

MÉTODO PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE INFLAMASOMA E INFLAMACIÓN EN EL PULMÓN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisional de E.U.A. No. de Serie 62/440,180, presentada el 29 de Diciembre de 2016, que se incorpora en la presente a manera de referencia en su totalidad para todos los propósitos.

DECLARACIÓN SOBRE EL PATROCINIO DEL GOBIERNO EFEDERAL PARA ESTA INVESTIGACIÓN

10

El presente invento fue realizado con el apoyo del gobierno de Estados Unidos bajo el Número de concesión 4R42BS086274-02 otorgado por el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cardiovasculares (NINDS). El gobierno de Estados Unidos tiene derechos sobre el invento.

15

DESCRIPCIÓN DEL ARCHIVO DE TEXTO PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

- Por la presente se incorpora en su totalidad el contenido del archivo de texto enviado electrónicamente con referencia: Una copia en formato legible de la Lista de Secuencias (nombre del archivo: UNMI_010_01WO_SerList_ST25.txt, fecha de registro: 28 de diciembre de 2017, tamaño del archivo 2 kilobytes).

20

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- La invención se refiere en general a los campos de inmunología y medicina de manera más particular, la invención se refiere a composiciones y métodos para modular la actividad ASC (Proteína similar a Speck asociada a apoptosis que contiene un Dominio de Reclutamiento de Activación de Caspasa (CARD)) y Ausente en la actividad inflamatoria de Melanoma 2 (AIM2) en los pulmones de un mamífero como tratamientos para reducir la inflamación en respuesta a las afecciones que producen inflamación en los pulmones.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 30 La Lesión Cerebral Traumática Grave (TBI) es una de las principales preocupaciones de salud pública y es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (3). Además de la lesión directa al cerebro, la TBI puede conducir a complicaciones en otros órganos, tal como los pulmones. Lesión Pulmonar Aguda (ALI; 2) es un problema cardiopulmonar común después del traumatismo y se asocia con una tasa de mortalidad hospitalaria de hasta 40% (4). Los pacientes con TBI, en particular, son susceptibles a desarrollar ALI, con algunos estudios que reportan una incidencia tan alta como 30% (5). Estudios recientes han mostrado que los factores inflamatorios sistémicos pueden conducir a

35

disfunción pulmonar y lesión pulmonar después de TBI (6), pero el mecanismo molecular preciso que subyace a la lesión molecular inducida por TBI sigue siendo deficientemente definida.

Una avalancha de mediadores inflamatorios secretados, incluyendo citoquinas, quimiocinas, y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) liberados por las células lesionadas contribuyen a inflamación cerebral y afectan los órganos distales tal como los pulmones (5). Uno de los DAMPs más ampliamente estudiado es la caja box-1 de grupo de movilidad alta (HMGB1), que puede servir como un mediador temprano de inflamación en varios estados patogénicos, incluyendo TBI (7). Un estudio más reciente ha mostrado que HMGB1 se puede implicar en el mecanismo de disfunción pulmonar inducida por TBI (8). La liberación de HMGB1 se puede regular por el inflamasoma (9), un complejo multi-proteína implicado en la activación de la caspasa 1 y el procesamiento de IL-1 β e IL-18 después de TBI (10).

Se han presentado diversas explicaciones para explicar los patomecanismos de complicaciones pulmonares después de la TBI, incluyendo permeabilidad vascular incrementada que conduce a fuga capilar e infiltración de restos proteínicos (11). Las vesículas extracelulares (EV) son vesículas contenidas en la membrana que desempeñan una función en la comunicación de célula a célula (12) y se han implicado que desempeñan una función en el desarrollo de ALI en un modelo de murino inducido por LPS. Además, se ha mostrado que la EV puede llevar citoquinas reactivas tal como IL-1 β y proteínas de inflamasoma (13) (14), y pueden desencadenar una respuesta inmune y amplificar la inflamación a través de su carga a las células vecinas y circundantes. Sin embargo, tampoco se sabe si la señalización de inflamasoma mediada por EV puede contribuir al fotomecanismo de ALI inducida por TBI. Además, tampoco se sabe si los patomecanismos de la ALI inducida por TBI son compartidos por otras afecciones que producen inflamación pulmonar. Además, existe una escases de fármacos aprobados por la Administración de Fármacos Federal (FDA) para tratar inflamación pulmonar.

