

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 975**

21 Número de solicitud: 201831288

51 Int. Cl.:

**C07K 5/107** (2006.01)

**C07K 5/117** (2006.01)

**C07K 5/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**27.12.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.06.2020**

Fecha de concesión:

**27.11.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.12.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (90.0%)  
Avda. Teniente Flomesta 5, Edif. Convalecencia  
30003 Murcia (Murcia) ES;  
FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E  
INVESTIGACIÓN SANITARIAS DE LA REGIÓN DE  
MURCIA (5.0%) y  
BOSTON CHILDREN'S HOSPITAL (5.0%)**

72 Inventor/es:

**MULERO MÉNDEZ, Victoriano Francisco ;  
PÉREZ OLIVA, Ana Belén ;  
GARCÍA MORENO, Diana;  
TYRKALSKA, Sylwia Dominika;  
RODRÍGUEZ RUIZ, Lola;  
CAYUELA FUENTES , María Luisa y  
ZON, Leonard I.**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **INHIBIDORES DE CASPASA 1 PARA EL TRATAMIENTO DE ANEMIA**

57 Resumen:

Inhibidores de caspasa 1 para el tratamiento de anemia.

La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un inhibidor de caspasa-1 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en anemia asociada a enfermedades crónicas, anemia inducida por quimioterapia y anemia de Diamond-Blackfan.

ES 2 769 975 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

**DESCRIPCIÓN**

Inhibidores de caspasa 1 para el tratamiento de anemia

**Campo de la invención**

5

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular al tratamiento de anemia con inhibidores de caspasa-1.

**Antecedentes de la invención**

10

La hematopoyesis es el proceso de formación de glóbulos sanguíneos que se produce durante el desarrollo embrionario y la edad adulta para producir el sistema sanguíneo (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013). En vertebrados, el desarrollo sanguíneo implica dos ondas de hematopoyesis: la primitiva durante desarrollo embrionario temprano, y la definitiva, que se produce en estados más tardíos (Gore *et al.*, 2018). La hematopoyesis definitiva emplea células madre hematopoyéticas multipotentes (HSC), que migran en última instancia a la médula ósea, o médula renal en pez cebra, y dan lugar a todos los linajes sanguíneos (Birbrair y Frenette, 2016; Cumano y Godin, 2007). La maduración de HSC implica la diversificación de los linajes de células linfoides (células T, B y NK) y de células mieloides/eritroides (megacariocitos, eritrocitos, granulocitos y macrófagos) (Kondo, 2010; Kondo *et al.*, 2003; Weissman, 2000). La decisión de los destinos de células eritroides y mieloides depende principalmente de dos factores de la transcripción GATA1 y SPI1 (también conocidos como PU.1) que muestran relación inhibidora cruzada que da como resultado interacción física y competición directa entre ellos por los genes diana (Nerlov *et al.*, 2000; Rekhtman *et al.*, 1999). Sin embargo, existen muchas controversias sobre factores responsables de diferenciación de células eritroides y mieloides terminales y muchas rutas desconocidas que están implicadas probablemente en su regulación (Cantor y Orkin, 2002; Hoppe *et al.*, 2016). Estas rutas no identificadas pueden tener implicaciones clínicas importantes, puesto que el sesgo de linaje hematopoyético está asociado con una incidencia aumentada de enfermedades con componentes inflamatorios prominentes incluyendo aterosclerosis, autoinmunidad, enfermedad neurodegenerativa y carcinogénesis (Elias *et al.*, 2017).

30

Los inflammasomas son parte del sistema inmunitario innato y como receptores y sensores intracelulares regulan la activación de caspasas inflamatorias, concretamente caspasa-1 y caspasa-1 (caspasa-4 y caspasa-5 en seres humanos), que inducen inflamación en respuesta a microbios infecciosos y señales de peligro endógenas (Latz *et al.*, 2013; Martinon *et al.*, 2009). Normalmente, los complejos de multiproteína de inflamasoma contienen proteínas sensoras (receptores de tipo NOD, NLR), proteínas adaptadoras (proteína de tipo mancha relacionada con apoptosis que contiene un CARD, ASC), y caspasas efectoras en una forma de zimógeno, siendo todas capaces de interactuar entre sí mediante interacciones homotípicas (Broz y Monack, 2011; Sharma y Kanneganti, 2016). Recientemente, se ha demostrado que también la familia de proteína GBP forma parte de estos complejos de multiproteína (Pilla *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2018; Tyrkalska *et al.*, 2016; Wallet *et al.*, 2017; Zwack *et al.*, 2017). La oligomerización de pro-caspasas y su maduración autoproteolítica conducen al procesamiento y secreción de las citocinas proinflamatorias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-18, y la inducción de una forma de muerte celular programada denominada piroptosis (Lamkanfi y Dixit, 2014). Últimamente, resultó que los inflammasomas desempeñan papeles cruciales no sólo en infección e inflamación estéril sino también en el mantenimiento de las funciones celulares básicas y el control de la homeostasis celular (Rathinam y Fitzgerald, 2016). Por tanto, se han demostrado funciones reguladoras recientemente descubiertas para los inflammasomas en el metabolismo celular, proliferación, transcripción génica y oncogénesis (Rathinam y Fitzgerald, 2016; Sharma y Kanneganti, 2016). Aunque hasta la fecha se conoce poco sobre el impacto de los inflammasomas en la hematopoyesis en general, se ha demostrado que el factor de la transcripción eritroide maestro GATA1 podía escindirse *in vitro* por muchas caspasas e *in vivo* por caspasa-3 (De Maria *et al.*, 1999).

El pez cebra ha surgido recientemente como un modelo potente y útil para estudiar la hematopoyesis (Berman *et al.*, 2012; Ellett y Lieschke, 2010). Además, los programas genéticos que controlan la hematopoyesis en el pez cebra se conservan con mamíferos, incluyendo seres humanos, haciendo que sean sistemas modelo clínicamente relevantes (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013). En este documento se muestra por primera vez el papel crítico desempeñado por el inflamasoma en la

regulación de la decisión del destino de células eritroides/mieloides y diferenciación eritroide terminal usando modelos de pez cebra, ratón y ser humano. Además, los resultados también tienen implicaciones clínicas importantes, puesto que la inhibición farmacológica del inflammasoma rescata modelos de enfermedad de pez cebra y ratón de inflamación neutrófila y anemia.

### **Breve descripción de las figuras**

10 **Figura 1. La inhibición de inflammasomas disminuye el número de neutrófilos en pez cebra.** Se inyectaron embriones unicelulares de pez cebra *Tg(mpx:eGFP)* con control convencional (Std), Asc o MO de Gbp4 (a, b, g, h), y/o con ARNm antisentido (As), Gbp4WT, Gbp4KS/AA, Gbp4 $\Delta$ CARD, Gbp4DM, Asc o Caspa (e-h). Alternativamente, a los embriones *Tg(mpx:eGFP)* que no se inyectaron se les retiró  
15 manualmente el corion a 24 o 48 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) (c, d, i, j). Cada punto representa el número de neutrófilos de una única larva, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo (a, c, e, g, i). El tamaño de muestra (n) se indica para cada tratamiento. También se muestran imágenes representativas de  
20 canales verdes de larvas completas para los diferentes tratamientos. Barras de escala, 500  $\mu$ m. Se determinó la actividad de caspasa-1 en larvas completas para cada tratamiento a 72 hpf (n=30) (b, d, f, h, j). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

25 **Figura 2. La inhibición de inflammasomas aumenta el número de eritrocitos en pez cebra.** A los embriones de pez cebra *Tg(lcr:eGFP)* se les retiró manualmente el corion a 24 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) durante 48 h (a). Alternativamente, se inyectaron embriones unicelulares *Tg(lcr:eGFP)* con control convencional (Std) o  
30 MO de Asc (b). Cada punto representa el porcentaje de células GFP+ de cada agrupación de 50 larvas, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo. Se muestran diagramas de puntos representativos de canales verdes y azules de morfantes de control (b, e), tratados con inhibidor de caspasa-1 (c) y Asc (f). \*\*\*p<0,001 según la prueba de la t de Student.

**Figura 3. El inflammasoma se requiere intrínsecamente para diferenciación de HSC pero es dispensable para su aparición en pez cebra. (a-h)** A embriones de pez cebra *Tg(runx1:GAL4; UAS:nfsb-mCherry)* se les retiró manualmente el corion a 24 ó 48 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) durante 24 ó 48 h (a-f). Alternativamente, se inyectaron embriones unicelulares *Tg(runx1:GAL4; UAS:nfsb-mCherry)* con control convencional (Std) o MO de Asc (g-h). Cada punto representa el número de HSC de una única larva, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo. El tamaño de muestra (n) se indica para cada tratamiento. También se muestran imágenes representativas de canales rojos de larvas completas para los diferentes tratamientos (a, c, e, g). Barras de escala, 500  $\mu$ m. Se determinó la actividad de caspasa-1 para cada tratamiento de larvas 48 ó 72 hpf (n=30) (b, d, f, h). **(i-l)** Se fijaron larvas *Tg(runx1:gal4; UAS:Gbp4KS/AA)* (i), *Tg(mpx:gal4; UAS:Gbp4KS/AA)* (j), *Tg(runx1:gal4; UAS:Asc $\Delta$ CARD)* (k), *Tg(mpx:gal4; UAS:Asc $\Delta$ CARD)* (l) a 72 hpf y se tiñeron con negro de Sudán para la detección de neutrófilos. Cada punto representa el número de neutrófilos de una única larva, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo. El tamaño de muestra (n) se indica para cada tratamiento. ns, no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 según la prueba de la *t* de Student.

**Figura 4. La actividad de inflammasoma es indispensable para la mielopoyesis en pez cebra.** A larvas de pez cebra *Tg(mpx:GAL4; UAS:nfsb-mCherry)* se les retiró manualmente el corion a 48 hpf y se trataron mediante inmersión con metronidazol (Mtz) durante 24 h y luego con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) durante los 4 días siguientes. Se trataron los grupos de control durante 5 días con Mtz (todo el tiempo). (a) Cada punto representa el número de neutrófilos de una única larva, mientras que la media  $\pm$  EEM para cada grupo también se muestra (n=30). (b) También se muestran imágenes representativas de canales rojos de larvas completas para los diferentes tratamientos y puntos de tiempo. Barras de escala, 500  $\mu$ m. \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 5. La infección no puede sortear el requisito de inflammasoma para la producción de neutrófilos en pez cebra.** (a-h). Se inyectaron embriones unicelulares de pez cebra Tg(mpx:eGFP) con control convencional (Std), Gbp4 o MO de Asc en combinación con ARNm antisentido (As), Gcsfa, Asc, Caspa (c, d, g, h, i, j) o no se inyectaron, se les retiró manualmente el corion a 48 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) (a, b, e, f). Entonces se infectaron las larvas a 48 hpf con *S. typhimurium* (S.I.) en la vesícula ótica (a, b) o el saco vitelino (g, h) y se contó el número de neutrófilos en todo el cuerpo a 24 hpi (a, b) o 72 hpf (c-f) y se determinó la supervivencia durante 5 días tras la infección (g, h). Cada punto representa el número de neutrófilos de una única larva, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo. El tamaño de muestra (n) se indica para cada tratamiento. Se muestran imágenes representativas de canales verdes de larvas completas para los diferentes tratamientos (a-f). Barras de escala, 500  $\mu$ m. Se determinó la actividad de caspasa-1 en larvas completas para cada tratamiento a 72 hpf (n=30) (b, d, f). (i-j). Los niveles de ARNm de spi1b, gata1a, mcsf y gcsf en colas larvianas se midieron mediante RT-qPCR a 24 hpf (i), mientras que los niveles de proteína de Gata1a e histona H3 se determinaron usando inmunotransferencia de tipo Western en colas larvianas a 24 hpf (j). Se realizó un análisis de densitometría para comprobar las diferencias entre tratamientos. ns, no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey (a-f, i, j) o prueba de rango logarítmico con corrección de Bonferroni (g, h).

**Figura 6. La inhibición farmacológica de caspasa-1 en HSC CD34+ humanas promueve la diferenciación eritroide.** Se incubaron células CD34+ con EPO durante 5 días en presencia de DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH, 50  $\mu$ M). Los niveles de ARNm de los genes que codifican para los componentes de inflammasoma CASP1, PYCARD, NLRP3 y NLRC4 (a) y los marcadores de diferenciación GATA1, GYPA, TFRC y SLC4A1 (c) se midieron mediante RT-qPCR, mientras que la actividad de caspasa-1 se determinó usando el sustrato fluorogénico YVAD-AFC (b). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 7. La inhibición farmacológica de caspasa-1 perjudica la diferenciación eritroide de células K562.** Se incubaron células K562 con hemina 50  $\mu$ M durante el tiempo indicado en presencia o ausencia del inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH, 50  $\mu$ M) y se obtuvieron imágenes de los sedimentos celulares (a, e, g), se lisaron y se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-GATA1 y anti-ACTB (a, e, f), procesados para la cuantificación de actividad de caspasa-1 usando el sustrato fluorogénico YVAD-AFC (b, g) y para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-CASP1 y anti-GATA1 (c, d). Se incluyeron extractos celulares de HEK293T transfectadas con GATA1-FLAG y FLAG vacío como controles de movilidad en a. Se muestra una superposición de inmunofluorescencia de caspasa-1 y núcleos teñidos con DAPI de K562 diferenciados durante 48 h con hemina en d. Barras de escala, 5  $\mu$ m. \*\*\* $p$ <0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 8. La inhibición farmacológica de caspasa-1 libera modelos de pez cebra de inflamación neutrófila y anemia.** (a-e) A larvas de tipo natural y mutantes *spint1a* se les retiró manualmente el corion y se trataron desde 1-3 dpf con el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH, 100  $\mu$ M). Se determinaron entonces la actividad de caspasa-1 (a), la razón de expresión génica *spi1b/gata1a* (b), la dispersión de neutrófilos (c) y el número de neutrófilos (d, e). Cada punto representa el número de neutrófilos de una única larva, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo. Se muestran imágenes representativas de canales verdes de larvas completas para los diferentes tratamientos (e). Barra de escala, 500  $\mu$ m. (f-h) Se inyectaron embriones unicelulares de pez cebra con control convencional (Std) o MO de *Gata1a*, se les retiró manualmente el corion a 24 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 reversible Ac-YVAD-CHO (C1INH) durante 24-48 hpf. Entonces se eliminó el inhibidor por lavado y se incubaron las larvas hasta 72 hpf. Imágenes representativas de larvas deficientes en *Gata1a* con anemia leve, moderada y grave (f), cuantificación del fenotipo de larvas tratadas con DMSO o C1INH (g) e inmunotransferencia de extractos larvarios con anticuerpos anti-*Gata1a*, anti-*Spi1b* y anti-*Actb*. (a, b)  $n=4$ ; (c)  $n=35, 35, 27$  y  $22$ . (d)  $n=29, 28, 19$  y  $17$ . (g)  $n=116$  y  $96$ . ns, no significativo; \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001 según ANOVA

seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey (a-d) y prueba exacta de Fisher (g).

**Figura 9. La inhibición farmacológica de caspasa-1 libera de anemia a ratones tratados con 5-FU.** (a) Diseño experimental. Se inyectaron los ratones por vía i.p. con 5-FU en el día 0 y luego con 10 mg/kg del inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) en PBS con DMSO al 10% o vehículo sólo en los días 6, 7, 10 y 12. Se recogió sangre a los -1, 6, 10 y 14 d tras la inyección de 5-FU (fuente en rojo) y se analizó en un analizador de hematología ProCyte Dx. (b-f). Se muestran los recuentos de eritrocitos (b), hemoglobina (c), hematocrito (d), plaquetas (e) y glóbulos blancos (f) como la media  $\pm$  EEM (n=13). \*p<0,05 según ANOVA de 2 factores seguido por prueba múltiple de amplitud de Bonferroni.

**Figura 10. Modelo propuesto que ilustra la regulación de decisión eritroide/mieloide y diferenciación eritroide terminal por el inflammasoma.** (a) En condiciones de homeostasis, la activación del inflammasoma favorece la diferenciación mieloide de CMP promoviendo la escisión de GATA1. Sin embargo, el inflammasoma también se activa durante la diferenciación eritroide terminal para inactivar GATA1. (b) En enfermedades inflamatorias crónicas, la activación de inflammasomas excesiva en CMP da como resultado una degradación desproporcionada de GATA1, que da como resultado sesgo mieloide; es decir, neutrofilia y anemia (ACD). (c) La inhibición farmacológica de caspasa-1 en inflamación crónica restablece una diferenciación mieloide/eritroide normal, reduciendo la neutrofilia y mejorando la anemia. CMP, progenitores mieloides comunes; GMP, progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP, progenitores de megacariocitos-eritrocitos; N, neutrófilos, M, monocitos/macrófagos; E, eritrocitos.

**Figura 11.** La inhibición de inflammasomas disminuyó el número de macrófagos en larvas de pez cebra. Se inyectaron embriones unicelulares de pez cebra Tg(mpeg:eGFP) con control convencional (Std), Asc o MO de Gbp4 (a, b), o con ARNm antisentido (As), Asc o/y Caspa (e-f). Alternativamente, a los embriones Tg(mpeg:eGFP) se les retiró manualmente el corion a 48 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) (c, d). Cada punto representa el número de macrófagos de una única larva,

mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo (a, c, e). El tamaño de muestra (n) se indica para cada tratamiento. También se muestran imágenes representativas de canales verdes de larvas completas para los diferentes tratamientos. Barras de escala, 500  $\mu$ m. Se determinó la actividad de caspasa-1 en larvas completas para cada tratamiento a 72 hpf (n=30) (b, d, f). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 12.** La inhibición de inflamomas disminuye el número de neutrófilos en larvas de pez cebra. Se inyectaron embriones unicelulares de pez cebra Tg(lyz:dsRED) con control convencional (Std), Asc o MO de Gbp4 (a, b). Alternativamente, a larvas Tg(lyz:dsRED) se les retiró manualmente el corion a 48 hpf y se trataron mediante inmersión con DMSO o el inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (C1INH) (c, d). Cada punto representa el número de neutrófilos de una única larva, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo. El tamaño de muestra (n) se indica para cada tratamiento. También se muestran imágenes representativas de canales rojos de larvas completas para los diferentes tratamientos (a, b). Barras de escala, 500  $\mu$ m. Se determinó la actividad de caspasa-1 en larvas completas para cada tratamiento a 72 hpf (n=30). (b, d). \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 13.** La actividad de inflamomas regula los niveles de expresión de gata1 en larvas de pez cebra. Se inyectaron embriones unicelulares de pez cebra Casper con control convencional (Std), Asc o MO de Gbp4. En los tiempos indicados, se realizó hibridación *in situ* de montaje completo (WISH) usando sondas antisentido a los genes gata1a, spi1b, gcsfr, cmyb, runx1 y rag1. Los números en los dibujos representan los animales con el fenotipo mostrado por animales analizados totales. Barra de escala: 500  $\mu$ m.

**Figura 14.** La expresión de genes que codifican para componentes de inflamoma claves están estrechamente regulados en células progenitoras y hematopoyéticas humanas. Niveles relativos de expresión de GATA1, CASP1, PYCARD, NLRP3, NLRP1, GBP5, e IL1B en células madre hematopoyéticas humanas (HSC), progenitor multipotente cebado linfoide (LMPP), progenitores mieloides comunes

(CMP), progenitores megacariocíticos-eritroides (MEP) y progenitores granulocíticos-monocíticos (GMP) según los datos GSE63270 expuestos de la base de datos GEO. Cada punto representa la expresión génica de un donante, mientras que también se muestra la media  $\pm$  EEM para cada grupo (n=7). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 15.** La expresión de genes que codifican para componentes de inflammasoma está regulada durante la diferenciación eritroide de células K562. Se incubaron células K562 con hemina durante 48 h y luego se determinaron los niveles de ARNm de los genes NLRC4, NLRP3, PYCARD y CASP1 mediante RT-qPCR (n=3). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 según ANOVA seguido por prueba múltiple de amplitud de Tukey.

**Figura 16.** La caspasa-1 escinde GATA1 humana *in vitro* en residuo D300. (a) Esquema de GATA1 humana que muestra los dominios de dedos de zinc y residuos D276 y D300. (b-d) Se transfectaron células HEK293T con plásmidos de expresión FLAG-vacío o FLAG-GATA1 (b, c) y vacío-FLAG, GATA1-FLAG de tipo natural (WT), GATA1-FLAG(D276A), GATA1-FLAG(D300A) o GATA1-FLAG(D276A/D300A) (DM) (d). Veinticuatro horas después de la transfección, se sacó GATA1 de los extractos celulares con gel de afinidad M2 anti-FLAG y se trató o no durante 2 h a 37°C con 10 UI de caspasa-1 recombinante humana. Se resolvieron GATA1 de longitud completa y los fragmentos proteolíticos generados en SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anti-FLAG para visualizar anti-GATA1 de longitud completa y N-terminal (b, d) y (C-terminal).

25

## **Descripción detallada de la invención**

### **Definiciones**

Para facilitar la revisión de los diversos ejemplos de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

El término “acilo” se refiere al grupo de fórmula RC(O)— en la que R es un grupo orgánico.

“Administración de” y “administrar un” compuesto debe entenderse que significa proporcionar un compuesto, un profármaco de un compuesto, o una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento. El compuesto o la composición pueden administrarse por otra persona al sujeto (por ejemplo, por vía intravenosa) o puede autoadministrarse por el sujeto (por ejemplo, comprimidos).

El término “alcoxilo” se refiere a un grupo de fórmula —OR, en la que R es un grupo orgánico tal como un grupo alquilo, opcionalmente sustituido con un grupo alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado o heterocicloalquilo. Los grupos alcoxilo adecuados incluyen metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, i-propoxilo, n-butoxilo, i-butoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxiciclopropoxilo, ciclohexiloxilo, y similares.

El término “alquilo” se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Un grupo “alquilo inferior” es un hidrocarburo ramificado o no ramificado saturado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser alquilos sustituidos en los que uno o más átomos de hidrógeno se sustituyen con un sustituyente tal como halógeno, cicloalquilo, alcoxilo, amino, hidroxilo, arilo o carboxilo.

El término “alquilamino” se refiere a grupos alquilo tal como se definió anteriormente en los que al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza con un grupo amino.

El término “alquenilo” se refiere a un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono y fórmula estructural que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono.

El término “alquinilo” se refiere a un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono y una fórmula estructural que contiene al menos un enlace triple carbono-carbono.

El término “alifático” se define como que incluye grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo halogenado y cicloalquilo tal como se describió anteriormente. Un grupo “alifático inferior” es un grupo alifático ramificado o no ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono.

El término “amina” o “amino” se refiere a un grupo de fórmula  $\text{—NRR}'$ , en la que R y R' pueden ser, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado o heterocicloalquilo descrito en el presente documento.

- 5 El término “grupo amida” o “grupo amido” se representa por la fórmula  $\text{—C(O)NRR}'$ , en la que R y R' pueden ser independientemente un grupo hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado o heterocicloalquilo descrito en el presente documento.

10 Un “animal” se refiere a organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. De manera similar, el término “sujeto” incluye tanto sujetos humanos como no humanos, incluyendo aves y mamíferos no humanos, tales como primates no humanos, animales de compañía (tales como perros y gatos), ganado (tal como cerdos, ovejas, vacas), así como animales no domesticados, tales como los grandes felinos. El término sujeto se aplica independientemente de la fase en el ciclo de vida del organismo. Por tanto, el término sujeto se aplica a un organismo en el útero o *en ovo*, según el organismo (es decir, ya sea el organismo un mamífero o un ave, tal como un ave de corral domesticada o salvaje).

20 El término “arilo” se refiere a cualquier grupo aromático a base de carbono que incluye, pero no se limita a, benceno, naftaleno, etc. El término “aromático” también incluye “grupo heteroarilo”, que se define como un grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Los ejemplos de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, oxígeno, azufre, y fósforo. El grupo arilo puede sustituirse opcionalmente con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alquinilo, alquenilo, arilo, haluro, nitro, amino, éster, cetona, aldehído, hidroxilo, ácido carboxílico, o alcoxilo, o el grupo arilo puede ser no sustituido.

30 “Carbonilo” se refiere a un radical de fórmula  $\text{—C(O)—}$ . Los grupos que contienen carbonilo incluyen cualquier sustituyente que contiene un doble enlace carbono-oxígeno ( $\text{C=O}$ ), que incluye grupos acilo, amidas, grupos carboxilo, ésteres, ureas,

carbamatos, carbonatos y cetonas y aldehídos, tales como sustituyentes basados en —COR o —RCHO en donde R es un alquilo, heteroalquilo, hidroxilo alifático, heteroalifático, o una amina secundaria, terciaria o cuaternaria.

5 Un “resto carboxilo” se refiere a cualquier resto o grupo que incluye —C(O)O—. Los restos carboxilo ilustrativos incluyen ácido carboxílico (—C(O)OH); un éster de carboxilato (—C(O)OR) en donde R es un grupo alifático o heteroalifático); una sal de carboxilato (—C(O)OM) en donde M es un catión tal como Li, Na o K.

10 El término “coadministración” o “que se coadministra” se refiere a la administración del compuesto dado a conocer en el presente documento con al menos otro agente terapéutico dentro del mismo periodo de tiempo general, y no requiere administración en el mismo momento de tiempo (aunque coadministración incluye administrar en el mismo momento de tiempo). Por tanto, la coadministración puede ser en el mismo día o en días diferentes, o en la misma semana o en diferentes semanas.

15 Un “enlace covalente” se refiere a un enlace interatómico entre dos átomos, caracterizado por compartir uno o más pares de electrones por los átomos. Los términos “unido de manera covalente” o “vinculado de manera covalente” se refieren a convertir dos moléculas diferenciadas en una molécula contigua.

20 El término “cicloalquilo” se refiere a un anillo a base de carbono no aromático que se compone de al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares. El término “grupo heterocicloalquilo” es un grupo cicloalquilo tal como se definió anteriormente en el que al menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye con un heteroátomo tal como, pero sin limitarse a, nitrógeno, oxígeno, 25 azufre o fósforo.

