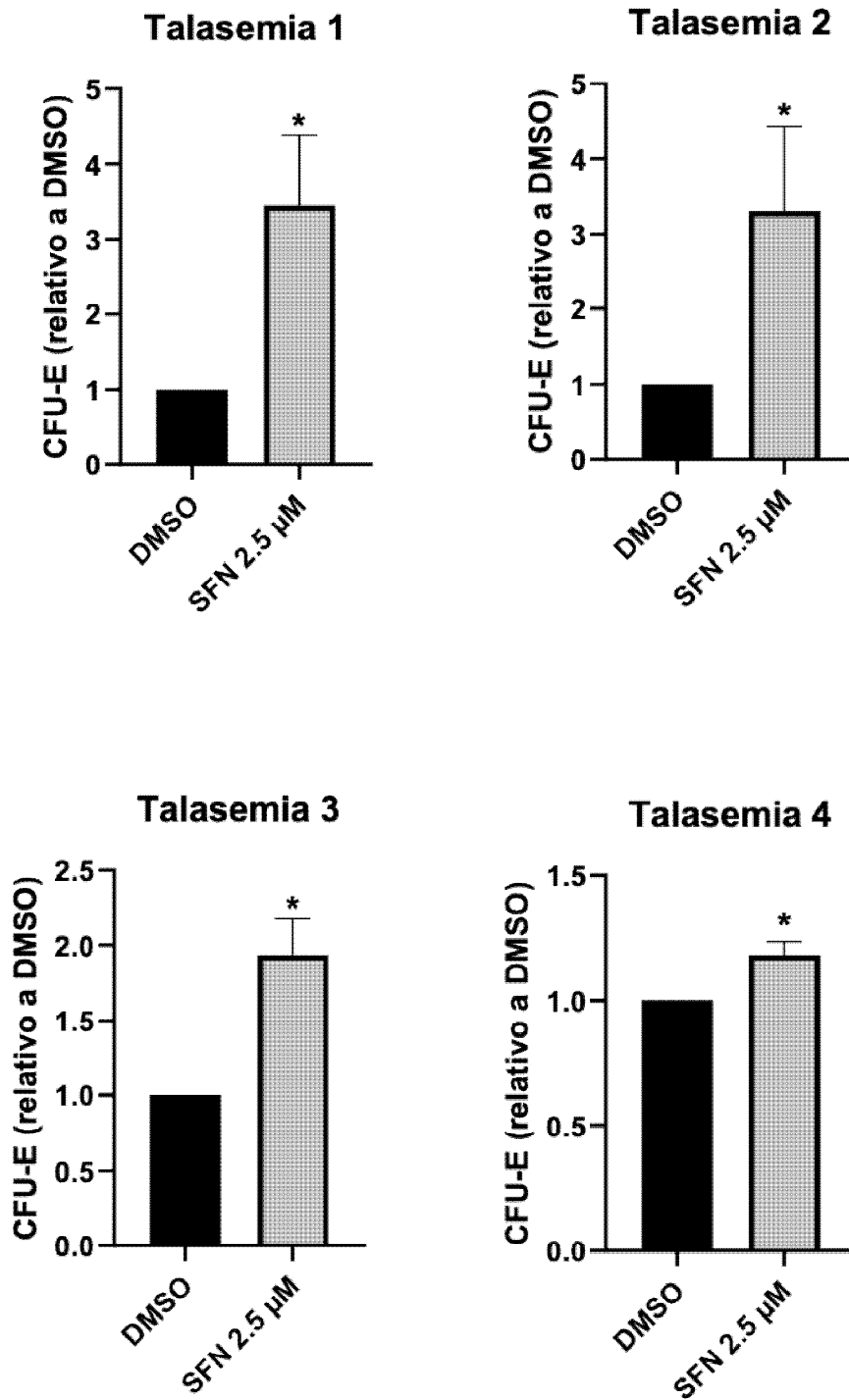
**FIG. 5E**



**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



**FIG. 6C**



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202430991  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 28.11.2024  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **A61K31/26** (2006.01)  
**A61P7/06** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GREANEY, A. J. et al. Sulforaphane inhibits multiple inflammasomes through an Nrf2-independent mechanism. J. Leukoc. Biol, 2016, Vol. 99, Nº 1, Páginas 189-199, <DOI: 10.1189/jlb.3A0415-155RR>, todo el documento	7
Y		4-6
Y	RODRÍGUEZ-RUIZ, L. et al. ZAKα/P38 kinase signaling pathway regulates hematopoiesis by activating the NLRP1 inflammasome. EMBO Mol Med, 11/10/2023, Vol. 15, Nº 10, Páginas e18142, <DOI: 10.15252/emmm.202318142>, todo el documento	4-6
X		7
Y	DOSS, J. F. et al. Phase 1 Study of a Sulforaphane-Containing Broccoli Sprout Homogenate for Sickle Cell Disease. PLoS One, 12/04/2016, Vol. 11, Nº 4, <DOI: 10.1371/journal.pone.0152895>, todo el documento	4-6
Y	YANG, L. et al. The crucial role of NRF2 in erythropoiesis and anemia: Mechanisms and therapeutic opportunities. Archives of Biochemistry and Biophysics, 04/2024, Vol. 754, Nº 109948, ISSN 0003-9861, <DOI: https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.109948>, todo el documento	4-6
A	SANCHEZ-VILLALOBOS, M. et al. New Insights Into Pathophysiology of β-Thalassemia. Frontiers in Medicine, 2022, Vol. 9, Nº 880752, ISSN 2296-858X, <DOI: 10.3389/fmed.2022.880752>, todo el documento	4-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones  para las reivindicaciones nº: 4-7

Fecha de realización del informe  
24.07.2025

Examinador  
M. Cumbreño Galindo

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, INVENES/LATIPAT