Por consiguiente, existe una necesidad urgente no solo para dilucidar los patomecanismos de inflamación pulmonar provocada por TBI así como otras afecciones, sino también el desarrollo de composiciones terapéuticas y usos de las mismas para tratar y/o prevenir la inflamación pulmonar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar inflamación en los pulmones de un paciente en necesidad del mismo, el método comprende: administrar al paciente una composición que comprende un agente que inhibe la señalización de inflamasoma, mediante el cual se trata la inflamación en los pulmones del paciente. En algunos casos, la inflamación en los pulmones es provocada por una afección seleccionada

de una lesión del sistema nervioso central (CNS), una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad autoinmunitaria, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial y síndrome de dificultad respiratoria aguda. En algunos casos, la lesión del CNS se selecciona del grupo que consiste de lesión cerebral traumática (TBI), apoplejía y lesión de la médula espinal (SCI). En algunos casos, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste de esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple (MS) y más de Parkinson (PD). En algunos casos, la administración de la composición da por resultado la inhibición de la activación de inflammasoma en las células pulmonares del paciente. En algunos casos, la administración de la composición da por resultado una reducción de caspasa-1, proteína 1 que contiene el dominio de pirina de repetición rico en leucina de enlace a nucleótido (NLRP1), proteína 2 que contiene el dominio de pirina de repetición rico en leucina de enlace a nucleótido (NLRP2), proteína 3 que contiene el dominio de pirina de repetición rico en leucina de enlace a nucleótido (NLRP3), proteína 4 que contiene el dominio CARD de la familia NLR (NLRC4), caspasa-II, inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis (XIAP), panexina-1, proteína similar a Spec asociada a apoptosis que contiene un Dominio de Reclutamiento de Activación de Caspasa (ASC), interleucina-18 (IL-18), caja 1 del grupo de movilidad alta (HMGB1) o niveles de ausente en el melanoma 2 (AIM2) en las células pulmonares del paciente como es comparado con un control, en donde el control es un paciente no tratado. En algunos casos, las células pulmonares son células alveolares Tipo II. En algunos casos, la administración de la composición da por resultado una reducción en la lesión pulmonar aguda (ALI) como es comparado con un control, en donde el control es un paciente no tratado. En algunos casos, la reducción en la ALI es evidenciada por una reducción en la infiltración de neutrófilos en el espacio alveolar e/o intersticial, engrosamiento septal alveolar reducido o ausente o una combinación de los mismos. En algunos casos, el agente es un inhibidor de captación de vesícula extracelular (EV), un anticuerpo que se enlaza a un componente de inflammasoma o una combinación del mismo. En algunos casos, el inhibidor de captación de EV es un compuesto o un anticuerpo, en donde el anticuerpo se selecciona de la Tabla 1. En algunos casos, el agente es un inhibidor de la captación de EV en combinación con un anticuerpo que se enlaza a un componente de inflammasoma. En algunos casos, el inhibidor de captación de EV es una heparina. En algunos casos, la heparina es una Enoxaparina. En algunos casos, el anticuerpo que se enlaza a un componente de inflammasoma es un anticuerpo que se enlaza específicamente a un componente de un inflammasoma AIM2, NLRP1, NLRP2, NLRP3 o NLRC4 de mamífero. En algunos casos, el componente de inflammasoma es caspasa-1, ASC o AIM2. En algunos casos, el componente de inflammasoma es ASC. En algunos casos, el anticuerpo se enlaza a un dominio PYRIN-PAAD-DAPIN N-terminal (PYD), dominio de reclutamiento de caspasa C-terminal (CARD) o un epítipo derivado del dominio PYD o CARD

de la proteína ASC. En algunos casos, el anticuerpo se enlaza a una proteína que tiene al menos 85% de entidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la actividad de ASC en los pulmones del paciente. En algunos casos, la composición se formula con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la composición se administra intracerebroventricularmente, intraperitonealmente, intravenosamente o por inhalación.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar inflamación en los pulmones de un paciente que se ha sometido a una lesión del sistema nervioso central (CNS), el método comprende: administrar al paciente una composición que comprende un agente que inhibe la señalización de inflamasoma, mediante el cual se trata la inflamación en los pulmones del paciente. En algunos casos, la lesión del CNS se selecciona del grupo que consiste de lesión cerebral traumática (TBI), apoplejía y lesión de la médula espinal (SCI). En algunos casos, la administración de la composición da por resultado la inhibición de la activación de inflamasoma en las células pulmonares del paciente. En algunos casos, la administración de la composición da por resultado una reducción de caspasa-1, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, caspasa-11, XIAP, panexina-1, proteína similar a Spec asociada a Apoptosis que contiene un Domino de Reclutamiento de Activación de Caspasa (ASC), interleucina-18 (IL-18), caja 1 del grupo de movilidad alta (HMGB1) o niveles ausentes en el melanoma 2 (AIM2) en las células pulmonares de los pacientes como es comparado con un control, en donde el control es un paciente no tratado. En algunos casos, las células pulmonares son células alveolares Tipo II. En algunos casos, la administración de la composición da por resultado una reducción en la lesión pulmonar aguda (ALI) como es comparada con un control, en donde el control es un paciente no tratado. En algunos casos, la reducción en ALI es evidenciada por una reducción en la infiltración de neutrófilos en el espacio alveolar e/o intersticial, engrosamiento septal alveolar reducido o ausente o una combinación de los mismos. En algunos casos, el agente es un inhibidor de captación de vesícula extracelular (EV), un anticuerpo que se enlaza a un componente de inflamasoma o una combinación de los mismos. En algunos casos, el inhibidor de captación de EV es un compuesto o un anticuerpo, en donde el anticuerpo se selecciona de la Tabla 1. En algunos casos, el agente es un inhibidor de captación de EV en combinación con un anticuerpo que se enlaza a un componente de inflamasoma. En algunos casos, el inhibidor de captación de EV es una heparina. En algunos casos, la heparina es Enoxaparina. En algunos casos, el anticuerpo que se enlaza a un componente de inflamasoma es un anticuerpo que se enlaza específicamente a un componente de un inflamasoma AIM2, NLRP1, NLRP2, NLRP3 o NLRC4 de mamífero. En algunos casos, el componente de inflamasoma es caspasa-1, ASC o AIM2. En algunos casos, el componente de inflamasoma es ASC. En algunos casos, el