Los términos “alquilo halogenado” o “grupo haloalquilo” se refieren a un grupo alquilo tal como se definió anteriormente con uno o más átomos de hidrógeno presentes en estos grupos sustituidos con un halógeno (F, Cl, Br, I).

30 El término “heteroarilo” se refiere a un sistema de anillo o radical, mono o policíclico (por ejemplo, bi o tricíclico, o más), condensado o no condensado que tiene al

menos un anillo aromático, que tiene desde cinco hasta diez átomos de anillo de los cuales un átomo de anillo se selecciona de S, O y N; cero, uno o dos átomos de anillo son heteroátomos adicionales independientemente seleccionados de S, O y N; y los átomos de anillo restantes son carbono. Un heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo, y similares.

El término “heteroaralquilo” se refiere a un residuo de alquilo unido a un anillo de heteroarilo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, piridinilmetilo, pirimidiniletilo y similares.

El término “heterocicloalquilo” se refiere un anillo de 3, 4, 5, 6 ó 7 miembros no aromático o un sistema condensado o no condensado de grupo bi o tricíclico, en donde (i) cada anillo contiene entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente de oxígeno, azufre y nitrógeno, (ii) cada anillo de 5 miembros tiene de 0 a 1 dobles enlaces y cada anillo de 6 miembros tiene de 0 a 2 dobles enlaces, (iii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente, (iv) el heteroátomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente, y (v) cualquiera de los anillos anteriores pueden condensarse con un anillo de benceno. Los grupos heterocicloalquilo representativos incluyen, pero no se limitan a, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo y tetrahidrofurilo.

El término “hidroxilo” se representa por la fórmula —OH.

El término “hidroxialquilo” se refiere a un grupo alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno sustituido con un grupo hidroxilo. El término “grupo alcoxialquilo” se define como un grupo alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno sustituido con un grupo alcoxilo descrito anteriormente.

“Inhibir” se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad o estado. “Inhibir” también se refiere a cualquier reducción cuantitativa o cualitativa en unión o actividad biológica, en relación con un control.

Un “mimético” se refiere a una entidad química que contiene elementos estructurales que pueden imitar la acción bioquímica o biológica de otra entidad química. Por ejemplo, en un peptidomimético la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de tal peptidomimético imita la disposición tridimensional de la estructura principal peptídica y cadenas laterales de aminoácidos componentes de otro péptido dando como resultado un agente que es específico y/o selectivo para la inhibición de caspasa diana.

Un “péptido” se refiere a residuos de aminoácido que se unen juntos a través de enlaces de amida. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, puede usarse o bien el isómero óptico L o bien el isómero óptico D. El término “péptido” se pretende específicamente que cubra aminoácidos que se producen de manera natural, así como aquellos que se producen de manera recombinante o sintética. El término “residuo” o “residuo de aminoácido” incluye la referencia a un aminoácido natural, recombinante o sintético que puede incorporarse en una proteína, polipéptido o péptido. Los péptidos pueden modificarse por una variedad de técnicas químicas para producir peptidomiméticos que tienen esencialmente la misma actividad que los péptidos no modificados, y que tienen opcionalmente otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse grupos ácido carboxílico del péptido, ya sean de cadena lateral o de extremo carboxilo, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificarse para formar un éster  $C_1-C_{16}$ , o convertirse en una amida de fórmula  $NR_1R_2$  en la que  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente H o alquilo  $C_1-C_{16}$ , o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 ó 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sean de cadena lateral o de extremo amino, pueden estar en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, tal como las sales de ácido HCl, ácido HBr, ácido acético, ácido benzoico, ácido toluenosulfónico, ácido maleico, ácido tartárico y otras sales orgánicas, o pueden modificarse a dialquilamino o alquilo  $C_1-C_{16}$  o convertirse adicionalmente en una amida. Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales peptídicas pueden convertirse en alcoxilo  $C_1-C_{16}$  o en un éster  $C_1-C_{16}$  usando técnicas bien reconocidas. Los anillos de fenilo y fenólicos de las cadenas laterales peptídicas pueden sustituirse con uno o más átomos de halógeno, tales como flúor, cloro, bromo o yodo, o con alquilo  $C_1-C_{16}$ , alcoxilo  $C_1-C_{16}$ , ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de tales ácidos carboxílicos. Los

grupos metileno de las cadenas laterales peptídicas pueden prolongarse a alquilenos C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida. Otras modificaciones peptídicas incluyen adición y/o deleción y/o sustitución de uno o más  
5 residuos de aminoácido en la cadena peptídica, y/o reemplazo de uno o más de los enlaces amida por un enlace no amida, y/o reemplazo de una o más cadenas laterales de aminoácidos por un resto químico diferente, y/o protección del extremo N-terminal, el extremo C-terminal, o una o más de las cadenas laterales por un grupo protector, y/o introducción de dobles enlaces y/o ciclación y/o  
10 estereoespecificidad en la cadena de aminoácidos para aumentar la rigidez, y/o afinidad de unión y/o potenciar la resistencia a la degradación enzimática de los péptidos.

Un “polipéptido” es un polímero en el que los monómeros son residuos de aminoácido que se unen juntos a través de enlaces de amida.

15 El término “sal o éster farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales o ésteres preparados mediante medios convencionales que incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluyen pero sin limitarse a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido  
20 cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico y similares. Las “sales farmacéuticamente aceptables” de los compuestos dados a conocer por la presente también incluyen aquellos formados a partir de cationes tales como sodio, potasio, aluminio, calcio, litio, magnesio, zinc, y de bases tales como amoníaco,  
25 etilendiamina, N-metil-glutamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)aminometano e hidróxido de tetrabutylamonio. Estas sales pueden prepararse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, haciendo reaccionar el ácido libre con una base  
30 orgánica o inorgánica adecuada. Cualquier compuesto químico indicado en esta memoria descriptiva puede administrarse alternativamente como una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las “sales farmacéuticamente aceptables” también incluyen las formas de ácido libre, base y zwitteriónicas. Pueden

encontrarse descripciones de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas en *Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use*, Wiley VCH (2002). Cuando los compuestos dados a conocer en el presente documento incluyen una función ácida tal como un grupo carboxilo, entonces se conocen bien por los expertos en la técnica pares de cationes farmacéuticamente aceptables adecuados para el grupo carboxilo e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, de amonio cuaternario y similares. Tales sales las conocen los expertos en la técnica. Para ejemplos adicionales de “sales farmacológicamente aceptables”, véase Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 66:1 (1977). Los “ésteres farmacéuticamente aceptables” incluyen aquellos derivados de compuestos descritos en el presente documento que se modifican para incluir un grupo hidroxilo o carboxilo. Un éster hidrolizable *in vivo* es un éster, que se hidroliza en el cuerpo humano o animal para producir el ácido o alcohol original. Los ésteres farmacéuticamente aceptables adecuados para carboxilo incluyen ésteres de alcoximetilo C<sub>1-6</sub> por ejemplo metoxi-metilo, ésteres de alcanoiloximetilo C<sub>1-6</sub> por ejemplo pivaloiloximetilo, ésteres de ftalidilo, ésteres de alquilo C<sub>1-6</sub> cicloalcoxicarboniloxilo C<sub>3-8</sub> por ejemplo 1-ciclohexilcarbonil-oxietilo; ésteres de 1,3-dioxolen-2-onilmetilo por ejemplo 5-metil-1,3-dioxolen-2-onilmetilo; y ésteres de alcoxicarboniloxietilo C<sub>1-6</sub> por ejemplo 1-metoxicarbonil-oxietilo que pueden formarse en cualquier grupo carboxilo en los compuestos.

Un éster hidrolizable *in vivo* que contiene un grupo hidroxilo incluye ésteres inorgánicos tales como ésteres de fosfato y  $\alpha$ -aciloxialquil éteres y compuestos relacionados que como resultado de la hidrólisis *in vivo* de la descomposición del éster dan el grupo hidroxilo original. Los ejemplos de  $\alpha$ -aciloxialquil éteres incluyen acetoxi-metoxilo y 2,2-dimetilpropioniloxi-metoxilo. Una selección de grupos formadores de éster hidrolizable *in vivo* para hidroxilo incluyen alcanolilo, benzoílo, fenilacetilo y benzoílo y fenilacetilo sustituidos, alcoxicarbonilo (para dar ésteres de carbonato de alquilo), dialquilcarbamoílo y N-(dialquilaminoetil)-N-alquilcarbamoílo (para dar carbamatos), dialquilaminoacetilo y carboxiacetilo. Los ejemplos de sustituyentes en benzoílo incluyen morfolino y piperazina unidos desde un átomo de nitrógeno de anillo por medio de un grupo metileno hasta la posición 3 ó 4 del anillo de benzoílo.

Para uso terapéutico, sales de los compuestos son aquellas en las que el contraíón es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, también pueden usarse sales de ácidos y bases que son no aceptables farmacéuticamente, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

5 Las sales de adición de ácido y base farmacéuticamente aceptables tal como se mencionó anteriormente en el presente documento se pretende que comprendan las formas de sal de adición de ácido y base no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos pueden formar. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse de manera conveniente tratando la forma de base con  
10 tal ácido apropiado. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidroácidos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es  
15 decir, ácido hidroxibutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y similares. En cambio, dichas formas de sal pueden convertirse mediante tratamiento con una base apropiada para dar la forma de base libre.

Los compuestos que contienen un protón ácido también pueden convertirse en sus  
20 formas de sal de adición de amina o metálicas no tóxicas mediante tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas. Las formas de sal de base apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, por ejemplo, las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo las sales de benzatina, N-metil-D-  
25 glucamina, hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término “sal de adición” tal como se usó anteriormente en el presente documento también comprende los solvatos que los compuestos descritos en el presente documento pueden formar. Tales solvatos son, por ejemplo hidratos, alcoholatos y  
30 similares.

El término “amina cuaternaria” tal como se usó antes en el presente documento define las sales de amonio cuaternario que los compuestos pueden formar mediante reacción entre un nitrógeno básico de un compuesto y un agente de cuaternización apropiado, tal como, por ejemplo, un alquilhaluro, arilhaluro o arilalquilhaluro  
5 opcionalmente sustituido, por ejemplo metilyoduro o bencilyoduro. También pueden usarse otros reactivos con buenos grupos salientes, tales como trifluorometanosulfonatos de alquilo, metanosulfonatos de alquilo y p-toluenosulfonatos de alquilo. Una amina cuaternaria tiene un nitrógeno cargado positivamente. Los contraiones farmacéuticamente aceptables incluyen cloro, bromo,  
10 yodo, trifluoroacetato y acetato. El contraión de elección puede introducirse usando resinas de intercambio iónico.

Se apreciará que los compuestos descritos en el presente documento pueden tener propiedades formadoras de complejos, quelantes, de unión a metales y, por tanto, pueden existir como complejos metálicos o quelatos metálicos.

15 El término “profármaco” también se pretende que incluya cualquier portador unido de manera covalente que libera un compuesto dado a conocer o un compuesto original del mismo *in vivo* cuando el profármaco se administra a un sujeto. Dado que los profármacos tienen a menudo propiedades potenciadas relativas al agente farmacéutico activo, tales como, solubilidad y biodisponibilidad, los compuestos  
20 dados a conocer en el presente documento pueden administrarse en forma de profármaco. Por tanto, también se contemplan profármacos de los compuestos dados a conocer por la presente, métodos de administración de profármacos y composiciones que contienen tales profármacos. Los profármacos de los compuestos dados a conocer se preparan normalmente modificando uno o más  
25 grupos funcionales presentes en el compuesto de manera tal que las modificaciones se escinden, o bien en manipulación de rutina o bien *in vivo*, para dar el compuesto original. En particular, se contemplan específicamente profármacos de éster en el presente documento. De manera similar, los profármacos incluyen compuestos que tienen un grupo amino o sulfhidrilo funcionalizado con cualquier grupo que se  
30 escinde para dar el grupo sulfhidrilo libre o amino libre correspondiente. Los ejemplos de profármacos incluyen, sin limitación, compuestos que tienen un grupo hidroxilo, amino y/o sulfhidrilo acilado con un grupo acetato, formiato o benzoato.

También se contemplan derivados protegidos de los compuestos dados a conocer. El término “grupo protector” o “grupo de bloqueo” se refiere a cualquier grupo que cuando se une a un grupo funcional evita o reduce la susceptibilidad del grupo a la reacción. “Grupo protector” se refiere generalmente a grupos bien conocidos en la técnica que se usan para evitar que grupos reactivos seleccionados, tales como carboxilo, amino, hidroxilo, mercapto y similares, experimenten reacciones no deseadas, tales como oxidación, reducción, nucleófila, electrófila y similares. Los términos “que desprotege”, “desprotegido” o “desproteger”, tal como se usan en el presente documento, se pretende que se refieran al proceso de retirar un grupo protector de un compuesto.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz de manera diagnóstica” se refiere a una cantidad de un agente especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que está tratándose con ese agente. De manera ideal, una cantidad terapéuticamente eficaz o cantidad eficaz de manera diagnóstica de un agente es una cantidad suficiente para inhibir o tratar la enfermedad sin provocar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz o cantidad eficaz de manera diagnóstica de un agente dependerá del sujeto que está tratándose, la gravedad de la afección y la manera de administración de la composición terapéutica.

“Tratamiento” se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o estado patológico después de que haya comenzado a desarrollarse. Tal como se usa en el presente documento, el término “mejorar”, con referencia a una enfermedad o estado patológico, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede evidenciarse, por ejemplo, por una aparición retardada de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción de la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una mejora de la salud global o bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos para la enfermedad particular. La expresión “tratar una enfermedad” se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad o estado, por ejemplo, en un sujeto que corre el riesgo de padecer una enfermedad tal como cáncer, particularmente un cáncer metastásico. Un tratamiento “profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de

una enfermedad o presenta sólo signos tempranos con el fin de reducir el riesgo de desarrollar una patología.

Los ejemplos particulares de los agentes dados a conocer por la presente incluyen uno o más centros asimétricos; por tanto estos compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. Por consiguiente, pueden proporcionarse compuestos y composiciones como enantiómeros puros individuales o como mezclas estereoisoméricas, incluyendo mezclas racémicas. En determinadas realizaciones, los compuestos dados a conocer en el presente documento se sintetizan en o se purifican para estar en forma sustancialmente enantiopura, tal como en un exceso enantiomérico del 90%, un exceso enantiomérico del 95%, un exceso enantiomérico del 97% o incluso en más de un exceso enantiomérico del 99%, tal como en forma enantiopura.

Algunos de los compuestos descritos en el presente documento también pueden existir en su forma tautomérica.

En el contexto de la presente invención, el término “anemia asociada a enfermedades crónicas” (ADC) se entiende como una forma de anemia observada en infección crónica, activación inmunitaria crónica y cáncer.

En el contexto de la presente invención, el término “anemia inducida por quimioterapia” se entiende como anemia de pacientes con cáncer que reciben quimioterapia. En el contexto de la presente invención, el término “anemia de Diamond-Blackfan” se entiende como un trastorno genético caracterizado por niveles reducidos de la proteína GATA1 debido a una traducción dañada en el ribosoma de ARNm de GATA1.

### **Descripción detallada de la invención**

Tal como se usa en el presente documento, los términos en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se usa en el presente documento, el término “comprende” significa “incluye.” Se entiende además que todos los tamaños de nucleótido o tamaños de aminoácido, y todos los valores de masa molecular o peso

molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

5 Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o pruebas de la presente divulgación, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos sólo y no se pretende que sean limitativos.

10 Se notifica en este documento una ruta de señalización conservada evolutivamente que une por primera vez el inflammasoma con diferenciación de HSC. Durante periodos de estrés hematopoyético inducido por quimioterapia o infección viral, la activación de NLRP1a prolonga la citopenia, hipoplasia de médula ósea e inmunosupresión. De manera interesante, este efecto está mediado por la piroptosis  
15 dependiente de caspasa-1, pero independiente de ASC de células progenitoras hematopoyéticas. Además, se ha encontrado que el inflammasoma NLRP3 conduce expansión clónica y muerte celular piroptótica en síndromes mielodisplásicos (Basiorka *et al.*, 2016). Los resultados demuestran que aunque el inflammasoma es dispensable para la aparición de HSC en pez cebra, regula intrínsecamente a las  
20 células la diferenciación de HSC en condiciones de homeostasis en dos niveles diferentes: decisión del destino de células eritroides/mieloides y diferenciación eritroide terminal (figura 10). Aunque CASP1 puede seleccionar como diana varias proteínas para regular ambos procesos, un posible escenario es la escisión de GATA1 en el residuo D300 por CASP1, que da como resultado la rápida  
25 degradación de GATA1, puesto que no pudo detectarse GATA1 procesada en larvas de pez cebra o células K562. Niveles de GATA1 reducidos tras activación de inflammasoma dan como resultado niveles de SPI1 aumentados que conducen de manera concomitante a eritropoyesis reforzada y mielopoyesis reducida, según se inicia la elección de linaje, o al menos se ejecuta y se refuerza, por estos dos  
30 factores antagonistas cruzados de la transcripción. De manera similar, pero sin la implicación de SPI1, la diferenciación eritroide terminal requiere escisión de GATA1 por CASP1. Por tanto, se observó que la inhibición farmacológica de CASP1 conduce a acumulación de GATA1 y diferenciación eritroide alterada de tanto HSC CD34<sup>+</sup> como células K562 (figura 10), puesto que GATA1 inhibe la diferenciación

eritroide terminal *in vitro*. Aunque sigue quedando elucidar las señales responsables de la activación del inflamasoma en la decisión del destino de células eritroides/mieloides y diferenciación eritroide terminal así como los componentes de inflamasoma implicados, los estudios de genética en pez cebra muestran que Gbp4 y Asc se requieren ambos intrínsecamente *in vivo* por HSC para regular su diferenciación. Se anticipa una leve activación de CASP1 para evitar la muerte celular piroptótica de células hematopoyéticas. Esto puede lograrse mediante el ensamblaje de pequeñas manchas de ASC y/o la baja abundancia de caspasa-1 en células progenitoras hematopoyéticas y precursores eritroides, según se produce en neutrófilos que presentan liberación mantenida de IL-1 $\beta$  sin piroptosis en comparación con macrófagos (Boucher *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2014).

El sesgo de linaje hematopoyético se asocia para aumentar la incidencia de enfermedades con componentes inflamatorios prominentes incluyendo aterosclerosis, autoinmunidad, enfermedad neurodegenerativa y carcinogénesis (Elias *et al.*, 2017). En particular, la dermatosis neutrófila se caracteriza por la acumulación de neutrófilos en la piel y lesiones cutáneas (Marzano *et al.*, 2018). Se observó que la neutrofilia robusta de un modelo de pez cebra de inflamación cutánea se invierte por inhibición farmacológica de Caspa, a pesar de que las lesiones cutáneas e infiltración de neutrófilos están en gran medida sin afectar. Hasta donde se conoce, esta es la primera evidencia que muestra que la activación de inflamasoma altera la granulopoyesis a través de desequilibrio de Spi1/Gata1 y, más importante, que su inhibición farmacológica restablece el equilibrio de Spi1/Gata1 y recuento de neutrófilos (figura 10). Además, el papel crítico del inflamasoma en la regulación del Spi1/Gata1 también se destacó por la capacidad de inhibición farmacológica de Caspa para restablecer los niveles de hemoglobina eritroide y Gata1, y reducir los niveles de Spi1, en un modelo de pez cebra de Gata1 reducida, tal como se produce en la anemia de Diamond-Blackfan (Danilova y Gazda, 2015). De manera similar, la inhibición farmacológica de CASP1 acelera la recuperación de anemia en ratones tratados con 5-FU sin afectar a los recuentos de leucocitos y plaquetas. En conjunto, todos estos resultados señalan hacia la capacidad de inhibición de inflamasomas como un enfoque terapéutico para tratar enfermedades humanas con sesgo de linaje hematopoyético asociado, tales como inflamación neutrófila, anemia asociada a enfermedades crónicas, anemia inducida por

quimioterapia y anemia de Diamond-Blackfan. La disponibilidad de un inhibidor de CASP1 activo por vía oral, VX-765, con elevada especificidad, excelentes propiedades farmacocinéticas y eficacia en modelos de ratón de artritis reumatoide e inflamación cutánea (Wannamaker *et al.*, 2007), respalda además las pruebas  
5 clínicas de inhibidores de CASP1 en trastornos con sesgo de linaje hematopoyético.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende al menos un inhibidor de caspasa-1 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en anemia  
10 asociada a enfermedades crónicas, anemia inducida por quimioterapia y anemia de Diamond-Blackfan.

La presente invención se limita a la anemia mencionada anteriormente y no a otra anemia tal como anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA) o anemia aplásica (AA)  
15 debido a los siguientes motivos. La AHA está provocada por la generación de anticuerpos contra glóbulos rojos que acortaron su vida. Este trastorno puede presentarse como primario (idiopático) o secundario a trastornos autoinmunitarios, tumores malignos o infecciones. La anemia aplásica (AA) se caracteriza por pancitopenia y médula ósea hipocelular provocada por la disminución de células  
20 madre hematopoyéticas. La combinación de varias alteraciones genéticas con baja penetrancia, junto con factores ambientales, contribuye al desarrollo de AA.

Es muy improbable que el tratamiento de pacientes con AHA y AA con inhibidores de caspasa-1 dé como resultado efectos beneficiosos, puesto que tal tratamiento  
25 aunque aumentará los niveles de GATA1 forzando la eritropoyesis, tales glóbulos rojos recién formados se destruirán por autoanticuerpos en AH, y en AA, la deficiencia en células madre hematopoyéticas dará todavía como resultado eritropoyesis dañada a pesar de los niveles aumentados de GATA1.

30 En cambio, el tratamiento de anemia asociada a enfermedades crónicas (ACD) la curará satisfactoriamente mediante la inhibición farmacológica de caspasa-1 como ya se hizo posible a partir de la evidencia experimental proporcionada en los ejemplos, puesto que ACD está asociada a hiperactivación del inflamasoma y caspasa-1. Por tanto, el tratamiento con inhibidores de caspasa-1 restablecerá los

niveles de GATA1. De manera similar, la anemia de Diamond-Blackfan es un trastorno genético caracterizado por niveles reducidos de GATA1 debido a traducción dañada en el ribosoma de ARNm de GATA1. Por tanto, el tratamiento con inhibidores de caspasa-1 restablecerá los niveles de GATA1; esto se demuestra en los ejemplos proporcionados en la presente memoria descriptiva. Finalmente, la anemia inducida por quimioterapia está provocada por el agotamiento transitorio del compartimento de células progenitoras hematopoyéticas y niveles crecientes de GATA1 mediante inhibición de caspasa-1 forzarán la eritropoyesis de la célula progenitora restante y recién formada, lo que conduce a la curación de anemia, tal como se demuestra en los ejemplos proporcionados en la presente memoria descriptiva.

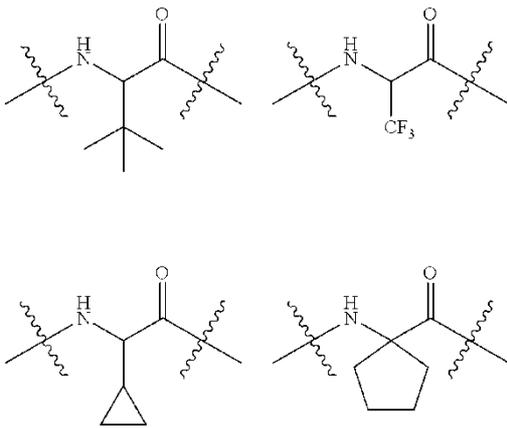
Los inhibidores de caspasa-1 útiles para el método de tratamiento anterior tienen el motivo: X o X—W, en donde X es una estructura selectiva de caspasa-1 en relación con otras cisteína proteasas. La especificidad y/o selectividad de un sustrato para una caspasa puede determinarse mediante ensayos bioquímicos y basados en células en enzimas relacionadas.

En determinadas realizaciones, X tiene una estructura que comprende: Ar-A2-A1-, en donde Ar es un arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido; y A1 y A2 son cada uno individualmente un residuo de aminoácido, o A1 y A2 forman juntos un peptidomimético. La estructura selectiva de caspasa-1 X puede incluir al menos un aminoácido adicional además de A1 y A2. Tal(es) aminoácido(s) adicional(es) puede(n) ser igual(es) o diferente(s) en comparación con los aminoácidos descritos a continuación para A1 y A2. Sin embargo, en determinadas realizaciones X consiste únicamente en A1 y A2. Los aminoácidos para A1 y A2 pueden ser aminoácidos naturales o no naturales (por ejemplo, recombinantes o sintéticos). A1 y A2 pueden ser los mismos aminoácidos o diferentes.

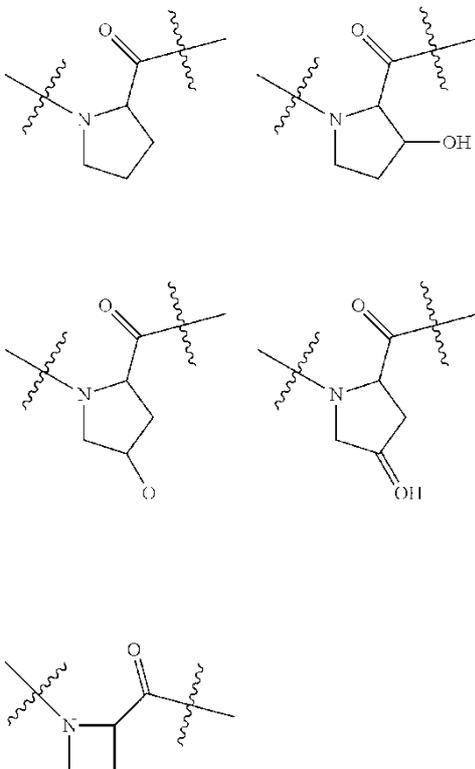
Los aminoácidos ilustrativos para A1 y A2 pueden representarse por —N(R1)—C(R2)(R3)—C(O)— en donde R1 es H; R2 y R3 se seleccionan cada uno individualmente de H, un alquilo opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido, un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un arilo

opcionalmente sustituido, o un heteroarilo opcionalmente sustituido, o R2 y R3 forman juntos una estructura de cicloalquilo; o R1 y R2 forman juntos una estructura azacíclica.

5 Varios aminoácidos específicos para A2 son:

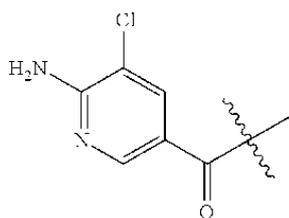
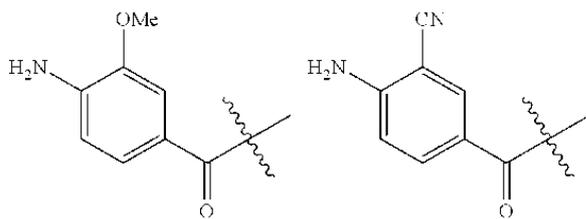
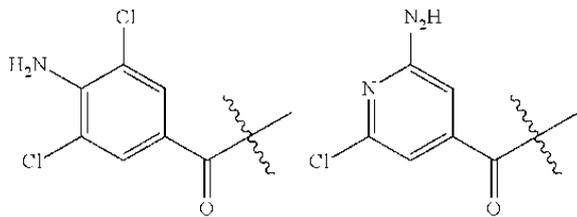
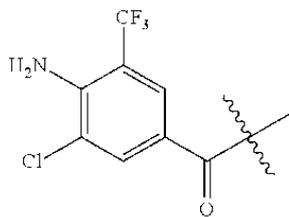
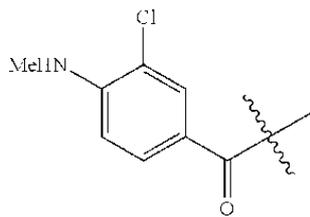
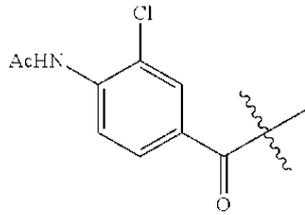
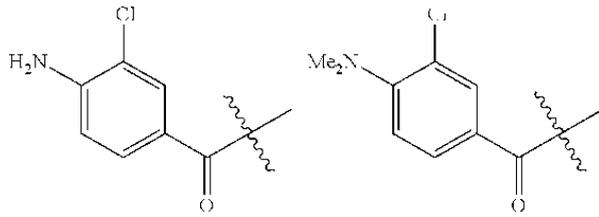


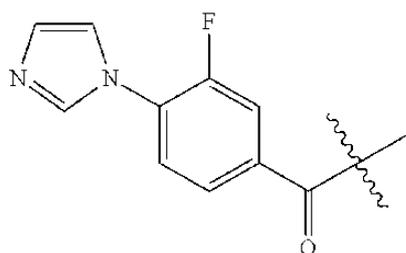
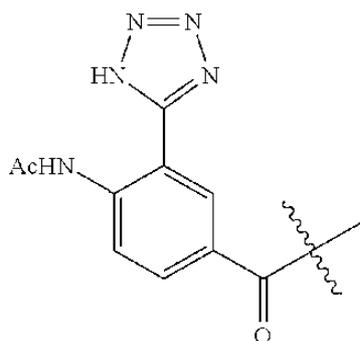
Varios aminoácidos específicos para A<sup>1</sup> son:



10 Ar puede ser un arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. El arilo opcionalmente sustituido puede ser un único anillo de 5, 6 ó 7 miembros tal como fenilo o un anillo condensado tal como naftilo o quinolinilo. El heteroarilo opcionalmente sustituido

- puede incluir un heteroátomo seleccionado de N, O o S. Los grupos heteroarilo ilustrativos incluyen furanilo, piranilo, pirroilo, imidazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, isoindolilo, indoilo, quinolinilo, isotiazolilo e isoxazolilo. Un heteroarilo preferido es pirindilo. Los sustituyentes ilustrativos incluyen halógeno, amino, aminoalquilo (por ejemplo, NMe<sub>2</sub>), aminoacilo (por ejemplo, AcHN), alquilo halogenado, alcoxilo, y tetrazolilo. El grupo Ar puede incluir un radical carbonilo (—C(O)—) que se une a A<sup>2</sup>. En realizaciones seleccionadas, Ar es benzoílo opcionalmente sustituido lo que significa que X tiene la estructura: Ph(opcionalmente sustituido)—C(O)-A<sup>2</sup>-A<sup>1</sup>, en la que Ph es fenilo.
- 5
- 10 Varios ejemplos específicos para Ar son:

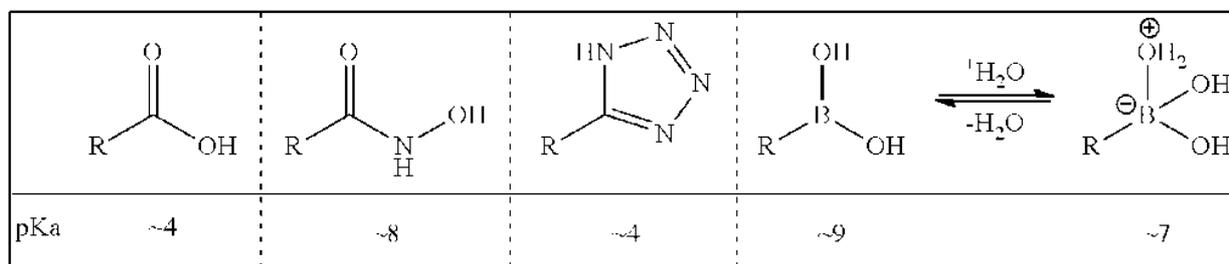




W representa una “ojiva” que comprende  $\text{—NH—CH(Y)(Z)}$ . La ojiva electrófila modifica de manera reversible la caspasa de modo que la caspasa no puede interactuar con ni escindir un sustrato de caspasa. Aunque no se limita por ninguna teoría, se cree que la estructura novedosa de la ojiva dada a conocer en el presente documento permite la unión covalente con un tiol de sitio activo en la caspasa optimizando las interacciones hidrófobas e hidrófilas entre su compuesto inhibidor y la caspasa, unión de hidrógeno intermolecular específica entre el compuesto inhibidor y la caspasa, y alineación adecuada del tiol nucleófilo de la enzima y el modificador covalente en el compuesto inhibidor.

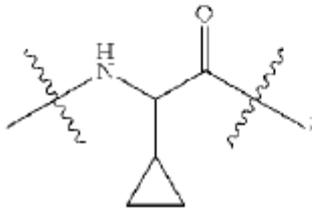
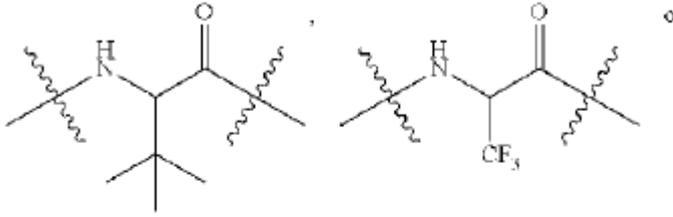
Y es una estructura que permite que el compuesto inhibidor forme un enlace covalente reversible con una caspasa 1. En particular, Y permite la formación de un enlace reversible con un residuo nucleófilo de aminoácido de caspasa 1. Este enlace covalente se considera reversible por el hecho de que el enlace recién formado enzima-inhibidor del tioimidato o tioboronato intermedio puede romperse a través de hidrólisis o inversión simple de la reacción para generar tanto inhibidor libre como enzima libre. Los grupos Y ilustrativos incluyen ciano ( $\text{—CN}$ ), alquilo sustituido por ciano (por ejemplo,  $\text{—CH}_2\text{CN}$ ), ácido borónico ( $\text{—B(OH)}_2$ ), o alquilo sustituido por ácido borónico (por ejemplo,  $\text{—CH}_2\text{B(OH)}_2$ ).

Z es un resto carboxilo o un mimético de ácido carboxílico. Los grupos Z ilustrativos incluyen ciano ( $-\text{CN}$ ), alquilo sustituido por ciano (por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ), ácido borónico ( $-\text{B}(\text{OH})_2$ ), alquilo sustituido por ácido borónico (por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{B}(\text{OH})_2$ ), ácido carboxílico ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ), alquilo sustituido por ácido carboxílico (por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ), éster de carboxilato (por ejemplo,  $-\text{CO}_2(\text{alquilo})$ , o  $-\text{CH}_2\text{CO}_2(\text{alquilo})$ ), tetrazolilo, alquilo sustituido por tetrazolilo (por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{-tetrazóilo}$ ), o un amido (por ejemplo,  $-\text{CONH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}(\text{OH})$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}(\text{OMe})$  o  $-\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CN})$ ). Los miméticos de ácido carboxílico tienen un protón con un pKa en el intervalo de 4 a 9, que está próximo al de ácido carboxílico tal como se muestra a continuación:

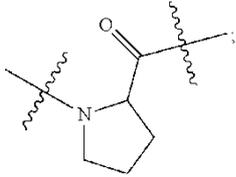


Según determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento,  $\text{A}^2$ ,  $\text{A}^1$  y Ar se seleccionan de las estructuras específicas dadas a conocer anteriormente; Y se selecciona de ciano o ácido borónico; y Z se selecciona de  $-\text{CH}_2\text{B}(\text{OH})_2$  o  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{alquilo inferior}$ .

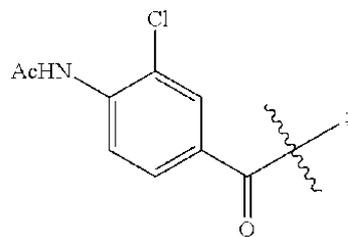
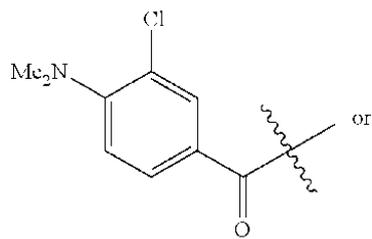
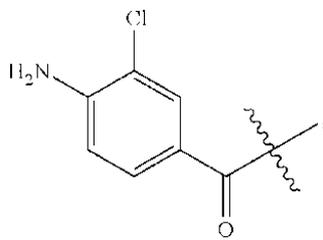
Según determinadas realizaciones dadas a conocer en el presente documento,  $\text{A}^2$  se selecciona de:



A<sup>1</sup> se selecciona de:



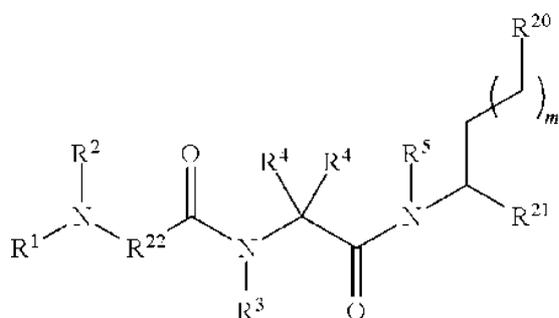
Ar se selecciona de:



Y se selecciona de ciano o ácido borónico; y Z se selecciona de  $-\text{CH}_2\text{B}(\text{OH})_2$  o  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{O}$ -alquilo inferior.

Según determinadas realizaciones dadas conocer en el presente documento, los agentes de inhibición de caspasa 1 incluyen un resto 3-cianopropanilo incorporado en soportes de inhibidor de caspasa 1.

Según realizaciones particulares, los compuestos dados a conocer en el presente documento tienen la estructura de fórmula II:



10

en la que

$R^1$  es H,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^8$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{R}^8$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{H})-\text{R}^8$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{R}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{R}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CHR}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OR}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{N}(\text{H})\text{R}^8$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^8)_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^8)_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^8)_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^8)_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^8)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{R}^8$ ,  $-\text{CH}_2$ -alquenil- $\text{R}^8$ , o  $-\text{CH}_2$ -alquinil- $\text{R}^8$ ;

15

$R^2$  es H y cada  $R^6$  es independientemente  $-\text{H}$ , una cadena lateral de aminoácido, o  $-\text{R}^8$ ; o  $R^2$  y  $R^6$  junto con los átomos a los que se unen, forman un sistema de anillo cíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros;

$R^{22}$  es  $-\text{C}(\text{R}^6)_2-$  o  $-\text{N}(\text{R}^6)-$ ;

20

$R^3$  es H y cada  $R^4$  es independientemente  $-\text{H}$ , una cadena lateral de aminoácido, o  $-\text{R}^8$ ; o  $R^3$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que se unen, forman un sistema de anillo cíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros;

$R^5$  es  $-\text{H}$ ;

$R^{21}$  es  $-\text{CN}$  o  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^9$ ;

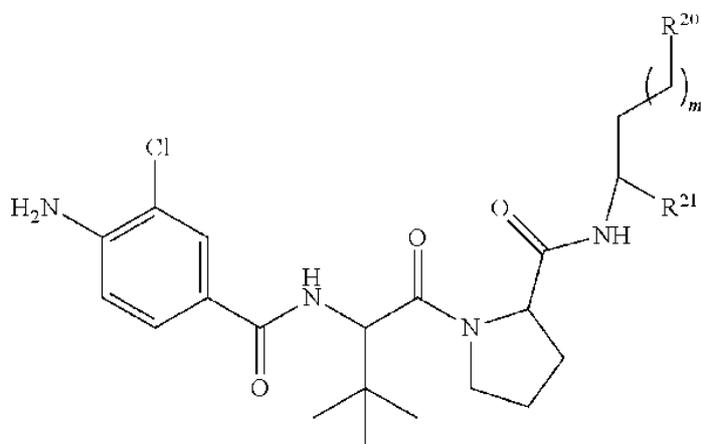
$R^{20}$  es  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^9$ , o un heteroarilo;

$R^9$  es  $-\text{H}$ , alquilo, o  $-\text{CN}$ ; y

$m$  es 0 ó 1;

5 siempre que al menos uno de  $R^{20}$  o  $R^{21}$  incluya  $-\text{CN}$ .

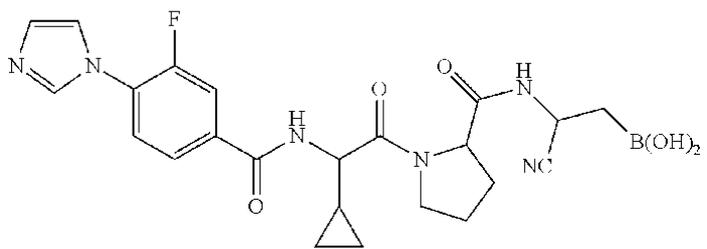
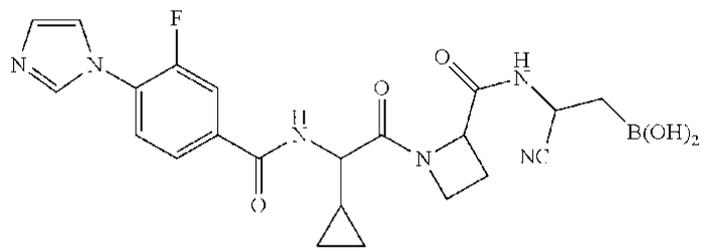
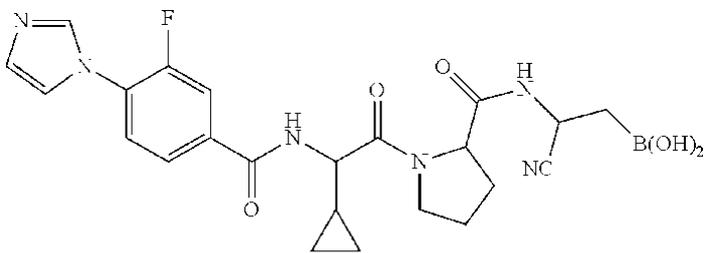
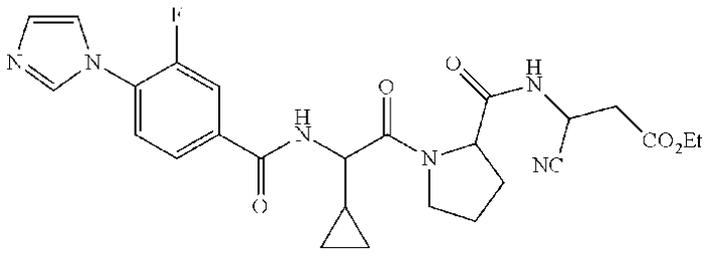
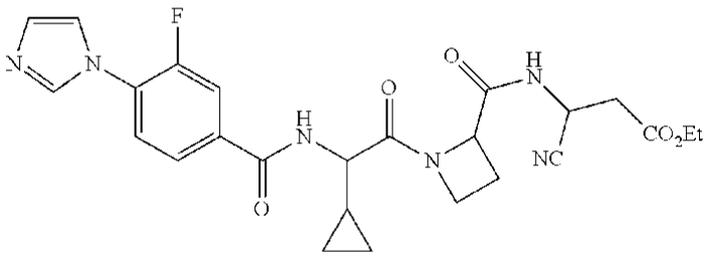
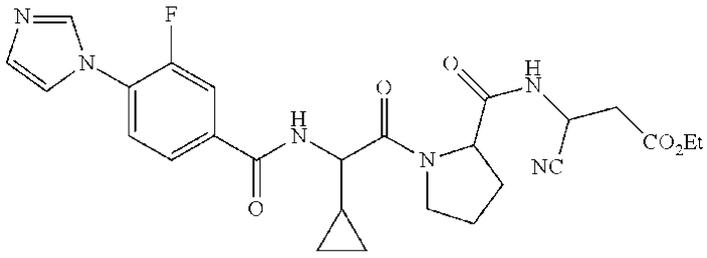
En ejemplos más específicos, los compuestos tienen una fórmula III:

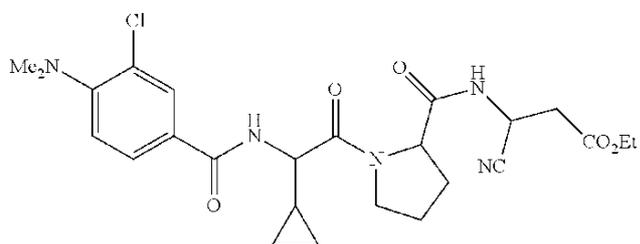
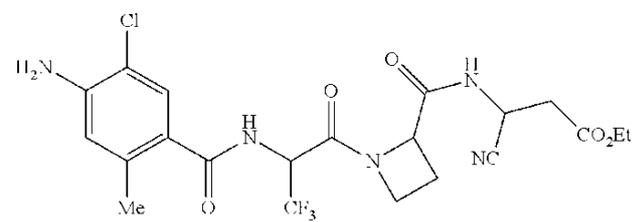
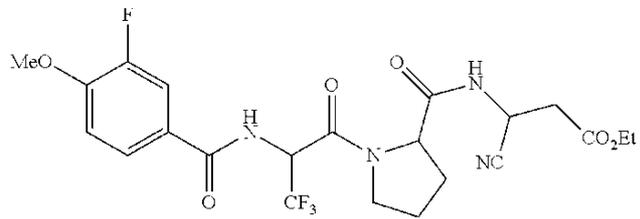
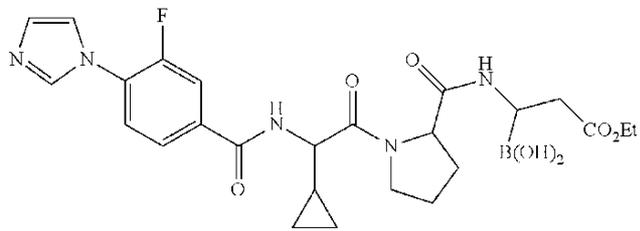
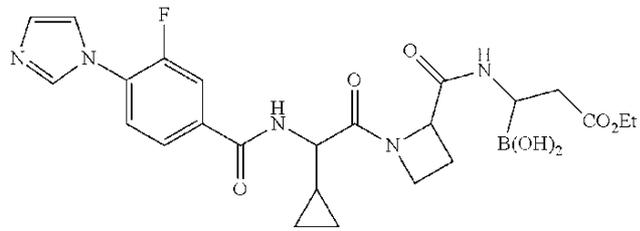
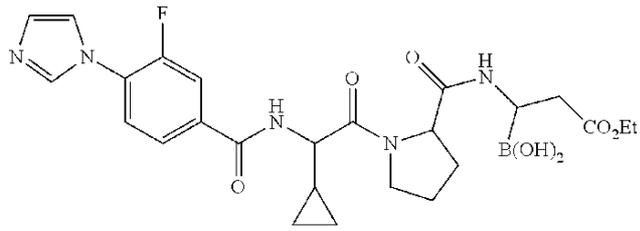


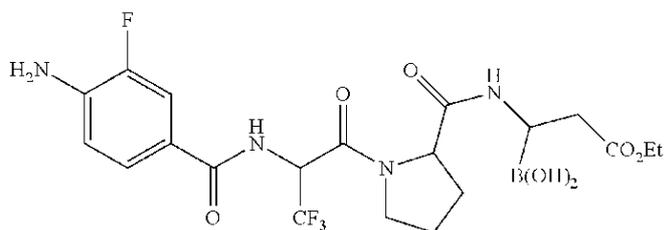
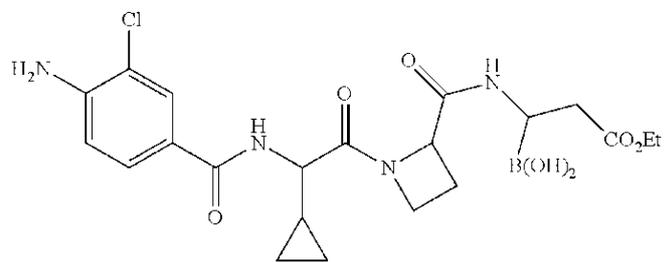
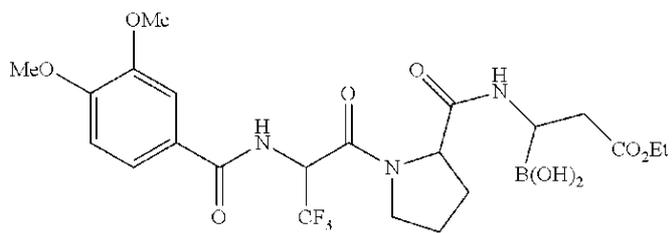
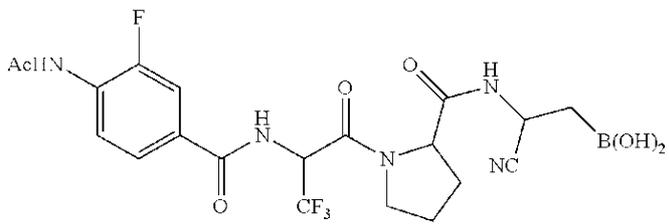
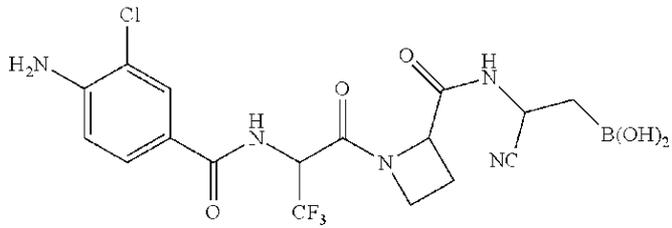
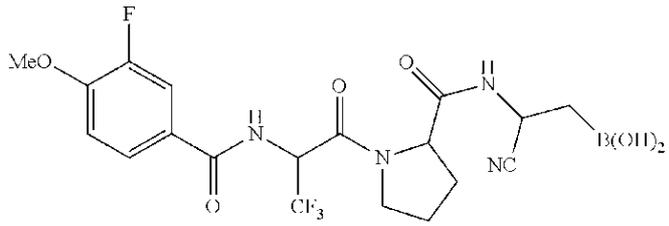
En determinadas realizaciones dadas conocer en el presente documento, la  $\text{Cl}_{50}$  de inhibición de caspasa de los compuestos dados a conocer es menor de 100 nM. Los compuestos pueden presentar una solubilidad acuosa mayor de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , un LogD menor de 5 y un peso molecular de menos de 650 Dalton.