anticuerpo se enlaza al dominio PYD, CARD o un epítopo derivado del dominio PYD o CARD de la proteína ASC. En algunos casos, el anticuerpo se enlaza a una proteína que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En algunos casos, el anticuerpo inhibe la actividad de ASC en los pulmones del paciente. En algunos casos, la composición se formula con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la composición se administra intracerebroventricularmente, intraperitonealmente, intravenosamente o por inhalación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Las FIGURAS 1A-1N ilustran la activación de inflammasoma en el tejido cortical y pulmonar de ratón C57/BL6 post-TBI. La FIGURA 1A muestra una inmunotinción representativa de caspasa-1 activa, ASC, IL-18, IL- β , HMGB1, y AIM2 después de TBI. La caspasa-1 activa (FIGURA 1B), ASC (FIGURA 1C), IL-18 (FIGURA 1D), HMGB1 (FIGURA 1E), AIM 2 (FIGURA 1F), e IL- β , (FIGURA 1G), se elevan significativamente en el tejido cortical a 4 y 24h post-TBI. Datos presentados como media $\pm$ SEM; **** p <0.001, *** p <0.01, p <0.05 en comparación con la simulación. N=4-5 por grupo. La FIGURA 1H muestra una inmunotinción representativa de la caspasa-1 activa, ASC, IL-18, IL- β , HMGB1, y AIM2 en el tejido pulmonar. I, J, K, L, M, N). La caspasa-1 activa (FIGURA 1I), ASC (FIGURA 1J), IL-18 (FIGURA 1K), HMGB1 (FIGURA 1L), ATM 2 (FIGURA 1M), e IL- β , (FIGURA 1N) se elevan significativamente en el tejido pulmonar 4 y 24h después de TBI. Datos presentados como media $\pm$ SEM. N= 4-5 por grupo, ** p <0.01., * p <0.05 comparados con la simulación.

Las FIGURAS 2A-2C ilustran la expresión de proteínas de inflammasoma en las células epiteliales alveolares Tipo II. La FIGURA 2A muestra AIM2, la FIGURA 2B muestra la Caspasa-1 activa y la FIGURA 2C muestra incrementos de inmunoreactividad de ASC en el tejido pulmonar después de CCI (4, 24 h) cuando se compara con los ratones. Imágenes confocales de AIM2, caspasa-1, y ASC (verde) y células epiteliales tipo II (proteína C surfactante, roja).

Las FIGURAS 3A-3E ilustran la TBI que incrementa la expresión de HMGB1 nuclear y citoplásmica en el pulmón de ratones. La FIGURA 3A muestra inmunotinción representativa de HMGB1 nuclear después de TBI. La FIGURA 3B muestra HMGB1 nuclear se eleva significativamente en animales lesionados durante 4 horas comparados con la simulación. La FIGURA 3C muestra inmunotinción representativa de HMGB1 citoplásmica después de TBI. La FIGURA 3D muestra que la HMGB1 citoplásmica se eleva significativamente en animales lesionados durante 4 horas comparados con la simulación. Datos presentados como media $\pm$ SEM; **** p <0.001, *** p <0.01, * p <0.05 con la simulación. N=4-5 por grupo. La FIGURA 3E muestra inmunoreactividad de HMGB1 incrementada en el tejido pulmonar después de CCI cuando se compara con los ratones falsos. Imágenes confocales de HMGB1 y células

epiteliales tipo II (proteína C surfactante, rojo).

Las FIGURAS 4A-4C ilustran la formación de Piroptosoma en pulmones de ratones 4 horas post-TBI. La FIGURA 4A muestra que la TBI induce la obtención de ASC en el tejido pulmonar, indicando la formación de piroptosoma, una oligomerización de dímeros ASC que conduce la activación de caspasa-1 y piroptosis. La FIGURA 4B muestra inmunotinción representativa y la FIGURA 4C muestra la cuantificación de gasdermina. La gasdermina-D se eleva significativamente en el tejido pulmonar post-TBI. Datos presentados como media $\pm$ SEM. N= 4-5 por grupo, ** $p < 0.01$., * $p < 0.05$ comparados con la simulación.