10

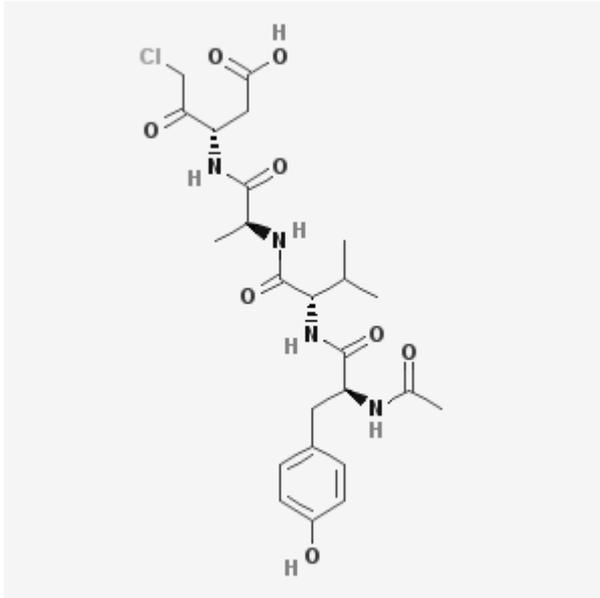
A continuación se indican ejemplos ilustrativos de compuestos específicos:



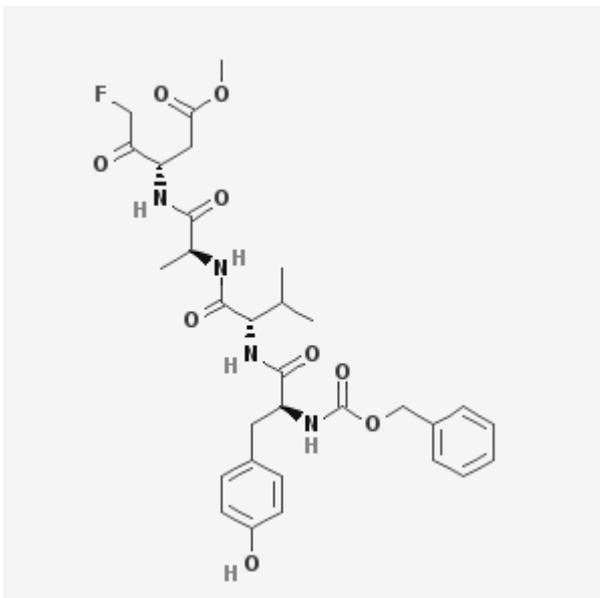




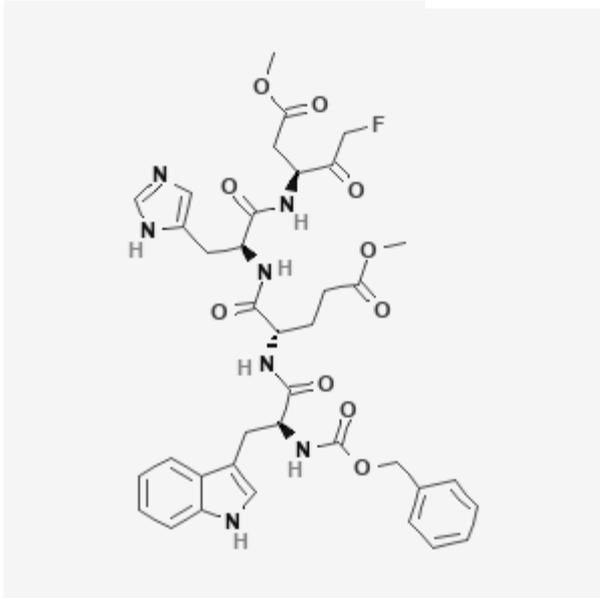
Ejemplos ilustrativos adicionales de compuestos específicos son: ac-YVAD-CMK,



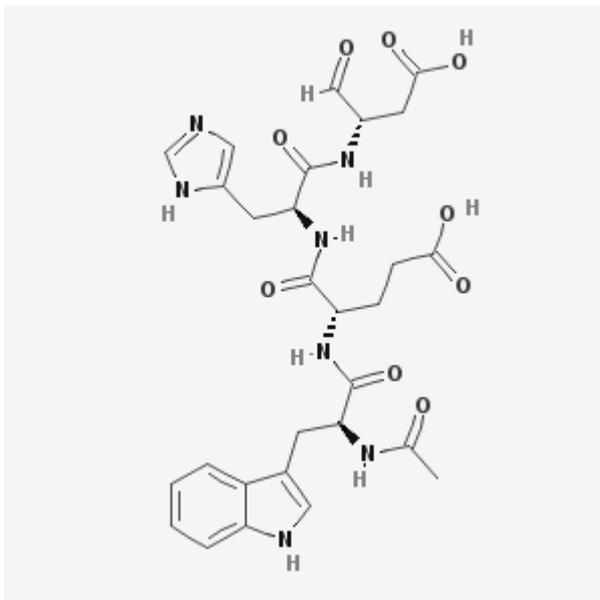
z-YVAD-FMK



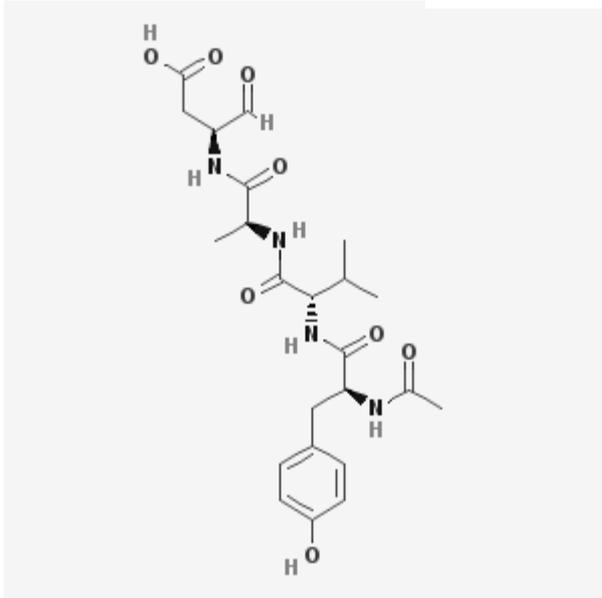
z-WEHD-FMK



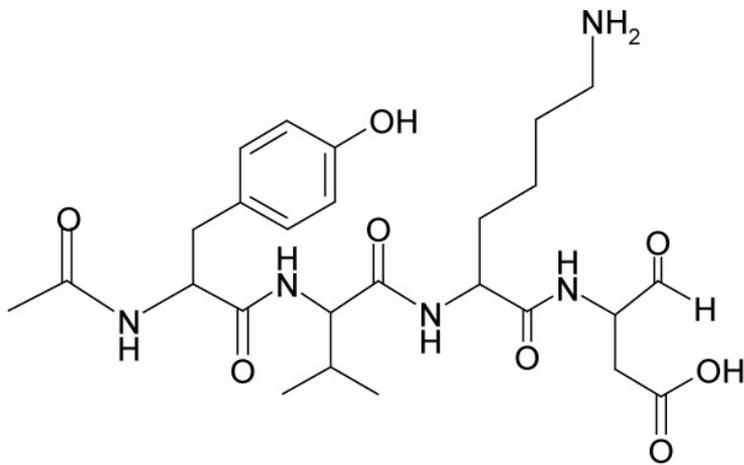
z-WEHD-CHO



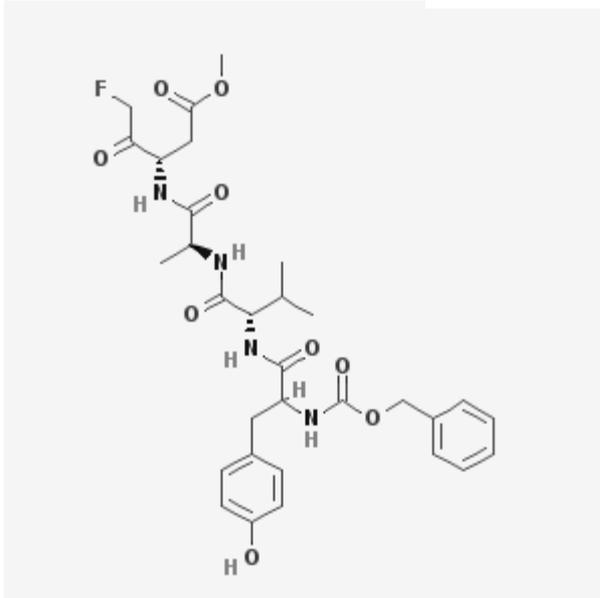
Ac-YVAD-CHO



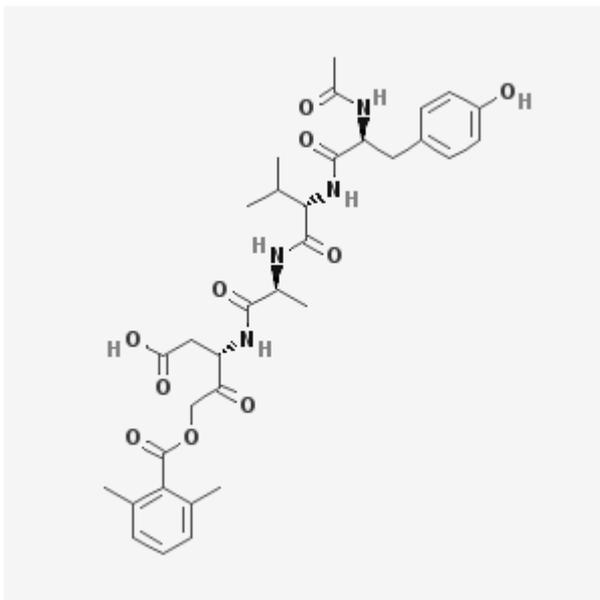
ac-YVKD-CHO



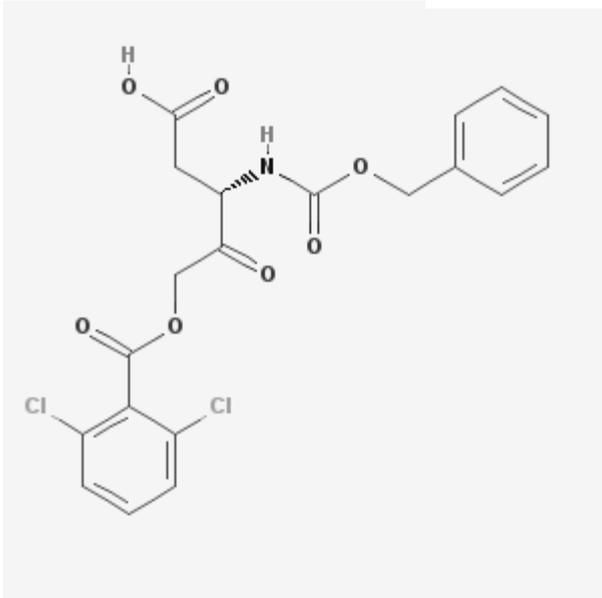
Ac-YVAD-FMK



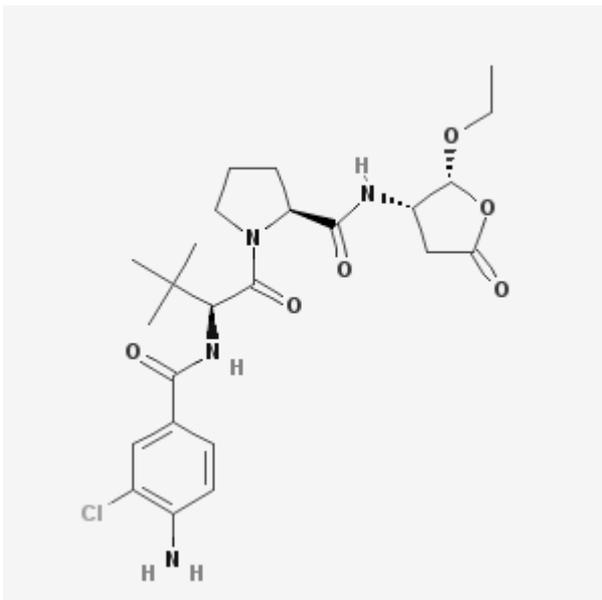
Ac-YVAD-AOM



Z-D-CH2-DCB,



VX-765



- 5 Los compuestos dados a conocer en el presente documento pueden sintetizarse generalmente tal como se ilustra en el documento US9365612B2, que se incorpora en el presente documento como referencia.

10 Un segundo aspecto de la divulgación incluye composiciones farmacéuticas preparadas para la administración a un sujeto, para su uso tal como se refleja en el primer aspecto de la invención, y que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos dados a conocer en el presente documento. La

cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto dado a conocer dependerá de la vía de administración, la especie del sujeto y las características físicas del sujeto que está tratándose. Los factores específicos que pueden considerarse incluyen gravedad y fase de la enfermedad, peso, dieta y medicamentos simultáneos. La  
5 relación de estos factores para determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos dados a conocer la entienden los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas para la administración a un sujeto pueden incluir al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable adicional tal como portadores,  
10 espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, tensioactivos y similares además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también uno o más principios activos adicionales tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares. Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles para estas formulaciones son convencionales.  
15 Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19<sup>a</sup> edición (1995), describen composiciones y formulaciones adecuadas para administración farmacéutica de los compuestos divulgados en el presente documento.

20 En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que esté empleándose. Por ejemplo, las formulaciones parenterales contienen habitualmente líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para  
25 composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que van a administrarse pueden contener pequeñas cantidades de  
30 sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento incluyen aquellas formadas a partir de sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos de los compuestos dados a conocer. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables. Los compuestos dados a conocer particulares poseen al menos un grupo básico que puede formar sales de ácido-base con ácidos. Los ejemplos de grupos básicos incluyen, pero no se limitan a, grupos amino e imino. Los ejemplos de ácidos inorgánicos que pueden formar sales con tales grupos básicos incluyen, pero no se limitan a, ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Los grupos básicos también pueden formar sales con ácidos carboxílicos orgánicos, ácidos sulfónicos, ácidos sulfo o ácidos fosfo o ácido sulfámico N-sustituido, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico y, además, con aminoácidos, por ejemplo con  $\alpha$ -aminoácidos, y también con ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroximetanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenodisulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, 2- ó 3-fosfoglicerato, glucosa-6-fosfato o ácido N-ciclohexilsulfámico (con formación de los ciclamatos) o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico. En particular, las sales adecuadas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, entre otros numerosos ácidos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Determinados compuestos incluyen al menos un grupo ácido que puede formar una sal de ácido-base con una base inorgánica u orgánica. Los ejemplos de sales formadas a partir de bases inorgánicas incluyen sales de los compuestos dados a conocer por la presente con metales alcalinos tales como potasio y sodio, metales alcalinotérreos, incluyendo calcio y magnesio y similares. De manera similar, se contemplan sales de compuestos ácidos con una base orgánica, tales como una amina (tal como se usa en el presente documento, los términos que se refieren a

aminas deben entenderse que incluyen sus ácidos conjugados a menos que el contexto indique claramente que la amina libre está prevista), incluyendo sales formadas con aminoácidos básicos, aminas alifáticas, aminas heterocíclicas, aminas aromáticas, piridinas, guanidinas y amidinas. De las aminas alifáticas, las aminas alifáticas acíclicas, y aminas de di y trialquilo cíclicas y acíclicas son particularmente adecuadas para su uso en los compuestos dados a conocer. Además, también pueden usarse contraiones de amonio cuaternario.

Los ejemplos particulares de bases de amina adecuadas (y sus iones de amonio correspondientes) para su uso en los presentes compuestos incluyen, sin limitación, piridina, N,N-dimetilaminopiridina, diazabiciclononano, diazabicicloundeceno, N-metil-N-etilamina, dietilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, mono-, bis- o tris-(2-hidroxi-etil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, tris(hidroxi-metil)metilamina, N,N-dimetil-N-(2-hidroxi-etil)amina, tri-(2-hidroxi-etil)amina y N-metil-D-glucamina. Para ejemplos adicionales de “sales farmacológicamente aceptables”, véase Berge *et al.*, J. Pharm. Sci. 66:1 (1977).

Los compuestos dados a conocer en el presente documento pueden cristalizarse y pueden proporcionarse en una única forma cristalina o como una combinación de diferentes polimorfos cristalinos. Como tales, los compuestos pueden proporcionarse en una o más formas físicas, tales como diferentes formas cristalinas, formas cristalinas, cristalinas líquidas o no cristalinas (amorfos). Tales formas físicas diferentes de los compuestos pueden prepararse usando, por ejemplo, diferentes disolventes o diferentes mezclas de disolventes para recristalización. Alternativa o adicionalmente, pueden prepararse diferentes polimorfos, por ejemplo, realizando recristalizaciones a diferentes temperaturas y/o alterando las tasas de enfriamiento durante la recristalización. La presencia de polimorfos puede determinarse mediante cristalografía de rayos X, o en algunos casos mediante otra técnica espectroscópica, tal como espectroscopía de RMN de fase sólida, espectroscopía de IR o mediante calorimetría diferencial de barrido.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a sujetos por una variedad de modos de administración a la mucosa, incluyendo por administración oral, rectal, intranasal, intrapulmonar o transdérmica, o mediante administración tópica a otras

superficies. Opcionalmente, las composiciones pueden administrarse por vías no mucosas, incluyendo por vías intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intraarteriales, intraarticulares, intraperitoneales, intratecales, intracerebroventriculares o parenterales. En otras realizaciones alternativas, el compuesto puede administrarse *ex vivo* por exposición directa a células, tejidos u órganos que se originan de un sujeto.

Para formular las composiciones farmacéuticas, el compuesto puede combinarse con diversos aditivos farmacéuticamente aceptables, así como una base o vehículo para la dispersión del compuesto. Los aditivos deseados incluyen, pero no se limitan a, agentes de control del pH, tales como arginina, hidróxido de sodio, glicina, ácido clorhídrico, ácido cítrico, y similares. Además, pueden incluirse anestésicos locales (por ejemplo, alcohol bencílico), agentes isotónicos (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol, sorbitol), inhibidores de la absorción (por ejemplo, Tween 80 o Miglyol 812), agentes de potenciación de la solubilidad (por ejemplo, ciclodextrinas y derivados de las mismas), estabilizadores (por ejemplo, albúmina sérica) y agentes reductores (por ejemplo, glutatión). Pueden incluirse en las composiciones adyuvantes, tales como hidróxido de aluminio (por ejemplo, Amphogel, Wyet Laboratories, Madison, N.J.), adyuvante de Freund, MPL™ (monofosforil lípido 3-O-deacilado A; Corixa, Hamilton, Ind.) e IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.), entre muchos otros adyuvantes adecuados bien conocidos en la técnica. Cuando la composición es un líquido, la tonicidad de la formulación, tal como se mide con referencia a la tonicidad de disolución fisiológica salina al 0,9% (p/v) tomada como unidad, se ajusta normalmente hasta un valor en el que no se inducirá daño tisular sustancial e irreversible en el sitio de administración. Generalmente, la tonicidad de la disolución se ajusta hasta un valor de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3,0, tal como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0, o de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,7.

El compuesto puede dispersarse en una base o vehículo, que puede incluir un compuesto hidrófilo que tiene una capacidad de dispersar el compuesto, y cualquier aditivo deseado. La base puede seleccionarse de una amplia variedad de compuestos adecuados, incluyendo pero sin limitarse a, copolímeros de poliácidos carboxílicos o sales de los mismos, anhídridos carboxílicos (por ejemplo, anhídrido

maleico) con otros monómeros (por ejemplo, (met)acrilato de metilo, ácido acrílico y similares), polímeros de vinilo hidrófilos, tales como poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, derivados de celulosa, tales como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares, y polímeros naturales, tales como quitosán, colágeno, alginato de sodio, gelatina, ácido hialurónico, y sales metálicas no tóxicas de los mismos. A menudo, se selecciona un polímero biodegradable como base o vehículo, por ejemplo, poli(ácido láctico), copolímero de poli(ácido láctico-ácido glicólico), poli(ácido hidroxibutírico), copolímero de poli(ácido hidroxibutírico-ácido glicólico) y mezclas de los mismos. Alternativa o adicionalmente, pueden emplearse ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, ésteres de ácidos grasos de sacarosa y similares como vehículos. Pueden usarse polímeros hidrófilos y otros vehículos solos o en combinación, y puede impartirse integridad estructural potenciada al vehículo mediante cristalización parcial, unión iónica, reticulación y similar. El vehículo puede proporcionarse en una variedad de formas, incluyendo disoluciones fluidas o viscosas, geles, pastas, polvos, microesferas y películas para aplicación directa a una superficie mucosa.

El compuesto puede combinarse con la base o el vehículo según una variedad de métodos, y la liberación del compuesto puede hacerse mediante difusión, desintegración del vehículo, o formación asociada de canales de agua. En algunas circunstancias, el compuesto se dispersa en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas) preparadas a partir de un polímero adecuado, por ejemplo, 2-cianoacrilato de isobutilo (véase, por ejemplo, Michael *et al.*, J. Pharmacy Pharmacol. 43:1-5, 1991), y se dispersa en un medio de dispersión biocompatible, que produce administración mantenida y actividad biológica durante un periodo de tiempo prolongado.

Las composiciones de la divulgación pueden contener alternativamente como vehículos farmacéuticamente aceptables, sustancias según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano y oleato de trietanolamina. Para

composiciones sólidas, pueden usarse vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares.

5

Las composiciones farmacéuticas para administrar el compuesto también pueden formularse como una disolución, microemulsión, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de principios activos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse una fluidez adecuada para las disoluciones, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula deseado en el caso de formulaciones dispersables, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol y sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada del compuesto puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En determinadas realizaciones, el compuesto puede administrarse en una formulación de liberación sostenida, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación retardada. Estas composiciones pueden prepararse con vehículos que protegerán contra una rápida liberación, por ejemplo un vehículo de liberación controlada tal como un polímero, sistema de administración microencapsulada o gel bioadhesivo. La administración prolongada en diversas composiciones de la divulgación puede lograrse incluyendo en la composición agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina. Cuando se desean formulaciones de liberación controlada, los aglutinantes de liberación controlada adecuados para su uso según la divulgación incluyen cualquier material de liberación controlada biocompatible que es inerte para el agente activo y que puede incorporar el compuesto y/u otro agente biológicamente activo. En la técnica se conocen varios de tales materiales. Aglutinantes de liberación controlada útiles son materiales que se metabolizan lentamente en condiciones fisiológicas tras su administración (por ejemplo, a una superficie

mucosa, o en presencia de líquidos corporales). Los aglutinantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, polímeros biocompatibles y copolímeros bien conocidos en la técnica para su uso en formulaciones de liberación mantenida. Tales compuestos biocompatibles son atóxicos e inertes para los tejidos circundantes, y no desencadenan efectos secundarios adversos significativos, tales como irritación nasal, respuesta inmunitaria, inflamación, o similares. Se metabolizan en productos metabólicos que también son biocompatibles y fácilmente eliminados del cuerpo.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación son normalmente estériles y estables en condiciones de fabricación, almacenamiento y uso. Pueden prepararse disoluciones estériles incorporando el compuesto en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto y/u otro agente biológicamente activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos de aquellos enumerados en el presente documento. En el caso de polvos estériles, los métodos de preparación incluyen secado a vacío y liofilización que produce un polvo del compuesto más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución estéril filtrada previamente del mismo. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares.

Según los diversos métodos de tratamiento de la divulgación, el compuesto puede administrarse a un sujeto en una manera coherente con metodologías convencionales asociadas con la gestión del trastorno para el que se busca tratamiento o prevención. Según la divulgación en el presente documento, una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del compuesto y/u otro agente biológicamente activo se administra a un sujeto que necesita de tal tratamiento durante un tiempo y en condiciones suficientes para evitar, inhibir y/o mejorar una enfermedad o estado seleccionado o uno o más síntomas del mismo.

La dosificación real del compuesto variará según factores tales como la indicación de enfermedad y estado particular del sujeto (por ejemplo, edad, tamaño, estado

físico , grado de los síntomas, factores de susceptibilidad, y similares, del sujeto), tiempo y vía de administración, otros fármacos o tratamientos que estén administrándose simultáneamente, así como la farmacología específica del compuesto para provocar la actividad o respuesta biológica deseada en el sujeto.

5 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta profiláctica o terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto secundario tóxico o perjudicial del compuesto y/u otro agente biológicamente activo se supera en términos clínicos por efectos terapéuticamente beneficiosos. Un intervalo no limitativo para una cantidad  
10 terapéuticamente eficaz de un compuesto y/u otro agente biológicamente activo dentro de los métodos y formulaciones de la divulgación es de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de peso  
15 corporal.

La dosificación puede variarla el médico que atiende para mantener una concentración deseada en un sitio diana (por ejemplo, los pulmones o circulación sistémica). Pueden seleccionarse concentraciones superiores o menores basándose  
20 en el modo de administración, por ejemplo, administración transepidérmica, rectal, oral, pulmonar o intranasal frente a administración intravenosa o subcutánea. La dosificación también puede ajustarse basándose en la tasa de liberación de la formulación administrada, por ejemplo, de un aerosol intrapulmonar frente a polvo, liberación mantenida oral frente a formulaciones de administración de partículas  
25 inyectadas o transdérmica, y así sucesivamente.

La presente divulgación también incluye kits, embalajes y unidades de recipiente múltiple que contienen las composiciones farmacéuticas, principios activos y/o medios descritos en el presente documento para administrar los mismos para su uso  
30 en la prevención y el tratamiento de enfermedades y otros estados en sujetos mamíferos. También se proporcionan kits para uso diagnóstico. En una realización, estos kits incluyen un recipiente o formulación que contiene uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. En un ejemplo, este componente se formula en una preparación farmacéutica para administración a un sujeto. El

compuesto está contenido opcionalmente en un recipiente de dispersión a granel o forma de dosificación unitaria o de múltiples unidades. Pueden proporcionarse medios de dispersión opcionales, por ejemplo un aplicador de aerosol pulmonar o intranasal. Los materiales de embalaje incluyen opcionalmente una etiqueta o instrucción que indica para qué fines de tratamiento y/o en qué manera puede usarse el agente farmacéutico embalado con los mismos.

## **Ejemplos**

10

### **Materiales y métodos**

#### *Animales*

Se obtuvieron peces cebra (*Danio rerio* H.) del Zebrafish International Resource Center y se aparearon, se evaluó su fase, se criaron y se procesaron tal como se describe (Westerfield, 2000). Las líneas *roy*<sup>a9/a9</sup>; *nacre*<sup>w2/w2</sup> (*casper*) (White *et al.*, 2008), *Tg(mpx:eGFP)*<sup>i114</sup> (Renshaw *et al.*, 2006), *Tg(mpeg1:eGFP)*<sup>gl22</sup>, *Tg(mpeg1:GAL4)*<sup>gl25</sup> (Ellett *et al.*, 2011), *Tg(lyz:dsRED)*<sup>nz50</sup> (Hall *et al.*, 2007), *Tg(mpx:Gal4.VP16)*<sup>i222</sup> (Davison *et al.*, 2007), *Tg(lcr:eGFP)*<sup>cz3325</sup> (Ganis *et al.*, 2012), *Tg(runx1:GAL4)*<sup>utn6</sup> (Tamplin *et al.*, 2015), *Tg(UAS:nfsB-mCherry)*<sup>c264</sup> (Davison *et al.*, 2007) y *Tg(spint1a)*<sup>hi2217</sup> (Carney *et al.*, 2007; Mathias *et al.*, 2007) se han descrito previamente. Los experimentos realizados cumplen con las directrices del Consejo de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y el Real Decreto español RD 53/2013. Se realizaron experimentos y procedimientos tal como se aprobó por los Comités de Bioética de la Universidad de Murcia (números de aprobación n.º 75/2014, n.º 216/2014 y 395/2017).

Se adquirieron ratones C57BL/6 de Janvier Laboratory. Se realizaron todos los experimentos de acuerdo con las directrices francesas para el manejo de animales y se aprobaron por el Comité de Ética Inserm.

30

#### *Constructo de ADN y generación de transgénicos*

Se generó el constructo *uas:AscΔCARD-GFP* por ensamblajes MultiSite Gateway usando LR Clonase II Plus (Life Technologies) según protocolos convencionales y usando vectores Tol2kit descritos previamente (Kwan *et al.*, 2007). Se describieron previamente los constructos de expresión *Gbp4*, *Gbp4KS→AA*, *Gbp4ΔCARD*,  
 5 *Gbp4KS→AA/ΔCARD* (mutante doble, DM) y *uas:gbp4KS/AA* (Tyrkalska *et al.*, 2016); *Asc-Myc* y *Caspa* (Masumoto *et al.*, 2003); y *Gcsfa* (Liongue *et al.*, 2009).

Se describió previamente la línea *Tg(UAS:gbp4KS/AA)<sup>ums3</sup>* (Tyrkalska *et al.*, 2016). Se generó *Tg(UAS:ascΔCARD-GFP)<sup>ums4</sup>* microinyectando 0,5-1 nl en el saco vitelino  
 10 de embriones de fase unicelular una disolución que contiene 100 ng/μl de *uas:ascΔCARD-GFP* y constructos *uas:gbp4KS→AA*, respectivamente, y 50 ng/μl de ARN de Tol2 en tampón de microinyección (tampón Tango ×0,5 y disolución de rojo de fenol al 0,05%) usando un microinyector (Narishige).

15 *Morfolino, inyección de ARN y tratamientos químicos de larvas de pez cebra*

Se resuspendieron morfolinos específicos (Gene Tools) en agua libre de nucleasa a 1 mM (tabla S1). Se obtuvo ARN transcrito *in vitro* siguiendo las instrucciones del fabricante (kit mMESSAGE mMACHINE, Ambion). Se mezclaron morfolinos y ARN en tampón de microinyección y se microinyectaron en el saco vitelino de embriones  
 20 de fase unicelular usando un microinyector (Narishige) (0,5-1 nl por embrión). Se usó la misma cantidad de MO y/o ARN en todos los grupos experimentales.

En algunos experimentos, a embriones 1-2 dpf se les retiró el corion y se trataron durante 24 h hasta 7 dpf a 28°C mediante inmersión en baño con los inhibidores de  
 25 caspasa-1 Ac-YVAD-CMK (irreversible) o Ac-YVAD-CHO (reversible) (100 μM, Peptanova) diluidos en agua con huevo complementada con DMSO al 1% o con metronidazol (Mtz, 5 mM, Sigma-Aldrich).

30 *Obtención de imágenes en vivo, tinción con negro de Sudán de neutrófilos, ablación de neutrófilos y determinación de eritrocitos en larvas de pez cebra*

A 48 y 72 hpf, se anestesiaron las larvas en triclaína y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% (p/v) (Sigma-Aldrich) disuelta en agua con huevo (de Oliveira *et al.*, 2013). Se capturaron imágenes con un estereomicroscopio de

epifluorescencia Lumar V12 equipado con filtros fluorescentes verdes y rojos mientras que los animales se mantuvieron en sus matrices de agar a 28,5°C. Todas las imágenes se adquirieron con la cámara integrada en el estereomicroscopio y se usaron para recuento posterior del número total de neutrófilos, macrófagos o HSC en larvas completas.

Con el fin de reducir la pigmentación y mejorar la señal de la tinción con negro de Sudán, se incubaron larvas 24 hpf en 1-fenil 2-tiourea 200  $\mu$ M (PTU) hasta 72 hpf, cuando se anestesiaron en triclaína tamponada y se fijaron durante la noche a 4°C en formaldehído libre de metanol al 4%. Al día siguiente, todas las larvas se aclararon con PBS tres veces, se incubaron durante 15 min con negro de Sudán (n.º 380B-1KT, Sigma-Aldrich) y se lavaron extensivamente en EtOH al 70% en agua. Después de eso, se realizó una rehidratación progresiva: EtOH al 50% en PBS y Tween 20 al 0,1% (PBT) (Sigma-Aldrich), EtOH al 25% en PBT y PBT solo. Finalmente, las larvas se visualizaron inmediatamente usando un estereomicroscopio Scope.A1 equipado con una cámara digital (AxioCam ICc 3, Zeiss) (Le Guyader *et al.*, 2008).

Para la ablación de neutrófilos, se trataron larvas *Tg(mpx:Gal4.VP16; UAS:nsfb-mCherry)* a 2 dpf con Mtz 5 mM y se mantuvieron en la oscuridad. A 72 hpf, se retiró el fármaco y se trataron las larvas hasta 7 dpf con DMSO al 1% solo o que contenía Ac-YVAD-CMK (100  $\mu$ M). Se refrescó el inhibidor cada 24 h y se obtuvieron imágenes de las larvas una vez al día hasta 7 dpf y se determinó el número de neutrófilos (Davison *et al.*, 2007; Halpern *et al.*, 2008).

Se determinaron recuentos de eritrocitos mediante citometría de flujo. A 3 dpf, se anestesiaron grupos de 50 larvas *Tg(lcr:eGFP)* en triclaína, se trituraron con una cuchilla y se incubaron a 28°C durante 30 min con Liberase 0,077 mg/ml (n.º 05401119001, Roche). Después de eso, se añadió FBS al 10% para inactivar Liberase y la suspensión celular resultante se hizo pasar a través de un filtro celular de 40  $\mu$ m. Se usó Sytox Blue (Life Technologies) como colorante vital para excluir células muertas. Se realizaron adquisiciones de citometría de flujo en un FACSCALIBUR (BD). Se realizaron análisis usando software FlowJo (Treestar).

*Ensayos de infección de larvas de pez cebra*

Para experimentos de infección, se usó la cepa *S. typhimurium* 12023 (tipo natural) proporcionada por el Prof. Holden. Durante la noche, se diluyeron los cultivos en medio de Luria-Bertani (LB) 1/5 en LB con NaCl 0,3 M, se incubaron a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica de 1,5 a 600 nm, y finalmente se diluyeron en PBS estéril. Se anestesiaron larvas de 2 dpf en medio embrionario con tricaina 0,16 mg/ml y se inyectaron 10 bacterias en el saco vitelino o vesícula ótica. Se permitió que las larvas se recuperaran en agua con huevo a 28-29°C, y se monitorizaron para determinar signos clínicos de enfermedad o mortalidad a lo largo de 5 días y reclutamiento de neutrófilos hasta 24 hpi (Tyrkalska *et al.*, 2016).

*Hibridación in situ de montaje completo (WISH) en larvas de pez cebra*

Se usaron embriones Casper transparentes para WISH (Thisse *et al.*, 1993). Se generaron sondas de ARN sentido y antisentido *gata1a*, *spi1b*, *gcsfr*, *cmyb*, *runx1* y *rag1* usando el kit de marcaje de ARN DIG (Roche Applied Science) a partir de plásmidos linealizados. Se obtuvieron imágenes de embriones usando un estereomicroscopio Scope.A1 equipado con una cámara digital (AxioCam ICc 3, Zeiss).

*Cultivo celular y ensayos de diferenciación eritroide*

Se recogieron células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica de un único donante (R003272, 25/08/2016). Se descongelaron las células rápidamente en un baño de agua a 37°C, después se diluyeron en serie con un tampón de descongelación (FBS al 1% en PBS) hasta 32 ml de volumen total y finalmente se centrifugaron durante 10 min a temperatura ambiente (250xg). Tras desechar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 20 ml de medios de expansión que contenían: medio libre de suero para expansión y cultivo de células hematopoyéticas - SFEM (n.º 09650, Stem Cell), el 1% de cóctel de citocinas 100 – CC100 (n.º 02690, Stem Span CC100) y el 2% de mezcla de penicilina-estreptomicina (P/S, n.º 15140122, Thermo Fischer Scientific), y se hicieron crecer en matraces en reposo a 37°C. A las 72 h tras descongelación, se añadieron 30 ml de medios de expansión nuevos. Tras seis días de expansión, se centrifugaron todas las células de nuevo durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio eritroide de diferenciación (EDM) que contenía: el 98% de SFEM filtrado, el 2% de P/S, 1 U/ml de EPO, 5 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de SCF

(factor de células madre), 2  $\mu\text{M}$  de dexametasona y 1  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -estradiol, y se dividieron en 2 matraces T75, de los que uno se trató con DMSO y el otro con Ac-YVAD-CMK (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , Peptanova). Al tercer día de diferenciación, se añadió inhibidor nuevo en el EDM y se reemplazó el medio antiguo. Se recogieron células en diferentes puntos de tiempo (0, 2, 3 y 5 días de diferenciación), se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS, se congelaron al instante en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se mantuvieron células K562 (CRL-3343; Colección americana de cultivos tipo) en RPMI complementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina al 1% (Life Technologies). Se mantuvieron las células y se dividieron antes de su confluencia cada 72 h. Para la diferenciación, se trataron células con hemina 50  $\mu\text{M}$  (n.º 16009-13-5, Sigma-Aldrich), se prepararon tal como se describió previamente (Smith *et al.*, 2000), en presencia de DMSO al 0,1% solo o que contenía Ac-YVAD-CMK 100  $\mu\text{M}$ . Se recogieron células en diferentes puntos de tiempo (0, 6, 12, 24, 48 horas tras la adición de hemina), se centrifugaron, se lavaron con PBS y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Actividad de ensayo de caspasa-1*

La actividad de caspasa-1 se determinó con el sustrato fluorométrico Z-YVAD-AFC (sustrato VI de caspasa-1, Calbiochem) tal como se describió previamente (Angosto *et al.*, 2012; Lopez-Castejon *et al.*, 2008; Tyrkalska *et al.*, 2016). En resumen, se lisaron larvas de pez cebra, y células  $\text{CD34}^{+}$  y K562 en tampón de lisis celular hipotónico [ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 25 mM, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5 mM, ditiotreitól (DTT) 5 mM, cóctel inhibidor de proteasa 1:20 (Sigma-Aldrich), pH 7,5] en hielo durante 10 min. Para cada reacción, se incubaron 80  $\mu\text{g}$  de proteína durante 90 min a  $23^{\circ}\text{C}$  con Z-YVAD-AFC 50  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción [3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) al 0,2%, HEPES 0,2 M, sacarosa al 20%, DTT 29 mM, pH 7,5]. Después de la incubación, la fluorescencia del AFC liberado del sustrato Z-YVAD-AFC se midió con un espectrofluorímetro FLUOstart (BGM, LabTechnologies) a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 492 nm. Una actividad representativa de

ensayo de caspasa-1 de los tres llevados a cabo, se muestra acompañando cada recuento celular.

### *Microscopía láser confocal*

5 Se sembraron células en cubierta de 12 mm Cellware de poli-L-Lys (Corning), se permitió que 50.000 células en 100  $\mu$ l se unieran a la cubierta durante 10 min a temperatura ambiente, después se añadieron medio y tratamiento. Después del tratamiento con hemina, se lavaron células con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 10 min, se incubaron 20 min a temperatura  
10 ambiente con glicina 20 mM, se permeabilizaron con NP40 0,5% y se bloquearon durante 1 h con BSA al 2%. Entonces se marcaron las células con anticuerpo primario correspondiente, seguido por anticuerpo secundario conjugado con Alexa 568 (Thermo Fisher Scientific). Se montaron las muestras usando un medio de montaje de Dako y se examinaron con un microscopio de barrido láser confocal  
15 AOBS y software de Leica (Leica Microsystems). Se adquirieron las imágenes en un formato de 1.024  $\times$  1.024 píxeles en modo de barrido secuencial entre fotogramas para evitar diafonía. El objetivo usado era HCX PL APO CS  $\times$  63 y el valor estenopeico era 1, correspondiente a 114,73  $\mu$ m.

### 20 *Inmunotransferencia*

El tampón de lisis para lisis de células de mamíferos contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 1% (p/v) e inhibidor de proteasa nuevo (1/20, P8340, Sigma-Aldrich), mientras que para la lisis de larvas de pez cebra contenía SDS al 1%. Se realizó la cuantificación de proteínas con el kit  
25 BCA usando BSA como patrón. Se sometieron los lisados celulares (40  $\mu$ g) en tampón de muestra de SDS a electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron durante 1 h con TTBS que contenía polvo de leche seca desnatada al 5% (p/v) o BSA al 2% (p/v). Las membranas se inmunotransfirieron en el mismo tampón 16 h a 4°C con los  
30 anticuerpos primarios indicados. Las inmunotransferencias se lavaron entonces con TTBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con HRP diluidos 2.500 veces en leche desnatada al 5% (p/v) en TTBS. Después de lavados repetidos, se detectó la señal con el reactivo de quimioluminiscencia potenciado y ChemiDoc XRS Biorad. Los anticuerpos primarios

usados son: anticuerpo policlonal de conejo contra GATA1 humana (1/200, n.º sc1234, Santa Cruz Biotechnology) para ensayo confocal, Acn de conejo contra GATA1 humana (1/200, n.º 3535, Cell Signaling) para inmunotransferencia, anticuerpo policlonal de conejo contra CASP1 (1/200, n.º sc56036 Santa Cruz Biotechnology) para ensayo confocal, anticuerpo policlonal de conejo contra Gata1a y Spi1b de pez cebra (1/2000, n.º GTX128333 y GTX128266, GeneTex), anticuerpo policlonal de conejo contra histona H3 (1/200, n.º ab1791, Abcam) y anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG® M2-Peroxidasa (HRP) producido en ratón (A8592 Sigma-Aldrich). Se ha realizado análisis de densitometría usando software Fiji Image J (Schindelin *et al.*, 2012).

#### *Inmunoprecipitación y ensayo de caspasa-1 recombinante*

También se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación tal como se describió previamente (Tyrkalska *et al.*, 2017), con pequeñas modificaciones. Se lavaron las células dos veces con PBS, se solubilizaron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,7, NaCl 150 mM, NP-40 al 1% y cóctel inhibidor de proteasa) durante 30 min en agitación y se centrifugaron (13,000 × g, 10 min). Se incubó el lisado celular (1 mg) durante 2 h a 4°C con agitación suave con 40 µl de suspensión de ANTIFLAG® M2 (A2220 Sigma-Aldrich). Se lavaron los inmunoprecipitados cuatro veces con tampón de lisis que contenía NaCl 0,15 M, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 10 UI de caspasa-1 recombinante (n.º GTX65025, GeneTex) en tampón de reacción (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 50 mM, Chaps al 0,1%, EDTA 10 mM, glicerol al 5% y DTT 10 mM) durante 2 h a 37°C. Se hirvió la resina en tampón de muestra de SDS 5 min a 95°C y se resolvieron las proteínas unidas en SDS-PAGE al 4-15% (BioRad TGX n.º 456-1084) y se transfirieron a membranas de PVDF durante 1 h a 300 mA. Se sondaron inmunotransferencias con anticuerpos a FLAG y GATA1 (véase anteriormente).

#### *Análisis de la expresión génica*

Se extrajo ARN total de 10<sup>6</sup> células CD34<sup>+</sup> o K562, embriones/larvas completos (60) o colas larvarias (100) con reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y se trataron con DNasa I, calidad para amplificación (1 U/µg de ARN; Invitrogen). Se usó transcriptasa inversa SuperScript III RNasa H<sup>□</sup>

(Invitrogen) para sintetizar el ADNc de la primera hebra con cebador de oligo(dT)18 de 1  $\mu$ g de ARN total a 50°C durante 50 min. Se realizó PCR en tiempo real con un instrumento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando reactivos SYBR Green PCR Core (Applied Biosystems). Se incubaron las mezclas de reacción durante 5 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C, y finalmente 15 s a 95°C, 1 min a 60°C y 15 s a 95°C. Para cada ARNm, se normalizó la expresión génica a la proteína ribosomal S11 (*rps11*) para pez cebra o  $\beta$ -actina (*ACTB*) para el contenido de células humanas en cada muestra siguiendo el método Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los cebadores usados se muestran en (tabla S2). En todos los casos, cada 10 PCR se realizó con muestras en triplicado y se repitió con al menos dos muestras independientes.

#### *Análisis de datos de GEO*

Se extrajeron perfiles de expresión génica de microalineamiento del conjunto de 15 datos GSE63270 de Gene Expression Omnibus (GEO) usando el código geo2r en el software R Studio. Los niveles de expresión de *GATA1*, *IL1B*, *CASP1*, *PYCARD*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4* y *GBP5* se analizaron en diferentes fases de la diferenciación eritroide de siete donantes humanos sanos, incluyendo HSC, CMP, MEP y GMP.

20

#### *Tratamiento de los ratones y muestreo de sangre*

Se inyectaron por vía intraperitoneal 5-FU (120 mg/kg en PBS en el día 0) y Ac-YVAD-CMK (10 mg/kg en PBS que contenía DMSO al 10% en los días 6, 7, 10 y 12). Se recogieron 50  $\mu$ l de muestras de sangres de ratones orbitales a -1, 6, 10 y 14 25 días, y se determinaron los eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas y glóbulos blancos usando un analizador de hematología ProCyte Dx siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *Análisis estadístico*

30 Se muestran los datos como media  $\pm$  EEM y se analizaron mediante análisis de la variancia (ANOVA) y una prueba múltiple de amplitud de Tukey o Bonferroni para determinar las diferencias entre grupos. Las diferencias entre dos muestras se analizaron mediante la prueba de la *t* de Student. Se usó la prueba exacta de Fisher para el análisis de tablas de contingencia. Se usó una prueba de rango logarítmico

con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones para calcular las diferencias estadísticas en la supervivencia de los diferentes grupos experimentales.

## **Resultados**

### 5 *La inhibición de inflamomas disminuye el número de neutrófilos y macrófagos en larvas de pez cebra*

Usando líneas transgénicas de pez cebra con neutrófilos fluorescentes verdes *Tg(mpx:eGFP)<sup>i114</sup>* o macrófagos *Tg(mpeg1:eGFP)<sup>g122</sup>*, se cuantificó el número total de ambas poblaciones celulares en larvas completas a 72 hpf. La inhibición genética de varios componentes de inflamoma, concretamente Gbp4, Asc y Caspa, el homólogo funcional de CASP1 de mamífero (Kuri *et al.*, 2017; Masumoto *et al.*, 2003; Tyrkalska *et al.*, 2016), dio como resultado números reducidos significativos de ambos neutrófilos (figura 1a, 1b) y macrófagos (figura 11a, 11b). De manera similar, la inhibición farmacológica de caspasa-1 con el inhibidor irreversible Ac-YVAD-CMK (Tyrkalska *et al.*, 2016) también dio como resultado números reducidos de células mieloides (figura 1c, 1d, 11c, 11d). Estos resultados se confirmaron usando una línea transgénica independiente *Tg(lyz:dsRED)<sup>nz50</sup>* con neutrófilos marcados (figura 12a-12d). De manera similar, la expresión forzada del mutante deficiente en GTPasa de Gbp4 (KS/AA) así como su mutante doble (DM: KS/AA;  $\Delta$ CARD), ambos de los cuales se comportan como negativos dominantes (DN) e inhiben la activación de caspasa-1 dependiente de inflamomas (Tyrkalska *et al.*, 2016), dio como resultado un número de neutrófilos reducido (figura 1e, 1f). Además, aunque la activación del inflamoma por la expresión forzada de o bien Gbp4, o bien Asc o bien Caspa no pudo aumentar los números de neutrófilos (figura 1e-1h) o macrófagos (figura 11e-11f), pudo rescatar el número de células mieloides y la actividad de caspasa-1 en peces deficientes en Gbp4 y Asc (figura 1g-1j). De manera notable, sin embargo, la expresión simultánea de Asc y Caspa aumentó significativamente el número de neutrófilos (figura 1i, 1j) y macrófagos (figura 11e, 11f).

### 30 *El inflamoma regula la diferenciación de HSC pero es dispensable para su aparición*

La diferenciación de HSC y células progenitoras para dar diversos tipos de células sanguíneas se controla mediante múltiples factores extrínsecos e intrínsecos y la desregulación en hematopoyesis puede dar como resultado varias anomalías hematológicas (Morrison *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2007). Los trastornos inflamatorios crónicos están asociados habitualmente a neutrofilia y anemia, la denominada anemia de enfermedades crónicas (ACD). Por tanto, se examinó a continuación si el inflammasoma también regulaba la eritropoyesis usando una línea transgénica de pez cebra *Tg(lcr:eGFP)*, que tiene expresión de GFP eritroide específica (Ganis *et al.*, 2012). Los resultados mostraron que la actividad de inflammasoma tuvo el efecto inverso sobre los eritrocitos que sobre las células mieloides; es decir, la abundancia de eritrocitos aumentó tras la inhibición de inflammasoma farmacológica y genética, tal como se sometió a ensayo mediante citometría de flujo (figura 2a-2f). Sin embargo, la expresión de *cmyb* y *runx1*, que empieza por 36 hpf y marca células progenitoras y madre hematopoyéticas definitivas emergentes (Burns *et al.*, 2005), no resultó afectada en larvas deficientes en *Gbp4* y *Asc* a 48 hpf, tal como se sometió a ensayo mediante hibridación *in situ* de montaje completo (WISH) (figura 13a). De manera similar, la expresión de *rag1*, que se expresa en células T tímicas diferenciadas no resultó afectada aparentemente por 5 dpf en larvas deficientes en inflammasoma (figura 13a). En conjunto, estos resultados sugieren un papel específico del inflammasoma en la regulación del equilibrio entre mielopoyesis y eritropoyesis.

Para confirmar además el papel del inflammasoma en la diferenciación de HSC, se cuantificó el número de HSC en la línea transgénica *Tg(runx1:GAL4; UAS:nfsB-mCherry)* que ha marcado HSC (Tamplin *et al.*, 2015), tras inhibición farmacológica o genética del inflammasoma en diferentes fases del desarrollo (24 y 48 hpf). La inhibición de caspasa-1 no dio como resultado cambios en el número de HSC en cualquier punto del tratamiento, confirmándose el resultado en larvas deficientes en *Asc* (figura 3a-h). Además, la inhibición genética del inflammasoma en neutrófilos y HSC mediante la expresión forzada de formas DN de *Asc* (*Asc* $\Delta$ CARD) o *Gbp4* (*Gbp4*KS/AA) (Tyrkalska *et al.*, 2016) usando los promotores específicos *mpx* y *runx1*, respectivamente, mostró que el número de neutrófilos disminuía en HSC, pero no en larvas deficientes en inflammasoma de neutrófilos (figura 3i-3l). En conjunto, estos resultados confirman la dispersabilidad del inflammasoma para la

aparición y renovación de HSC, pero que se requiere intrínsecamente para la diferenciación de HSC.

El pez cebra es un modelo elegante para la ablación celular mediante el uso de las líneas transgénicas específicas que expresan la nitroreductasa bacteriana, codificada por el gen *nfsB*, bajo el control de promotores específicos (Davison *et al.*, 2007). La enzima nitroreductasa convierte el fármaco metronidazol (Mtz) en un producto citotóxico, que induce muerte celular en células expresoras para lograr ablación específica de tejido que no tiene efecto sobre otras poblaciones celulares (Curado *et al.*, 2007; Curado *et al.*, 2008; Prajsnar *et al.*, 2012). Usando este enfoque, se extirparon neutrófilos en *Tg(mpx:Gal4; UAS:nfsB-mCherry)* aplicando Mtz durante 24 h y después se analizó la recuperación de neutrófilos en presencia o ausencia del inhibidor de caspasa-1 durante 6 días (figura 4a). Mtz redujo de manera robusta el número de neutrófilos, que empezó a recuperarse a los 4 días tras la ablación en larvas de control (figura 5B, 5C). Sin embargo, la inhibición farmacológica del inflammasoma afectó a la recuperación de neutrófilos tras la ablación y disminuyó fuertemente la abundancia de neutrófilos en larvas no extirpadas (figura 4b, 4c). Tal como se esperaba, el tratamiento con Mtz continuo dio como resultado una disminución de neutrófilos drástica pero no mostró ningún efecto tóxico sobre larvas de control que no expresaban la nitroreductasa (figura 4b, 4c). Estos resultados indican que el inflammasoma es indispensable para la diferenciación mieloide de HSC.

*La inhibición de inflammasomas perjudica la mielopoyesis impulsada por la demanda*

En respuesta a la infección, el tejido hematopoyético potencia la producción y movilización de neutrófilos, que tienen una vida corta y se necesitan en grandes cantidades para luchar contra las infecciones. Este proceso se denomina hematopoyesis impulsada por la demanda o de emergencia (Hall *et al.*, 2012). Para comprobar si sólo la hematopoyesis de estado estable o también la impulsada por la demanda se regulaban por el inflammasoma, se infectó con *Salmonella typhimurium* en la vesícula óptica de larvas 48 hpf y se contó el número de neutrófilos total a 24 hpi en presencia o ausencia del inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK. Se observó que la inhibición farmacológica del inflammasoma podía anular la mielopoyesis impulsada por infección, que dio como resultado un número

aumentado de neutrófilos en larvas infectadas (figura 5a, 5b). De manera notable, la expresión forzada de factor estimulante de colonias de granulocitos (Gcsf), que estimula tanto la granulopoyesis de estado estable como impulsada por la demanda en pez cebra (Hall *et al.*, 2012; Stachura *et al.*, 2013), aumentó drásticamente el número de neutrófilos a niveles similares en larvas de tipo natural y deficientes en Asc, así como en larvas tratadas con el inhibidor de caspasa-1, sin afectar a la actividad de caspasa-1 (figura 5c-5f). No obstante, Gcsf no pudo rescatar la mayor susceptibilidad a infección por *S. typhimurium* de larvas deficientes en Asc y larvas tratadas con inhibidor de caspasa-1 (figura 5g, 5h), lo que confirma resultados previos en larvas deficientes en Gbp4 (Tyrkalska *et al.*, 2016). Todos estos resultados también sugieren que el inflammasoma regula la decisión de destino mieloide/eritroide además de la función de células mieloides maduras.

#### *El inflammasoma desplaza el equilibrio de Spi1/Gata1 favoreciendo la diferenciación mieloide*

Se ha demostrado que la regulación de Spi1 y Gata1 es crítica para la diferenciación de células mieloides y eritroides, respectivamente, en todos los vertebrados. Puesto que la inhibición del inflammasoma dio como resultado un sesgo de linaje hematopoyético, es decir, células sanguíneas mieloides reducidas y células sanguíneas eritroides aumentadas, entonces se analizaron los niveles de *spi1* y GATA1 por RT-qPCR y WISH. Se observaron niveles de transcrito aumentados de *gata1* a 24 hpf en larvas deficientes en Gbp4 y Asc, mientras que los niveles de los genes que codifican para *spi1* y factores de crecimiento de macrófagos y neutrófilos pivotaes aguas abajo, concretamente factores estimulantes de colonias de macrófagos y granulocitos (genes *mcsf* y *gcsf*), no estaban afectados en gran medida (figuras 5i). De manera importante, los niveles de la proteína Gata1 también se ajustaron por el inflammasoma, puesto que la inhibición genética de o bien Asc o bien Gbp4 pudo aumentar Gata1, mientras que la expresión forzada de Asc y Caspa, que dio como resultado un número aumentado de neutrófilos y macrófagos (figura 1i, 1j, 11e, 11f), disminuyó de manera robusta Gata1 (figura 5j). Por tanto, el inflammasoma regula la decisión de destino de células mieloides/eritroides mediante el ajuste de los niveles de GATA1.