Las FIGURAS 5A-5B ilustran que la TBI induce cambios morfológicos alveolares y lesión pulmonar aguda en los ratones. La FIGURA 5A muestra la tinción de H&E de las secciones pulmonares de animales falsos y lesionados a 4 h y 24 h. Las secciones muestran evidencia de infiltración de neutrófilos (cabezas de flecha), cambios en la morfología de las membranas capilares alveolares (asterisco, *), edema intersticial (flechas cortas), y evidencia de engrosamiento de intersticio y septo alveolar (libra, #). La FIGURA 5B muestra que la puntuación de la lesión pulmonar aguda se incrementa significativamente en los animales lesionados cuando se compara con la simulación a 4 h y 24 h. Datos presentados como media $\pm$ SEM. N= 4-5 por grupo, ** $p < 0.01$., * $p < 0.05$ comparados con la simulación.

La FIGURA 6 ilustra la expresión de CD81 en EV derivada de suero de ratones de control y lesionados por TBI. Inmunotinción representativa de CD81 en la EV derivada de suero de ratones de control falsos y lesionados por TBI.

Las FIGURAS 7A-7H ilustran la transferencia adoptiva de EV de animales con TBI que inducen caspasa-1 y ASC en los pulmones de ratones no lesionados. La FIGURA 7A ilustra una inmunotinción representativa que muestra que la caspasa-1 (FIGURA 7B), ASC (FIGURA 7C), IL-18 (FIGURA 7D), AIM2 (FIGURA 7E), HMGB1 (FIGURA 7F) se elevan en los pulmones de los animales que recibieron EV aislada de ratones con TBI cuando se compararon con EV de animales falsos. Datos presentados como media $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ comparados con la simulación. N=3 por grupo. La EV de los ratones con TBI indujeron cambios morfológicos alveolares (tamaño alveolar reducido) e infiltración de células inflamatorias como es determinado por la tinción y H&E (FIGURA 7G). La puntuación ALI se incrementa significativamente en la EV suministrada de ratones lesionados comparados con los ratones no lesionados (FIGURA 7H). Datos presentados como media $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ comparado con el grupo no lesionado.

Las FIGURAS 8A-8F ilustran el tratamiento con Enoxaparina (3 mg/kg) e IC 100 (5 mg/kg) reduce la expresión de inflamasma en los pulmones de los animales suministrados con EV de ratones lesionados. La FIGURA 8A ilustra una inmunotinción representativa que muestra que la caspasa-1 (FIGURA 8B), ASC (FIGURA 8C), IL-1 β (FIGURA 8D), AIM2 (FIGURA 8E), HMGB1 (FIGURA 8F) se reducen en los pulmones de los animales que se

trataron con Enoxaparina e IC 100 cuando se compararon con los animales de control positivos no tratados. Datos presentados como media $\pm$ SEM; * $p < 0.05$ comparados con la simulación. N=4 por grupo.

Las FIGURAS 9A-9E ilustran el tratamiento con Enoxaparina (3 mg/kg) e IC 100 (5 mg/kg) reduce la puntuación de ALI en los pulmones de los animales suministrados con EV de ratones lesionados. Las FIGURAS 9A-9D ilustra la tinción H&E de las secciones de pulmones de ratones tratados con solución salina (FIGURA 9A), no tratados (FIGURA 9B), Enoxaparina (FIGURA 9C) e IC 100 (Anti-ASC; FIGURA 9D) suministrados con EV de los animales lesionados. Las secciones muestran evidencias de infiltración de neutrófilos, cambios en la morfología de las membranas capilares alveolares, edema intersticial, y evidencia de engrosamiento del intersticio y el septo alveolar. La FIGURA 9E ilustra que la puntuación de la lesión pulmonar aguda se reduce significativamente en los animales tratados con Enoxaparina, IC 100 cuando se comparan con los animales no tratados. Datos presentados como media $\pm$ SEM. N= 4 por grupo, ** $p < 0.01$., * $p < 0.05$.

Las FIGURAS 10A-10F ilustran el suministro de EV derivada de suero de pacientes con TBI incrementa la expresión de proteína de inflammasoma en las células endoteliales pulmonares. La FIGURA 10A muestra la representación de análisis de western blot de la caspasa-1, ASC, AIM2, HMGB1 en PMVEC después de la incubación con TBI-EV y EV de control durante 4 horas. La FIGURA 10B-10E muestra la cuantificación de análisis de western blot, n=3 filtros por grupo, n=6 pacientes, prueba t, $p < 0.05$. La FIGURA 10F muestra resultados de inmunoensayo de un incremento significativo en la expresión de IL-1 β usando el ensayo Ella simple plex n=3 filtros por grupo, n=6 pacientes, prueba t, $p < 0.05$.