*La regulación de diferenciación de HSC por el inflamasoma se conserva evolutivamente*

A continuación, se buscó determinar si el inflamasoma también regula la hematopoyesis humana. El análisis bioinformático de los perfiles de expresión de genes que codifican para componentes de inflamasoma en células progenitoras y madre hematopoyéticas normales (conjunto de datos de GEO GSE63270) (Jung *et al.*, 2015) reveló los niveles esperados aumentados de GATA1 en progenitor mieloide común (CMP) y progenitores megacariocíticos-eritroides (MEP). En cambio, los niveles de transcrito de *CASP1* disminuyeron tanto en CMP como MEP, mientras que *PYCARD*, que codifica para ASC, *NLRP3*, *NLRP1* y *GBP5* sólo se redujo en MEP pero no en CMP. Sin embargo, los niveles de *IL1B* no mostraron un patrón claro asociado con eritropoyesis o mielopoyesis.

Entonces se confirmó una estrecha regulación de *CASP1*, *PYCARD*, *NLRP3* y *NLRC4* durante la diferenciación eritroide de HSC CD34<sup>+</sup> inducida *in vitro* mediante eritropoyetina (EPO). Por tanto, los niveles de transcrito de todas ellas se redujeron en el día 3 ó 5 tras la adición de EPO (figura 6a). De manera más interesante, la actividad de caspasa-1 se redujo tras la adición de EPO y permaneció a niveles indetectables hasta 5 días de diferenciación, el tiempo más largo analizado (figura 6b). Estos datos dieron lugar a analizar el impacto de la inhibición farmacológica de *CASP1* en la diferenciación eritroide de HSC CD34<sup>+</sup> mediante EPO. Sorprendentemente, la inhibición de *CASP1* dio como resultado niveles de transcrito de *GATA1* aumentados los 3 días de diferenciación eritroide y aquellos del gen que codifica para los marcadores de diferenciación eritroide glicoforina A (GYPA), receptor de transferrina (TFRC) y proteína de transporte de anión banda 3 (SLC4A1) a los 3 ó 5 días tras la adición de EPO (figura 6c).

Para explorar además la relevancia del inflamasoma en la diferenciación eritroide, se usó entonces la línea de células K562 eritroleucémicas humanas, que pueden diferenciarse en eritrocitos en presencia de hemina (Andersson *et al.*, 1979; Koeffler y Golde, 1980). Se encontró que los niveles y actividad de GATA1 aumentaban en fases tempranas de la eritropoyesis, mientras que se reducían en la última fase para permitir la diferenciación eritroide terminal (Ferreira *et al.*, 2005; Whyatt *et al.*, 2000).

Tal como se esperaba, se observó que la hemina promovió una acumulación de hemoglobina gradual y niveles de la proteína GATA1 reducidos desde 0 hasta 48 h (figura 7a, 7c). De manera notable, los niveles de transcrito de *NLRC4*, *NLRP3* y *CASP1* aumentaron gradualmente, mientras que aquellos de *PYCARD* tuvieron un máximo a las 12 h y después se redujeron hasta niveles basales. Además, la actividad de *CASP1* (figura 7b) y los niveles de proteína (figura 7c) aumentaron progresivamente durante la diferenciación eritroide. Además, *CASP1* se distribuyó de manera uniforme tanto en el citosol como en el núcleo (figura 7d). Sorprendentemente, la inhibición farmacológica de *CASP1* en células K562 perjudicó la diferenciación eritroide inducida por hemina, evaluada como acumulación de hemoglobina, e inhibió la reducción de GATA1 tanto a las 24 (figura 7e) como a las 48 h (figura 7f, 7g).

*CASP1* puede seleccionar como diana varias proteínas para regular la diferenciación de HSC. Una posibilidad es que *CASP1* escinda directamente GATA1, tal como se ha notificado para *CASP3*, que regula negativamente la eritropoyesis mediante escisión de GATA1 (De Maria *et al.*, 1999). Por tanto, se estudió si *CASP1* humana recombinante podía escindir GATA1 humana *in vitro*. Los resultados mostraron que *CASP1* recombinante escindía GATA1 generando fragmentos proteolíticos N y C-terminales de aproximadamente 30 y 15 kDa, respectivamente. La escisión de *CASP1* de GATA1 en los residuos D276 y/o D300 puede generar los fragmentos obtenidos, por lo que se generan mutantes de *CASP1* individuales y dobles (D276A y D300A) y se encontró que *CASP1* sólo podía escindir GATA1 en el residuo D300. En conjunto, todos estos resultados desvelan un papel novedoso, conservado a nivel evolutivo del inflamasoma en la regulación de la decisión del destino eritroide/mieloide y diferenciación eritroide terminal por medio de escisión de GATA1.

### *La inhibición farmacológica del inflamasoma rescata modelos de pez cebra y ratón de inflamación neutrófila y anemia*

El sesgo de linaje hematopoyético está asociado a enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer y envejecimiento (Elias *et al.*, 2017; Marzano *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2014). La dermatosis neutrófila es un grupo de enfermedades caracterizadas por la

acumulación de neutrófilos en la piel (Marzano *et al.*, 2018). Se usó un mutante de pez cebra Spint1a como modelo de dermatosis neutrófila, ya que se caracteriza por fuerte infiltración de neutrófilos en la piel (Carney *et al.*, 2007; Mathias *et al.*, 2007). Se encontró que las larvas deficientes en Spint1a tenían actividad de caspasa-1  
5 aumentada (figura 8a) y razón de *spi1/gata1* alterada (figura 8b). De manera notable, aunque la inhibición farmacológica de caspasa-1 no pudo rescatar la infiltración cutánea de neutrófilos de animales deficientes en Spint1a (figura 8c, 8e), pudo rescatar su neutrofilia robusta (figura 8d, 8e).

10 A continuación se realizó el modelo de anemia de Diamond-Blackfan, una ribosomopatía provocada por la traducción ineficaz de GATA1 (Danilova y Gazda, 2015), en larvas de pez cebra reduciendo los niveles de GATA1 usando un morfolino específico. Se valoró en primer lugar el morfolino y se encontró que 1,7 ng/huevo dio como resultado larvas con anemia leve, moderada y grave (figura 8f), mientras que  
15 0,85 ng/huevo y 3,4 ng/huevo tuvieron pocos efectos o drásticos, respectivamente. Por tanto, se examinó si la inhibición farmacológica de caspasa-1 podía rescatar alteraciones de hemoglobina de larvas deficientes en Gata1. Los resultados muestran que el tratamiento de larvas durante 24 h con el inhibidor de caspasa-1 reversible Ac-YVAD-CHO rescató parcialmente los defectos de hemoglobina en  
20 larvas deficientes en Gata1 y niveles de proteína de Spi1/Gata1 (figura 8g, 8h). Estos resultados en conjunto demuestran que la inhibición farmacológica de caspasa-1 rescata sesgo de linaje hematopoyético *in vivo*.

Para confirmar además los resultados anteriores en otro modelo preclínico, se  
25 extirpó parcialmente HSC en ratones con 5-fluorouracilo (5-FU) (Coppin *et al.*, 2016) y después se examinaron los efectos de la inhibición farmacológica de caspasa-1 sobre la recuperación de células sanguíneas (figura 9a). Dos únicas inyecciones a los 6 y 7 días tras la inyección de 5-FU del inhibidor de caspasa-1 irreversible Ac-YVAD-CMK (10 mg/Kg) pudieron rescatar la anemia inducida por 5-FU a los 10 días,  
30 evaluada como recuento de eritrocitos y niveles de hemoglobina y hematocrito (figura 9b-d). Sin embargo, los ratones tratados con vehículo se recuperaron de la anemia mucho después (14 d tras el tratamiento con 5-FU) (figura 9b-d). De manera notable, los recuentos de plaquetas (figura 9e) y de glóbulos blancos totales (figura 9f) no estaban afectados por la inhibición de CASP1. Estos resultados demuestran

que la inhibición farmacológica de caspasa-1 rescata anemia inducida por quimioterapia en modelos de ratón.

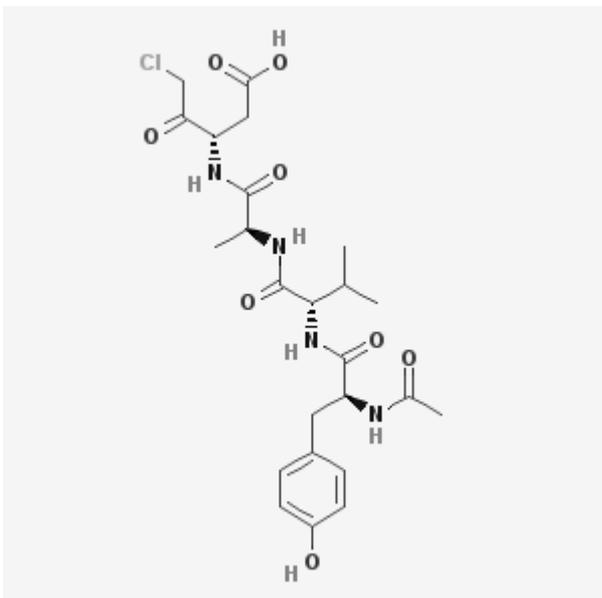
## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende al menos un inhibidor de caspasa-1 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en anemia asociada a enfermedades crónicas, anemia inducida por quimioterapia y anemia de Diamond-Blackfan.

2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa 1 tiene el motivo: X o X—W, en donde X es una estructura selectiva de caspasa-1 en relación con otras cisteína proteasas, en la que la selectividad de un sustrato para una caspasa se determina mediante ensayos bioquímicos y basados en células en enzimas relacionadas, y

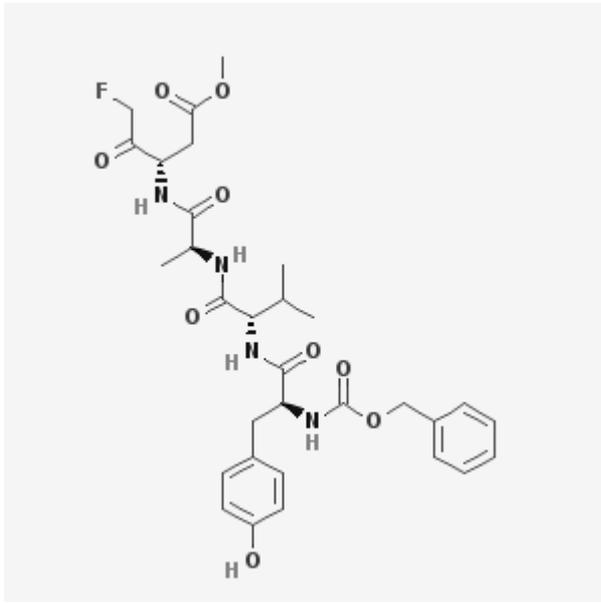
en la que W representa un resto químico que comprende —NH—CH(Y)(Z), en donde la ojiva electrófila modifica de manera reversible la caspasa de modo que la caspasa no puede interaccionar con ni escindir un sustrato de caspasa, en donde Y es una estructura que permite que el compuesto inhibidor forme un enlace covalente reversible con una caspasa-1, y en donde Z es un resto carboxilo o un mimético de ácido carboxílico.

3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es ac-YVAD-CMK, que comprende la siguiente estructura química:



o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

4. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es z-YVAD-FMK, que comprende la siguiente estructura química:

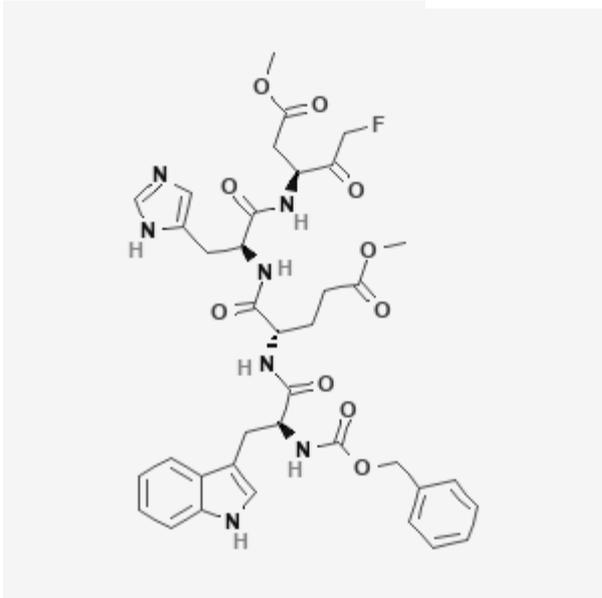


5

o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

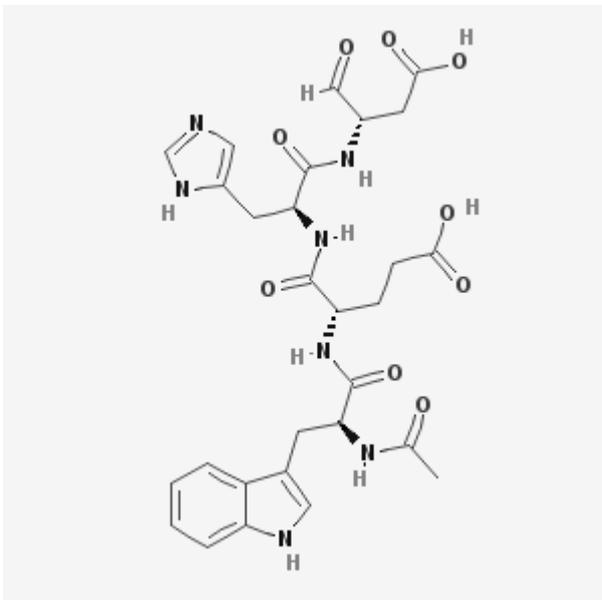
5. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es z-WEHD-FMK, que comprende la siguiente estructura química:

10



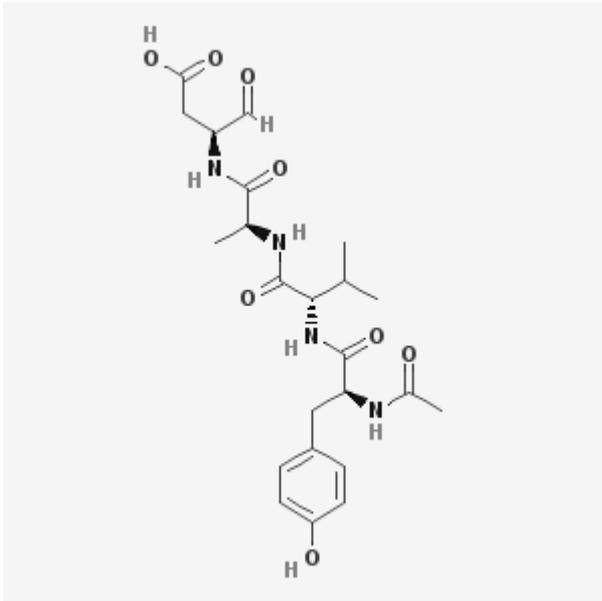
o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

6. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es z-WEHD-CHO, que comprende la siguiente estructura química:



10 o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

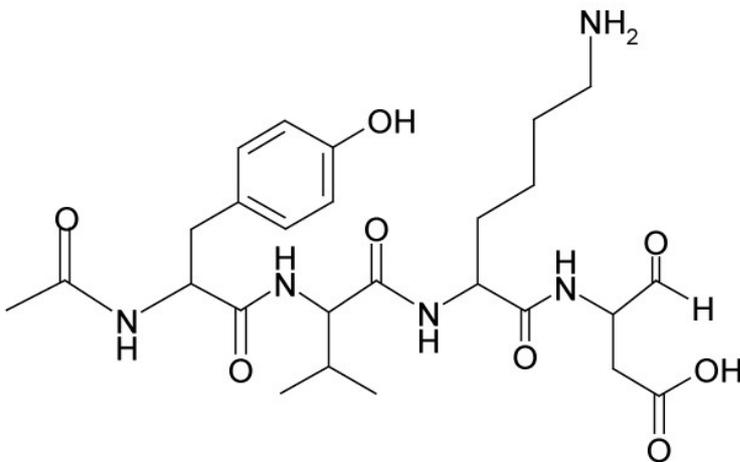
7. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es Ac-YVAD-CHO, que comprende la siguiente estructura química:



o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

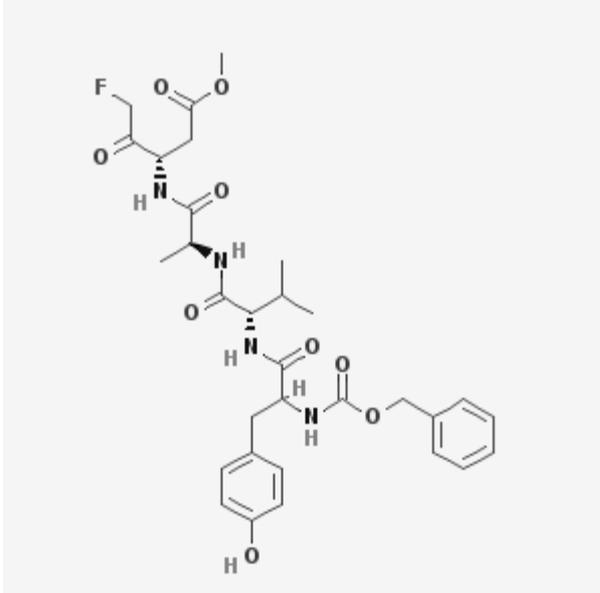
5

8. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es ac-YVKD-CHO, que comprende la siguiente estructura química:



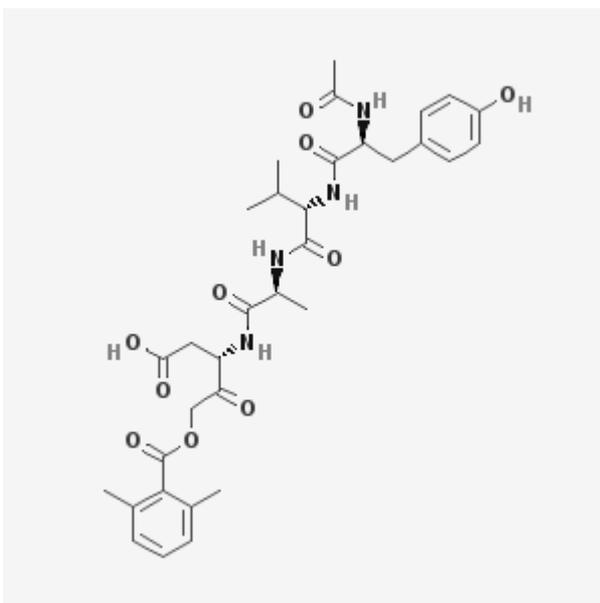
10 o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

9. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es Ac-YVAD-FMK, que comprende la siguiente estructura química:



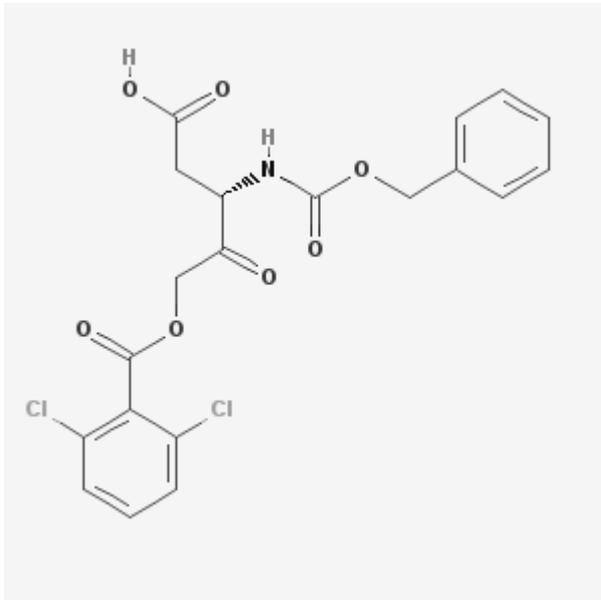
- 5 o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

10. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es Ac-YVAD-AOM, que comprende la siguiente estructura química:



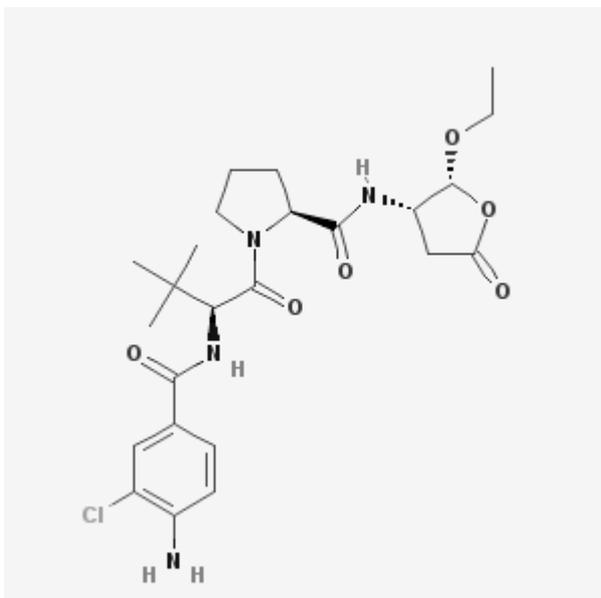
- 10 o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

11. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es Z-D-CH2-DCB, que comprende la siguiente estructura química:



5 o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

12. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de caspasa-1 es VX-765, que comprende la siguiente estructura química:



o cualquier sal del mismo o cualquier forma estereoisomérica.

- 5 13. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición es una composición farmacéutica preparada para la administración a un sujeto, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

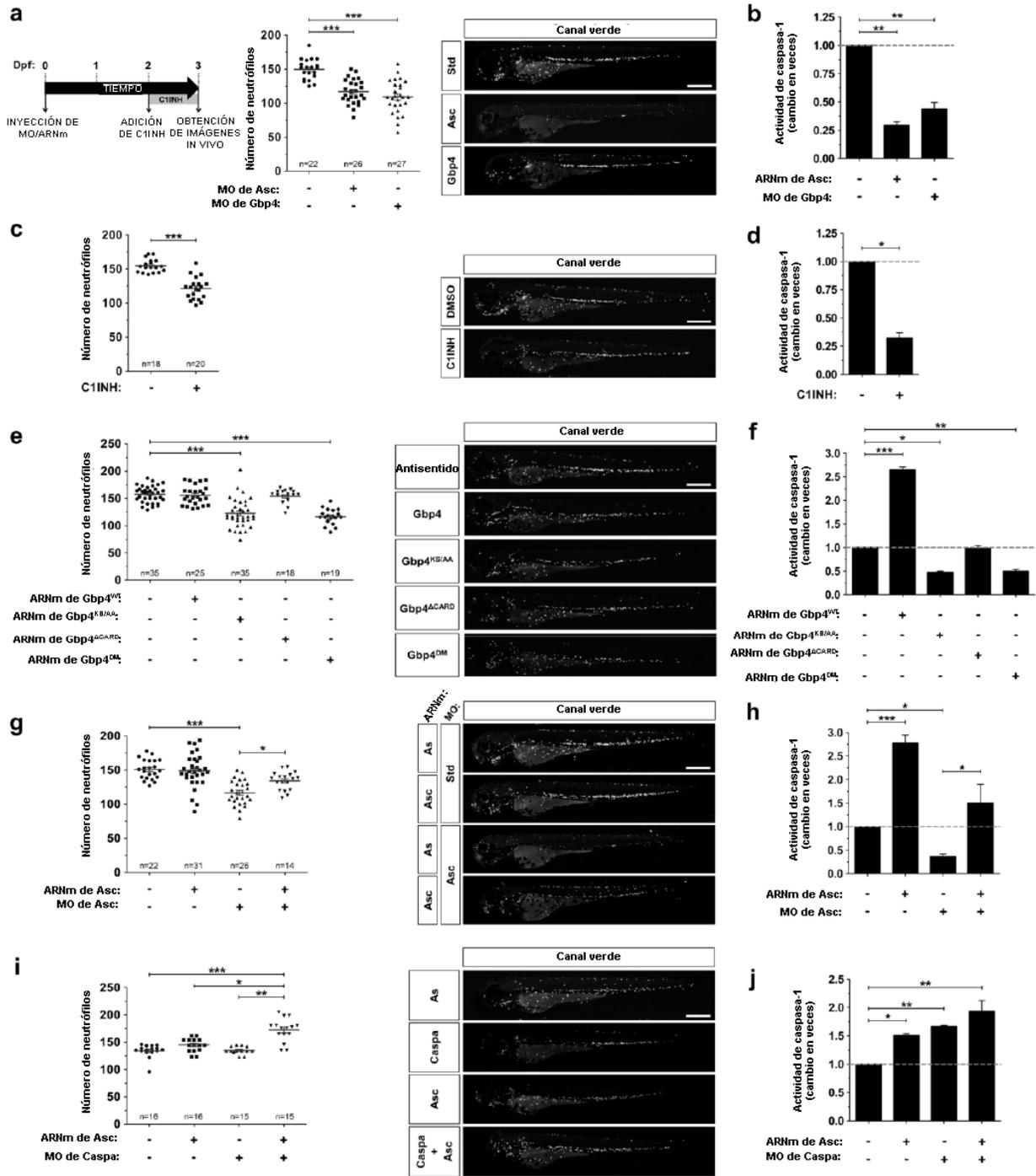


Fig. 1

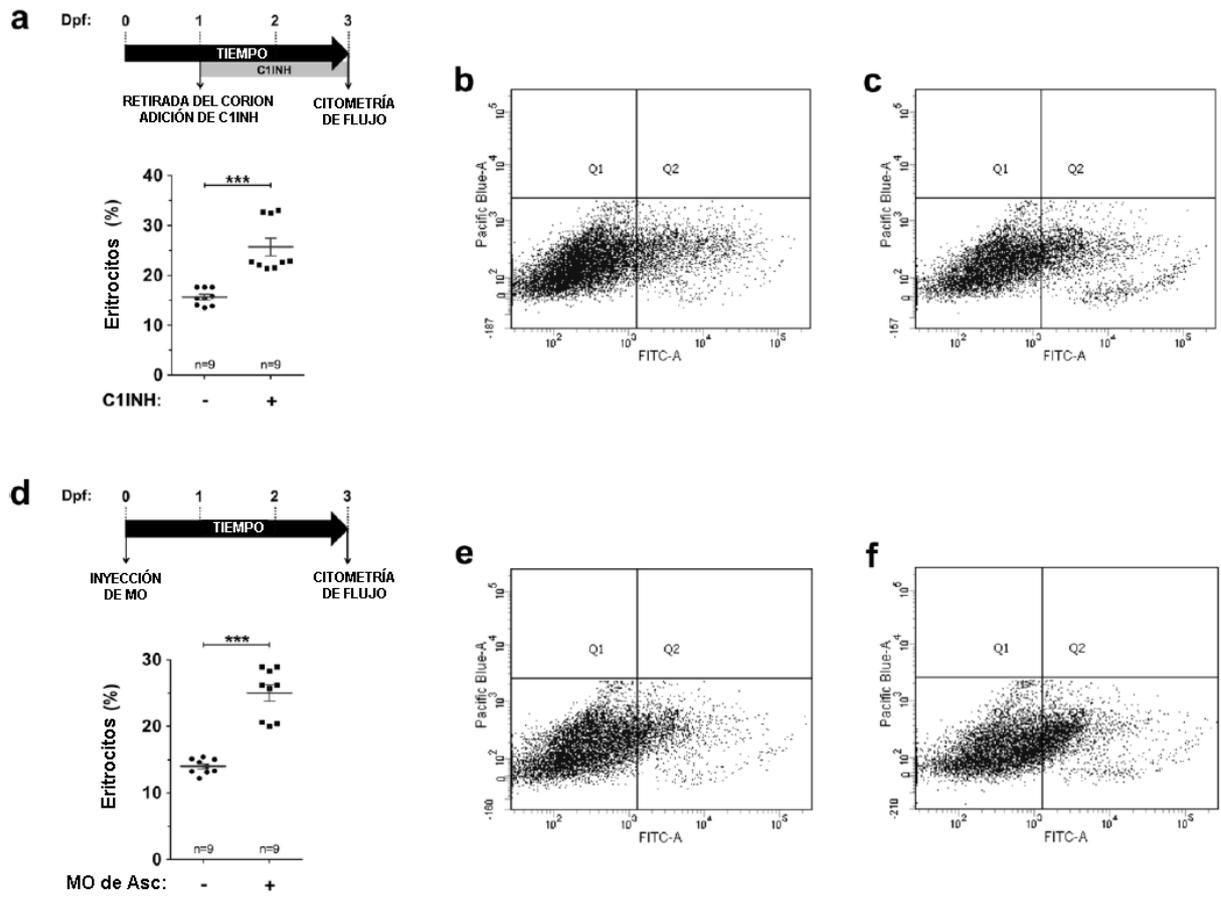


Fig. 2

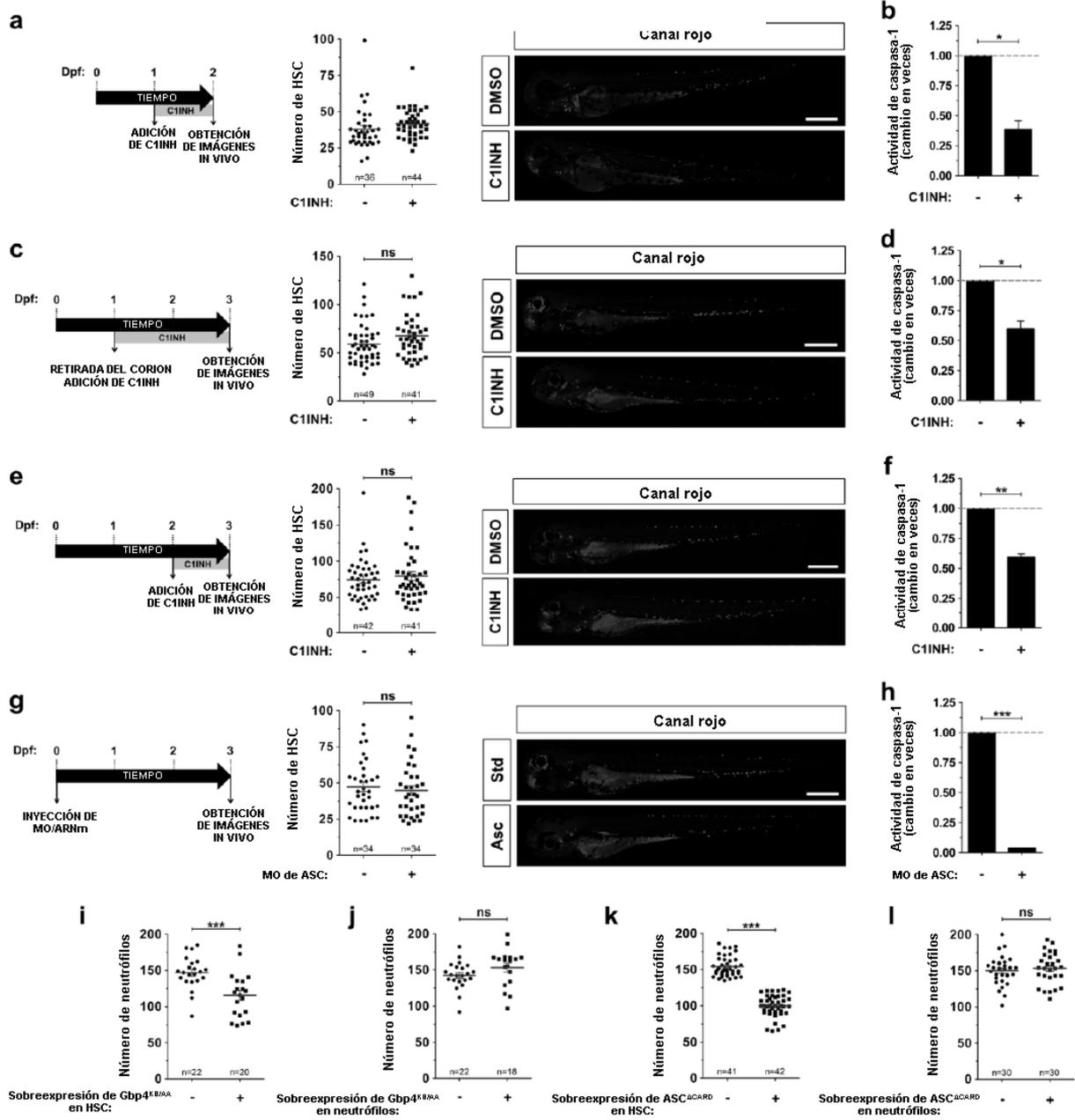


Fig. 3

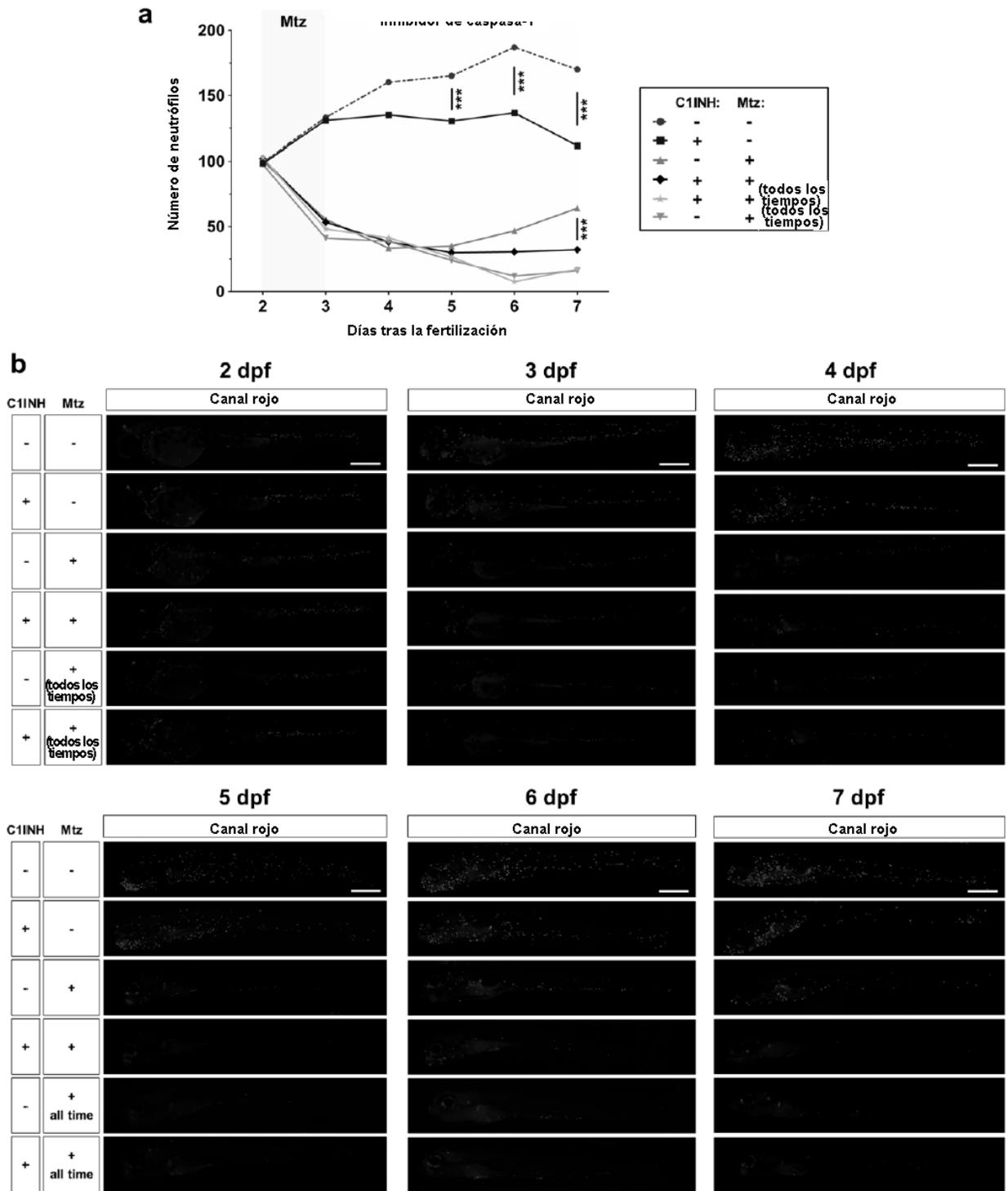


Fig. 4

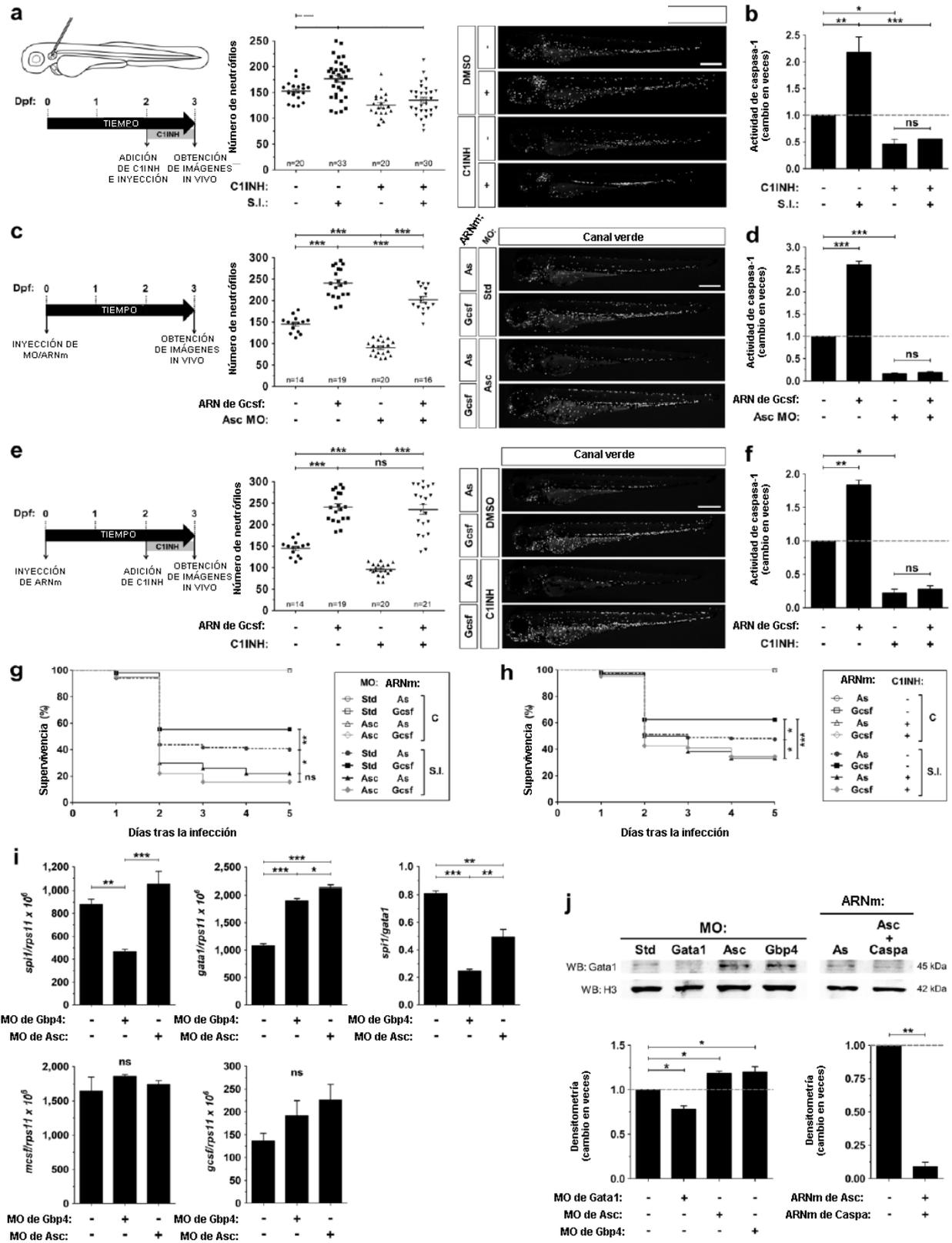
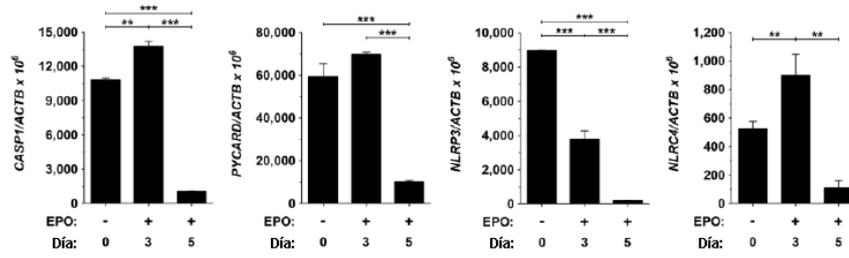
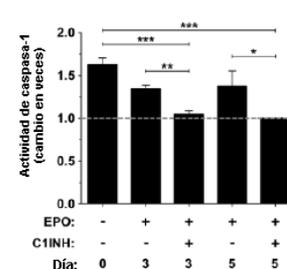