Las FIGURAS 11A-11C ilustran el suministro de TBI-EV a las células endoteliales pulmonares incrementa la inmunoreactividad de la caspasa-1 activa y la muerte celular. La FIGURA 11A muestra la tinción de la Caspasa-1 FLICA y PI en PMVEC incubado con TBI-EV durante 4 hora. La FIGURA 11B muestra la tinción de la caspsaa-1 FLICA y PI en PMVEC incubado con EV de control durante 4 horas. La FIGURA 11C muestra el análisis de lector de placas fluorescente de PMVEC incubado con TBI y EV de control durante 4 horas. n=6, $p < 0.05$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos usados en la presente tienen el mismo significado como es comúnmente entendido por uno de experiencia ordinaria en la técnica a la cual esta invención pertenece.

Como se usa en la presente, "proteína" y "polipéptido" se usan sinónimamente para proponer cualquier cadena ligada a péptido de aminoácidos, sin considerar la longitud o modificación pos-traducciona, por ejemplo, glicosilación o fosforilación.

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” se refiere en general y ampliamente a inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales, y anticuerpos policlonales, así como fragmentos activos de los mismos. El fragmento puede ser activo en que se enlaza al antígeno cognado (por ejemplo, ASC, NLRP1, AIM2, etc.), o puede ser activo en que es biológicamente funcional. Los anticuerpos para el uso en la presente pueden ser quiméricos, humanizados, o humanos, usando técnicas conocidas en el campo.

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo en el cual porciones mínima de un anticuerpo no humano se introducen en un anticuerpo de otra manera humano.

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el cual sustancialmente cada parte de la proteína es sustancialmente no inmunogénica en humanos, con solo menores cambios o variaciones de secuencia.

Un sitio de enlace a antígeno se puede formar en general por los dominios de inmunoglobulina de región variable de cadena pesada (VH) y de región variable de cadena ligera (VL), con la interfase de antígeno-enlace formada por seis bucles de polipéptido superficial, llamadas regiones determinadoras de complementariedad (CDRs). Existen tres CDRs cada una en VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), junto con las regiones de estructura (FRs).

El término “región CDR” o “CDR” puede significar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas o ligeras de la inmunoglobulina como se define por Kabat y colaboradores, 1991 (Kabat, E. A. y colaboradores, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington), y ediciones posteriores. Un anticuerpo contiene típicamente 3 CDRs de cadena pesada y 3 CDRs de cadena ligera.

Se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo entero también pueden enlazar antígenos. Ejemplos de fragmentos de enlace incluyen: (i) un fragmento Fab que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1 (Ward, E. S. y colaboradores, (1989) *Nature* 341, 544-546); (ii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1 (McCafferty y colaboradores, (1990) *Nature*, 348, 552-554); (iii) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un anticuerpo individual (Holt y colaboradores, (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490); (iv) un fragmento de dAb (Ward, E. S. y colaboradores, *Nature* 341, 544-546 (1989), McCafferty y colaboradores, (1990) *Nature*, 348, 552-554, Holt y colaboradores, (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490], que consiste de un dominio VH o a VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados (vii) moléculas Fv de cadena individual (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se ligan por un ligador de péptido que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de enlace a antígeno (Bird y colaboradores, (1988) *Science*, 242, 423-426, Huston y

colaboradores, (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) dímeros Fv de cadena individual biespecíficos (PCT/US92109965) y (ix) “diacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por la fusión génica (WO94/13804; Holliger, P. (1993) y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448).

5 Las moléculas Fv, scFv o diacuerpo se pueden estabilizar por la incorporación de fuentes de disulfuro que ligan los dominios VH y VL (Reiter, Y. y colaboradores, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también se pueden hacer (Hu, S. y colaboradores, (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061). Otros ejemplos de fragmento de enlace pueden ser Fab', que difiere de los fragmentos Fab
10 por la adición de algunos residuos en la carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el cual el residuo(s) de cisteína de los dominios constantes lleva un grupo tiol libre.

“Fv” cuando se usa en la presente puede referirse al fragmento mínimo de un
15 anticuerpo que retiene ambos sitios de reconocimiento a antígeno y enlace a antígeno. “Fab” cuando se usa en la presente se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. El término “mAb” se refiere a anticuerpo monoclonal.

Por los términos “proteína similar a Speck asociada a Apoptosis que contiene un
20 Dominio de Reclutamiento de Activación de Caspasa (CARD)” y “ASC” se propone a un producto de expresión de un gen ASC o isoformas del mismo, o una proteína que comparte al menos 65% (pero de manera preferente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%) der identidad de secuencia de aminoácidos con ASC (por ejemplo, NP_037390 (Q9ULZ3-1), NP_660183 (Q9ULZ3-2) o Q9ULZ3-3 en el humano, NP_075747 en el ratón o NPJ758825 (BAC43754) en
25 la rata) y muestra una actividad funcional de ASC. Una “actividad funcional” de una proteína es cualquier actividad asociada con la función fisiológica de la proteína. Las actividades funcionales de ASC incluyen, por ejemplo, reclutamiento de proteínas para activación de caspasa-1 e inicio de la muerte celular.