Fig. 5

**a: Componentes de inflammasoma**



**b: Actividad de caspasa-1**



**c: Marcadores de diferenciación**

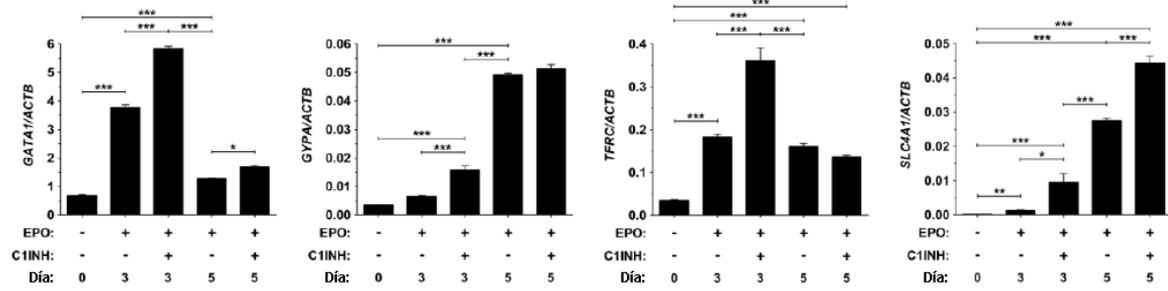


Fig. 6

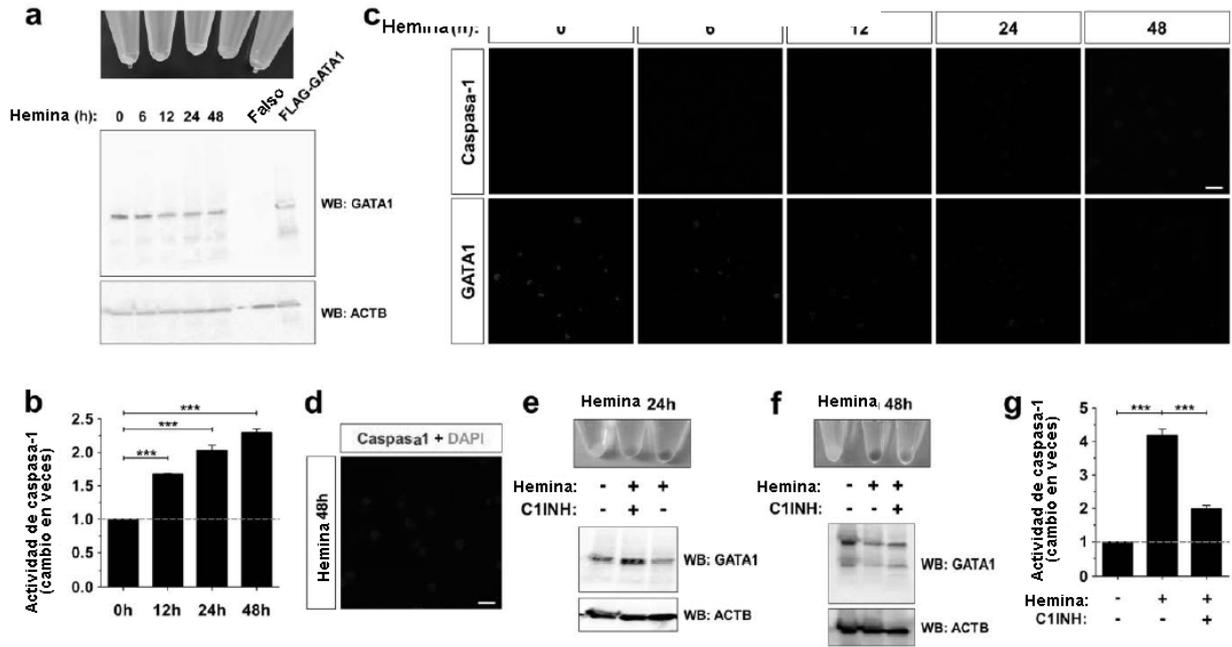


Fig. 7

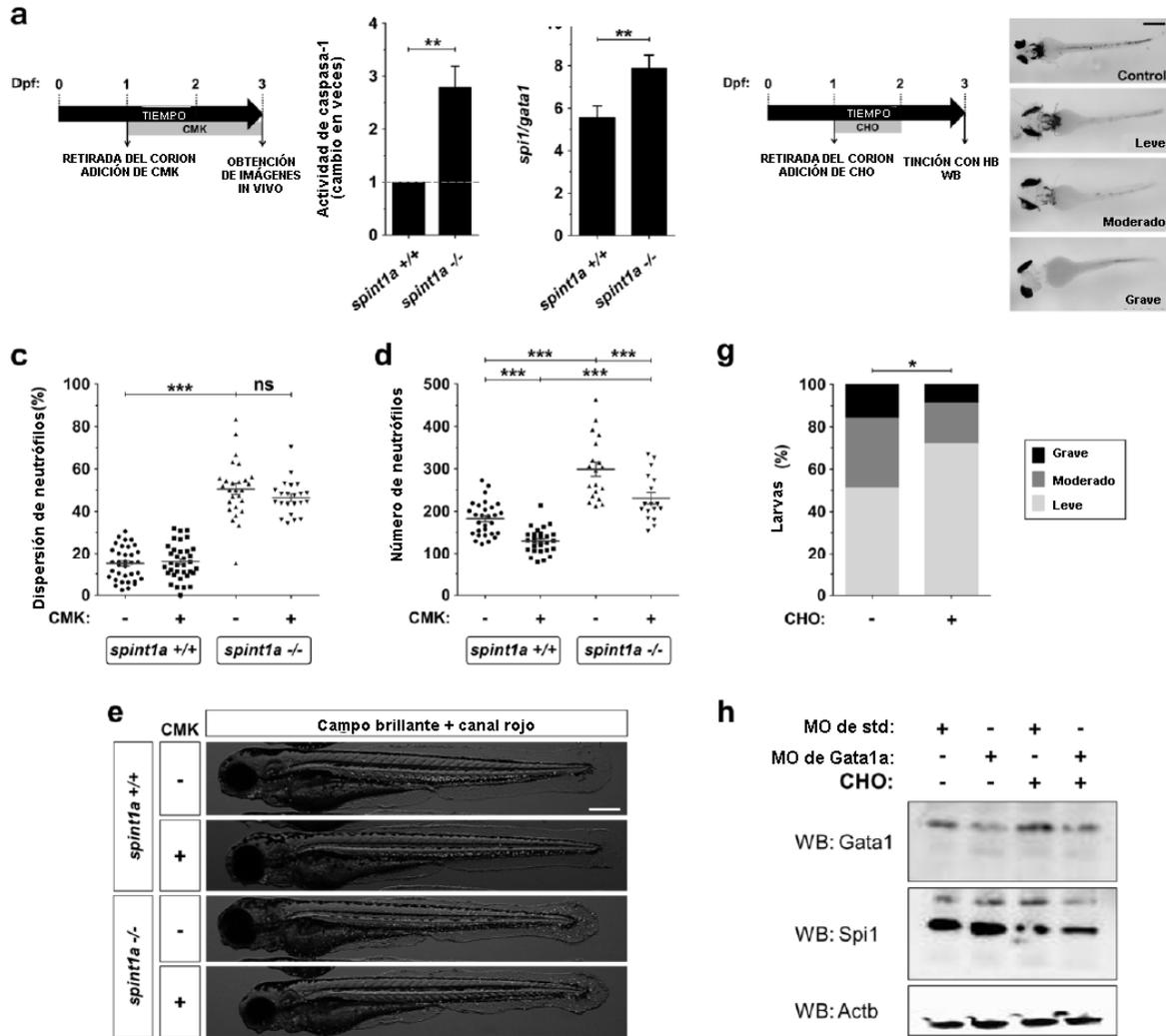


Fig. 8

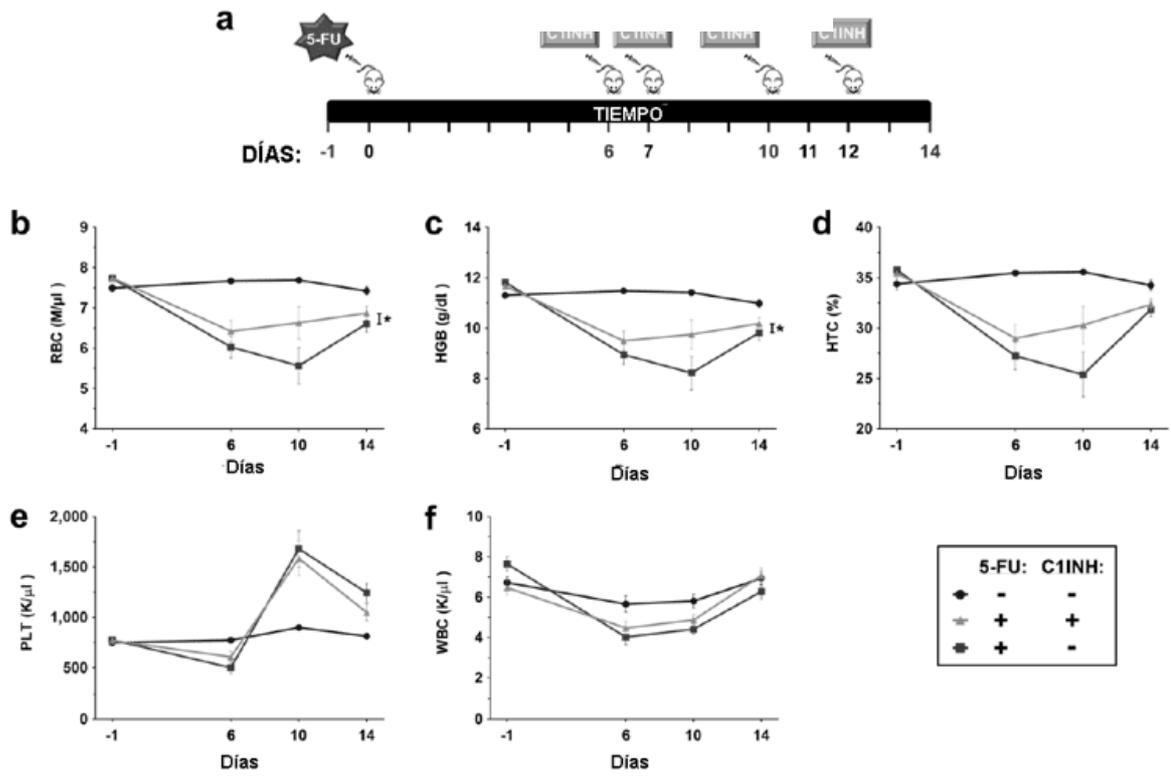


Fig. 9

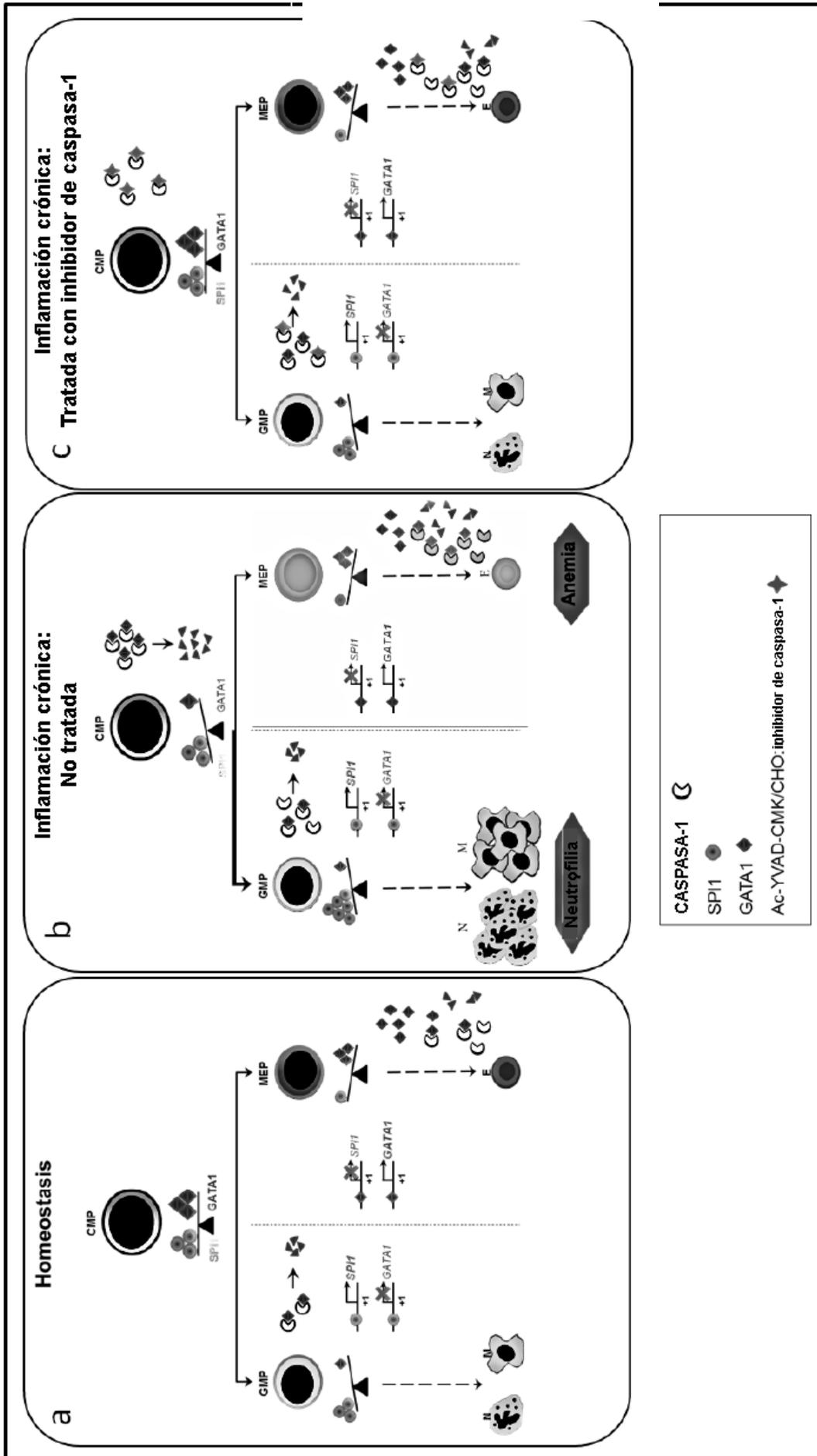


Fig. 10

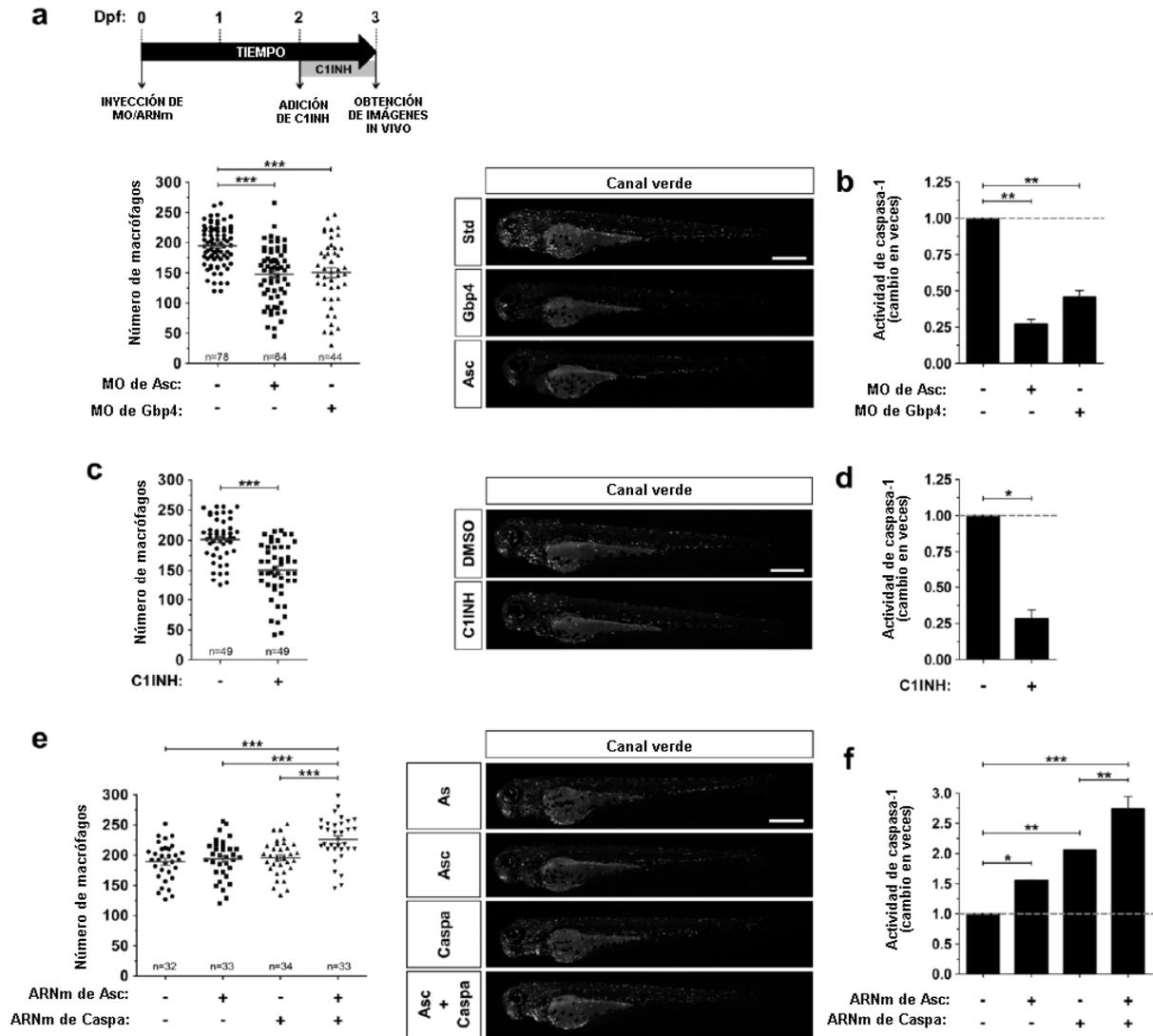


Fig. 11

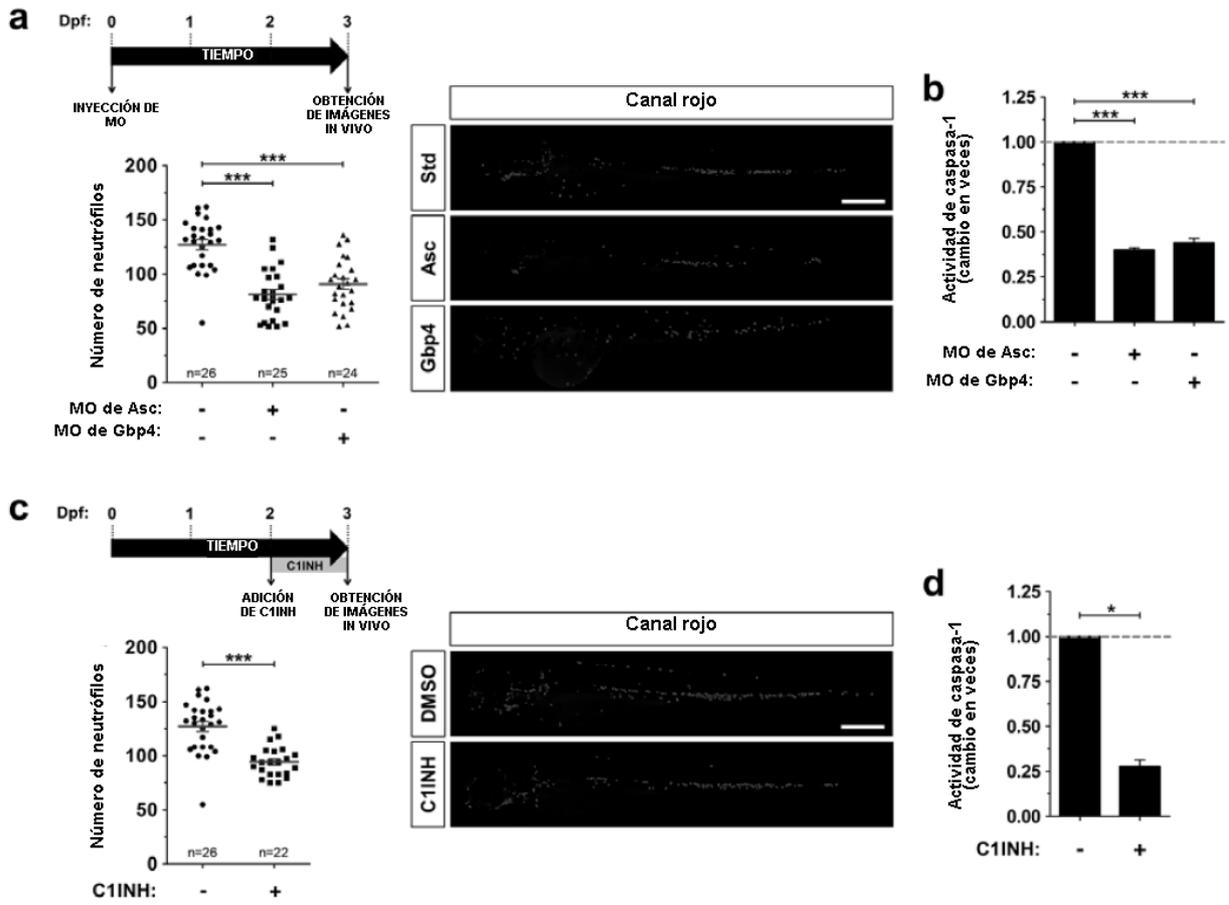


Fig. 12

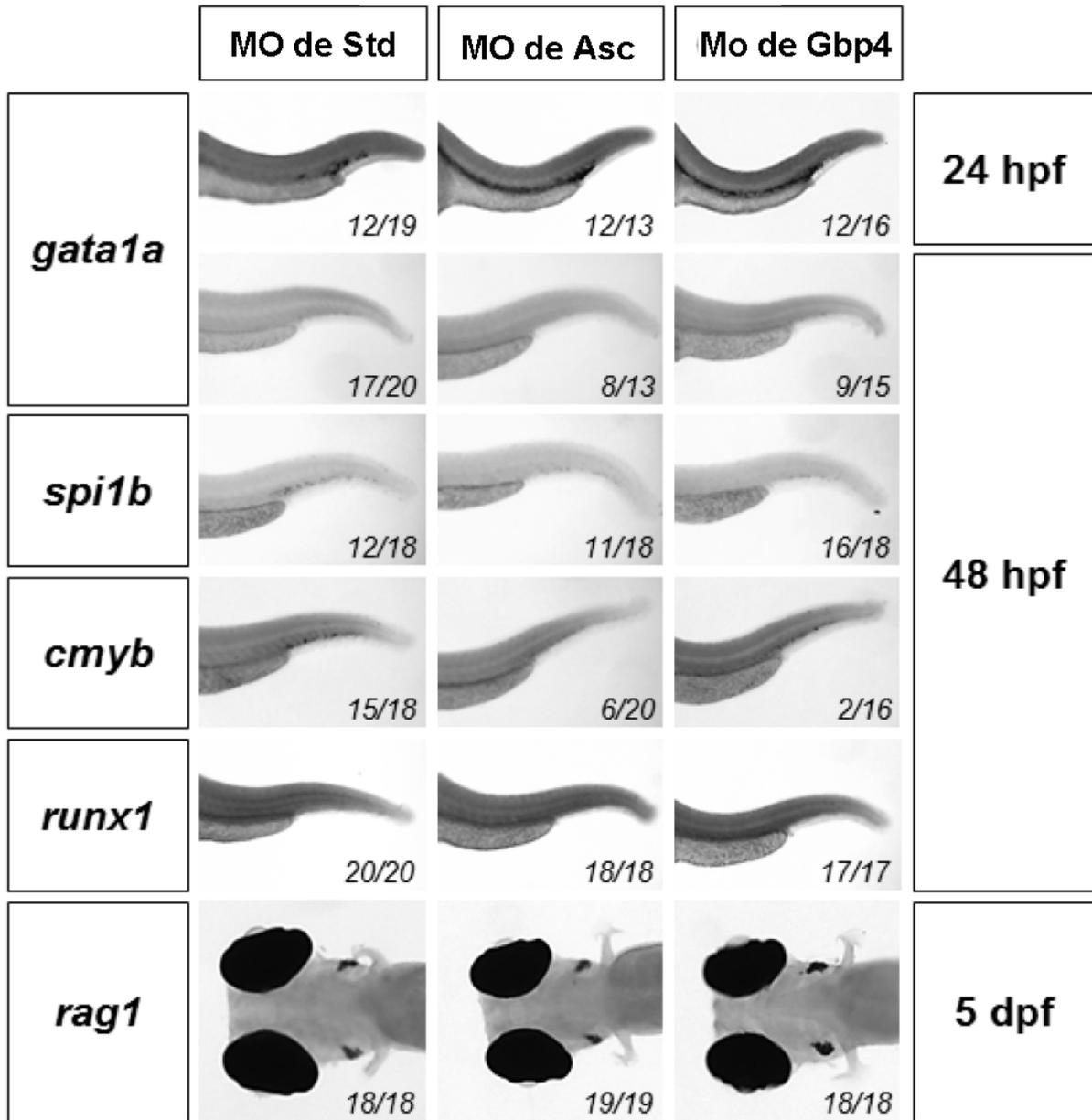


Fig. 13

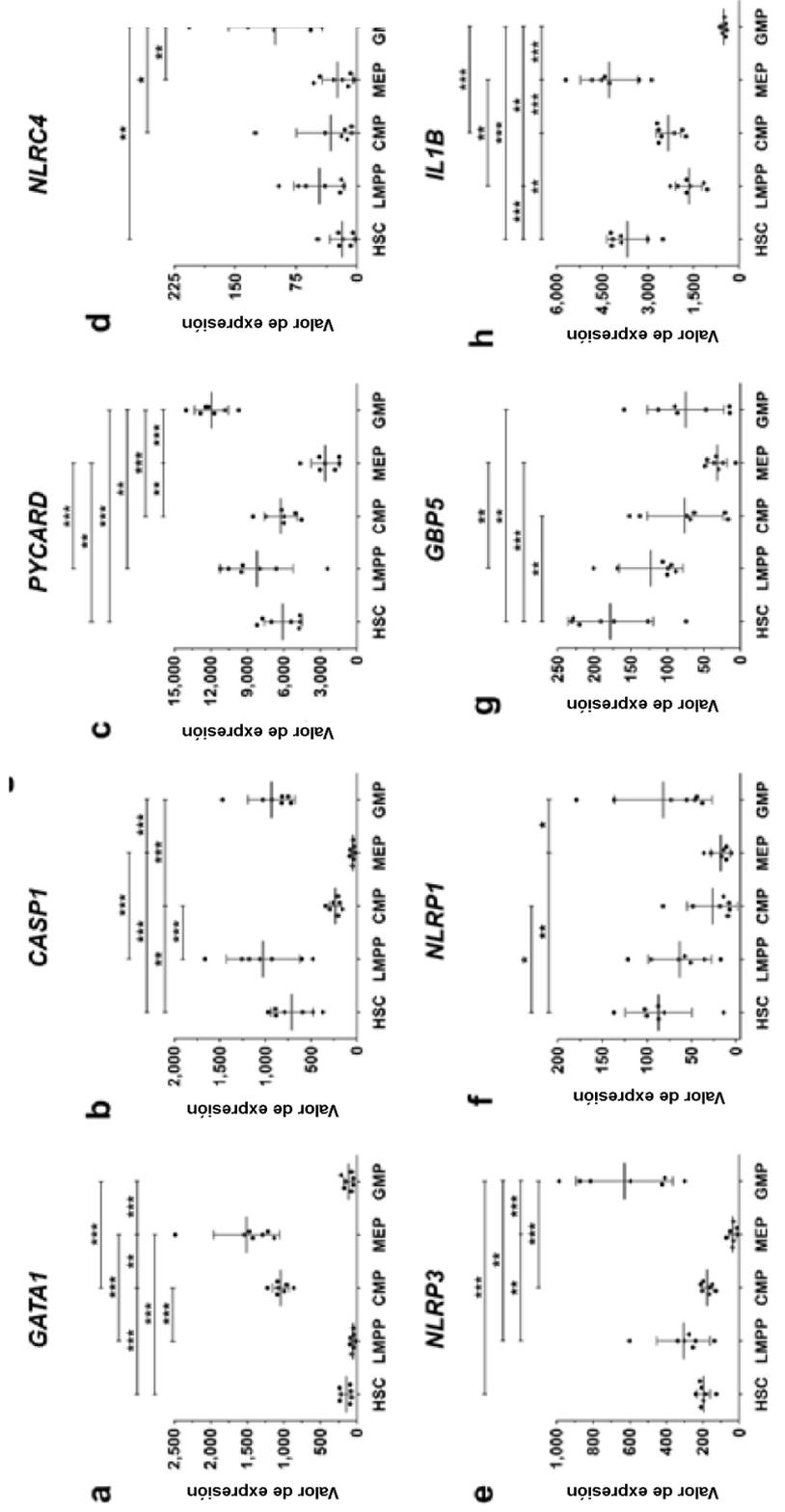


Fig. 14

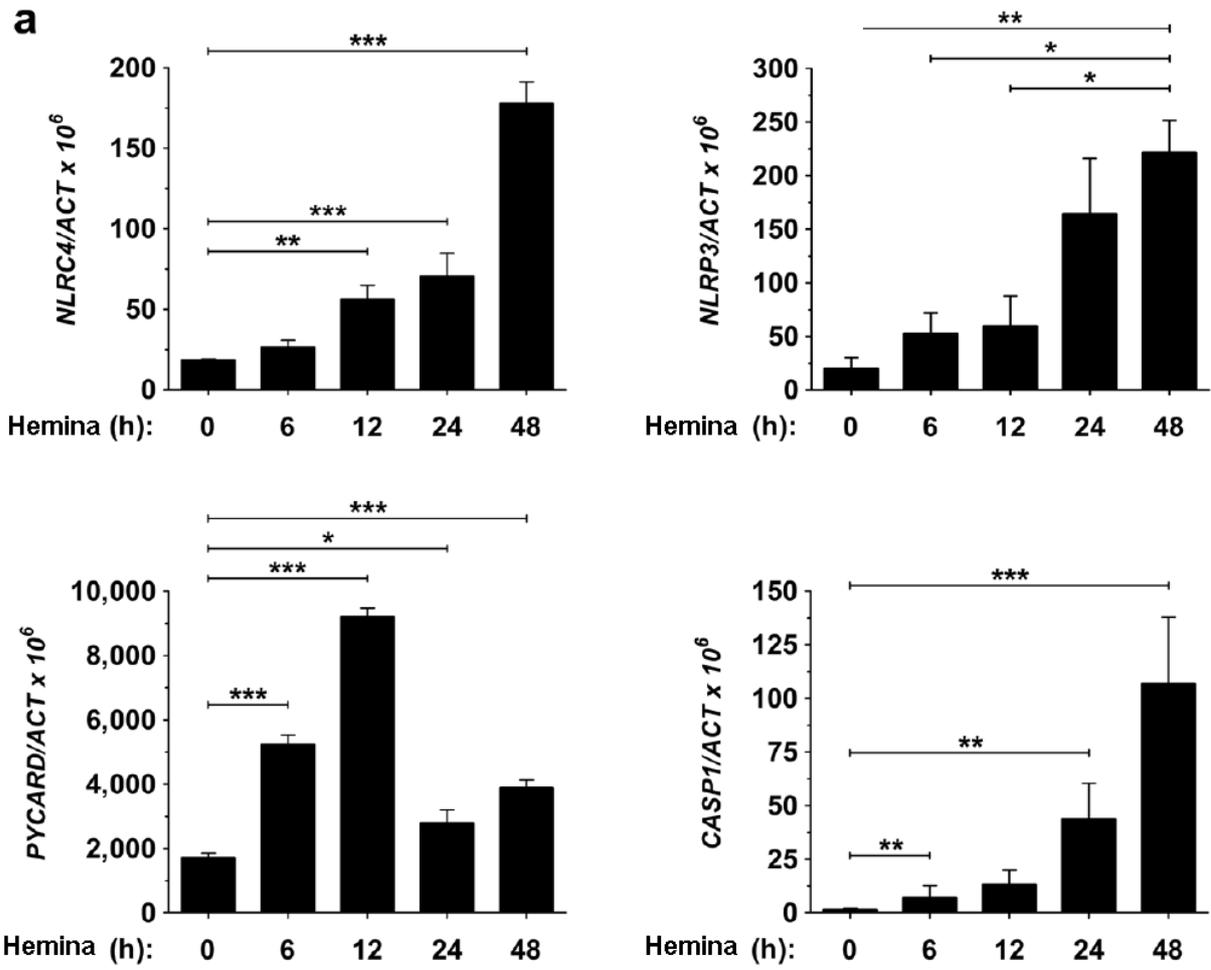


Fig. 15

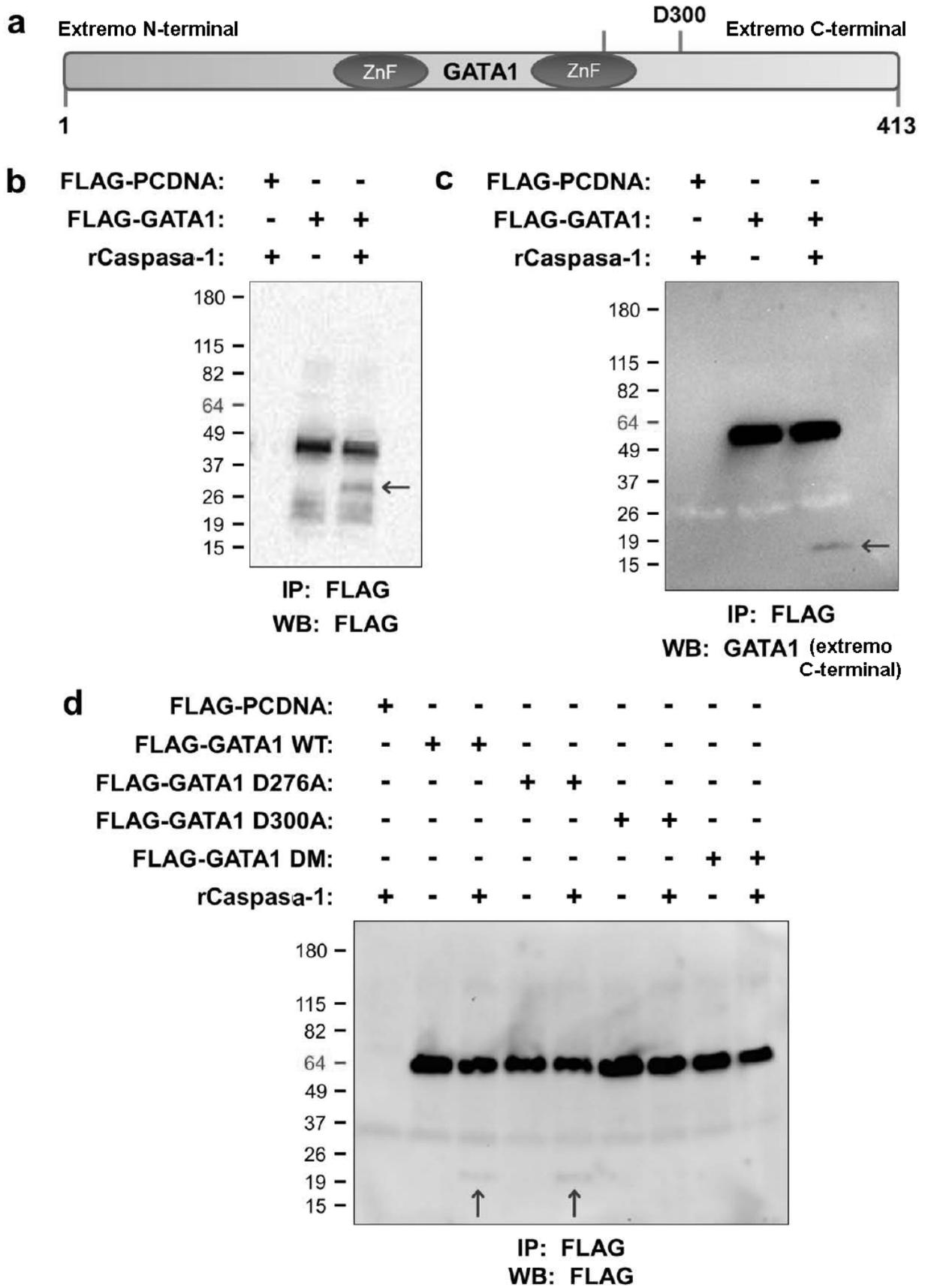


Fig. 16