Por el término “gen ASC” o “ácido nucleico ASC” se propone en una secuencia de
30 ácido nucleico que codifica ASC nativa, secuencias genómicas de las cuales el ASC ADNc se puede transcribir, y/o variantes alélicas y homólogos de los anteriores. El término abarca ADN de doble hebra, ADN de hebra individual y ARN.

Como se usa en la presente, el término “inflammasoma” significa un complejo de
múltiples proteínas (por ejemplo, al menos dos proteínas) que activa la caspasa-1. Además, el
35 término “inflammasoma” puede referirse a un complejo de múltiples proteínas que activa la actividad de caspasa-1, que a su vez regula el procesamiento y activación de IL-1 β , IL-18 e IL-

33. Ver Arend y *colaboradores* 2008; Li y *colaboradores* 2008; y Martinon y *colaboradores* 2002, cada una de las cuales se incorpora a manera de referencia en sus totalidades. Los términos “inflammasoma NLRP1” “inflammasomaNALP1”, “inflammasoma NLRP2”, “inflammasoma NALP2”, “inflammasoma NLRP3”, “inflammasoma NALP3”, “inflammasoma NLRC4”, “inflammasoma IPAF” o “inflammasoma AIM2” significan un complejo de proteínas de al menos caspasa-1 y una proteína adaptadora, por ejemplo, ASC. Por ejemplo, los términos “inflammasoma NLRP1” y “inflammasoma NALP1” pueden proponer un complejo de múltiples proteínas que contienen NLRP1, ASC, caspasa-1, caspasa-11, XIAP, y panexina-1 para activación de caspasa-1 y procesamiento de interleucina-1 β , interleucina-18 e interleucina-33. Los términos “inflammasoma NLRP2” y “inflammasoma NALP2” pueden proponer un complejo de múltiples proteínas que contiene NLRP2 (anteriormente conocido como NALP2), ASC y caspasa-1, mientras que los términos “inflammasoma NLRP3” y “inflammasoma NALP3” pueden proponer un complejo de múltiples proteínas que contiene NLRP3 (anteriormente conocido como NALP3), ASC y los términos “inflammasoma NLRC4” y “inflammasoma IPAF” pueden proponer un complejo de múltiples proteínas que contiene NLRC4 (anteriormente conocido como IPAF), ASC y caspasa-1. Adicionalmente, el término “Inflamasoma AIM2” puede proponer un complejo de múltiples proteínas que comprenden AIM2, ASC y caspasa-1.

Como se usa en la presente, la frase “identidad de secuencia” significa el porcentaje de subunidades idénticas en las posiciones correspondientes en dos secuencias (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico, secuencias de aminoácidos) cuando las dos secuencias se alinean para maximizar la coincidencia de subunidad, es decir, tomando en cuenta espacios e inserciones. La identidad de secuencia se puede medir usando software de análisis de secuencia (por ejemplo, Paquete de Software de Análisis de Secuencia de Accelrys CGC, San Diego, CA).

Por las frases “cantidad terapéuticamente efectiva” y “dosificación efectiva” se propone una cantidad suficiente para producir un resultado terapéuticamente (por ejemplo, clínicamente) deseable; la naturaleza exacta del resultado variará dependiendo de la naturaleza del trastorno que se trata. Por ejemplo, donde el trastorno que se trata es SCI, el resultado puede ser una mejora en las capacidades motrices y función locomotrices, una lesión en la médula espinal reducida, etcétera. Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar de una o más veces al día a una o más veces a la semana. El artífice experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y tiempo requeridos para tratar de manera eficaz un sujeto, incluyendo, pero no limitado a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Por otra parte, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones de la invención puede incluir un tratamiento

individual o una serie de tratamientos.

Como se usa en la presente, el término “tratamiento” se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico descrito en la presente, o identificado por un método descrito en la presente, a un paciente, o aplicación o administración del agente terapéutico a un tejido aislado o línea de células de un paciente, quien tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mejorar, alterar, remediar, reducir, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.

Los términos “paciente”, “sujeto” e “individuo” se usan intercambiablemente en la presente, y significan un sujeto mamífero que se trata, con pacientes humanos que es preferido. En algunos casos, los métodos de la invención encuentran uso en animales experimentales, en aplicaciones veterinarias, y en el desarrollo de modelos animales para enfermedad, incluyendo, pero no limitados a, roedores, incluyendo ratones, ratas y hámsteres, así como primates.

Como se usa intercambiablemente en la presente, “Ausente en el Melanoma 2” y “AIM2” puede proponer un producto de expresión de un gen AIM2 o isoformas; o una proteína que comparte al menos 65% (pero de manera preferente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos con AIM2 (por ejemplo, número(s) de acceso NX_014862, NP004824, XP016858337, XP005245673, AAB81613, BAF84731, AAH10940) y muestra una actividad funcional de AIM2.

Como se usa intercambiablemente en la presente, “NALP1” y “NLRP1” significa un producto de expresión de un gen NALP1 o NLRP1 o isoformas; o proteína que comparte al menos 65% (pero de manera preferente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos con NALP1 (por ejemplo, número(s) de acceso AAH51787, NP_001028225, NP_127500, NP_127499, NP_127497, NP055737) y muestra una actividad funcional de NALP1.

Como se usa intercambiablemente en la presente, “NALP2” y “NLRP2” significa un producto de expresión de un gen NALP2 o NLRP2 o isoformas; o una proteína que comparte al menos 65% (pero de manera preferente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos con NALP2 (por ejemplo, número(s) de acceso NP_001167552, NP_001167553, NP_001167554 o NP_060322) y muestra una actividad funcional de NALP2.

Como se usa intercambiablemente en la presente, “NALP3” y “NLRP3” significa un producto de expresión de un gen NALP3 o NLRP3 o isoformas; o una proteína que comparte al menos 65% (pero de manera preferente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos con NALP3 (por ejemplo, número(s) de acceso NP_001073289, NP_001120933, NP_001120934, NP_001230062, NP_004886, NP_899632, XP_011542350, XP_016855670, XP_016855671, XP_016855672 o XP_016855673) y muestra una actividad

funcional de NALP3.

Como se usa intercambiamente en la presente, “NLRC4” y “IPAF” significa un producto de expresión de un gen NLRC4 o IPAF o isoformas; o una proteína que comparte al menos 65% (pero de manera preferente 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%) de identidad de
 5 secuencia de aminoácidos con NLRC4 (por ejemplo, número(s) de acceso NP_001186067, NP001186068, NP_001289433 o NP_067032) y muestra una actividad funcional de NLRC4.

Por los términos “apoplejía” y “apoplejía isquémica” se propone cuando el flujo sanguíneo se interrumpe a una parte del cerebro o médula espinal.

Por “lesión traumática al CNS” se propone cualquier lesión al CNS de una fuerza
 10 mecánica externa, posiblemente conduciendo a deterioros permanentes o temporales de la función de CNS.

El término “anticuerpo” se propone incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) a anticuerpos que se pueden etiquetar en forma soluble o enlazada, así
 15 como fragmentos, regiones o derivados de los mismos, proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero no limitada a, escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Estos anticuerpos anti-ASC y anti-NLRP1 de la presente invención son capaces de enlazar porciones de ASC y NLRP1, respectivamente, que interfieren con la activación de caspasa-1.

Se describen en la presente métodos que implican técnicas de biología molecular convencionales. Estas técnicas son en general conocidas en el campo y se describen con detalle en los tratados de metodología tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y colaboradores, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; and Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel y
 25 colaboradores, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Técnicas de inmunología son en general conocidas en la técnica y se describen con detalle en los tratados de metodología tal como Advances in Immunology, volume 93, ed. Frederick W. Alt, Academic Press, Burlington, MA, 2007; Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, eds. Gary C. Howard y Matthew R. Kaser, CRC Press,
 30 Boca Raton, FL, 2006; Medical Immunology, 6th ed., editada por Gabriel Virella, Informa Healthcare Press, London, England, 2007; y Harlow y Lane ANTIBODIES: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Aunque las composiciones y métodos similares o equivalentes aquellos descritos en la presente se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a
 35 continuación composiciones y métodos adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, y patentes mencionadas en la presente se incorporan a manera de referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, lo

controlarán. Las modalidades particulares planteadas a continuación son ilustrativas solamente y no se proponen para ser limitantes.

VISTA GENERAL

Se proporcionan en la presente composiciones y métodos para reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero que se ha sometido a o está afectado por una afección que da por resultado o provoca inflamación pulmonar. Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden incluir anticuerpos o fragmentos activos de los mismos como es proporcionado en la presente que enlazan específicamente a al menos un componente (por ejemplo, ASC) de un inflamasoma de mamífero y/o compuestos que modulan (por ejemplo, inhiben o reducen) la captación de vesícula extracelular (EV) y tienen uso como tratamientos para inflamación pulmonar en un mamífero.

Se describen en la presente métodos para reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero que tiene una afección que da por resultado y/o provoca una respuesta inflamatoria en los pulmones. En una modalidad, el método para tratar la inflamación en los pulmones de un mamífero comprende administrar al mamífero una composición que comprende un agente que muestra señalización de inflamasoma. El mamífero puede ser un paciente o sujeto como es proporcionada en la presente. Ejemplos de afecciones que pueden conducir a la inflamación en los pulmones incluyen una lesión del sistema nervioso central (CNS) (por ejemplo, lesión de la médula espinal (SCI), lesión cerebral traumática (TBI) o apoplejía), una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad autoinmunitaria, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial o síndrome de dificultad respiratoria aguda. La composición se puede administrar en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una dosis como se proporciona en la presente. El agente puede ser un inhibidor de captación de vesícula extracelular (EV), un anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente que se enlaza a un componente de un inflamasoma o una combinación del mismo. La composición se puede administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inhalación, intravenosa, intraperitoneal, o intracerebroventricularmente. La composición puede incluir además al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la administración del agente puede dar por resultado una reducción en la actividad y/o nivel de expresión de un componente de un inflamasoma de mamífero en los pulmones del sujeto. La reducción puede estar en las células del pulmón tal como, por ejemplo, células alveolares Tipo II. La reducción puede estar en comparación con un control. El control puede ser el sujeto antes de la administración del agente. El control puede ser la actividad y/o nivel de expresión del componente(s) de inflamasoma en un sujeto no administrado con el agente. En una modalidad, la administración del agente da por resultado

la reducción de la activación de caspasa-1 en al menos los pulmones o células pulmonares del sujeto. En una modalidad, la administración del agente da por resultado la reducción del nivel de expresión de uno o más componentes de inflammasoma (por ejemplo, ASC, AIM2, NALP1, NALP2, NALP3 o NLRC4) en al menos los pulmones o células pulmonares del sujeto.

5 En otra modalidad, la administración del agente puede dar por resultado una reducción o eliminación de la lesión pulmonar aguda (ALI). En una modalidad, la reducción en ALI es evidenciada por una reducción en la infiltración de neutrófilos en el espacio alveolar e/o intersticial, engrosamiento septal alveolar reducido o ausente o una combinación de los mismos. La reducción puede ser en comparación con un control. El control puede ser ALI en el
10 sujeto antes de la administración del agente. El control puede ser ALI en un sujeto que padece de ALI no administrado al agente.

En aún otra modalidad, la administración del agente puede dar por resultado una reducción en o eliminación de piroptosis en los pulmones del sujeto. La piroptosis es una forma pro-inflamatoria de muerte celular que implica activación de caspasa-1. La piroptosis se
15 puede desencadenar por la escisión mediada por caspasa-1 de gasdermina D (GSDMD). En una modalidad, la reducción en la piroptosis se evidencia por una reducción en o falta de escisión de GSDMD en los pulmones o células pulmonares (por ejemplo, células alveolares Tipo II) del sujeto. La reducción o eliminación de la piroptosis puede ser en comparación con un control. La reducción en o falta de la escisión de GSDMD puede ser en comparación a un
20 control. El control puede ser el nivel de piroptosis en el sujeto antes de la administración del agente. El control puede ser el nivel de piroptosis en el sujeto que padece de piroptosis que no se le administra el agente.

En una modalidad, el agente que se administra es un inhibidor de captación EV. El inhibidor de captación EV puede ser un compuesto, ARN anti-sentido, ARNsi, péptido,
25 anticuerpo, o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente o una combinación de los mismos. El compuesto o péptido puede ser uno o más compuestos seleccionados de heparina, α -difluorometilornitina (DFMO), Enoxaparina, Asialofetuna, proteína asociada al receptor Humano (RAP), péptido RGD (Arg-Gly-Asp), Citocalasina D, Citocalasina B, Ácido etilendiamintetra acético (EDTA), Latrunculina A, Latrunculina B,
30 NSC23766, Dynasore, Clorpromazina, 5-(N-Etil-N-isopropil)amilorido (EIPA), Amilorido, Bafilomicina A Monensina y Cloroquina, Anexina-V, Wortmanina, LY294002, Metil- β -ciclodextrina (M β CD), Filipina, Simvastatina, Fumonisin B1 y clorhidrato de N-butildesoxinojirimicina, U0126 o un inhibidor de bomba de protones. El anticuerpo inhibidor de captación EV o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente puede ser
35 uno o más anticuerpos o fragmentos activos de los mismos dirigidos contra objetivos de proteínas listados en la Tabla 1. Una composición para tratar y/o reducir la inflamación en los

pulmones de un mamífero usando un inhibidor de captación EV puede incluir además al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Tabla 1. Objetivos ejemplares y anticuerpos correspondientes para el uso en el bloqueo de la captación EV

5	Símbolo del Gen	Nombre del Gen	Anticuerpos ejemplares
10	ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular 1	Anticuerpo Invitrogen ICAM-1 (Life Technologies, 07-5403); Anticuerpo monoclonal CD54 (ICAM-1) (R6.5), eBioscience™
15	LFA-1	Antígeno asociado a función de linfocitos 1	Anticuerpo Abbiotec LFA-1 (Abbiotec, 250944); Anticuerpo de hibridoma Bank LFA-1 Developmental Studies (Developmental Studies Hybridoma Bank, MHM24)
20	TIM-4	Proteína de membrana de células T 4	Anticuerpo BioLegend I1MD4 (BioLegend, 354004); Anticuerpo I1MD4 LifeSpan Biosciences (Lifespan Biosciences, LS-B1413)
25	MFG-E8	Proteína de factor 8 EGF de glóbulo de grasa de leche	Anticuerpo MFGE8 MBL International (MBL, DI99-3); anticuerpo MFGE8 Santa Cruz Biotec-homology (Santa Cruz, sc~8029); Anticuerpo MFGE8 MBL International (MBL, 18A2-G10)
30	DC-SIGN	No integrina de molécula de adhesión intercelular-3-de agarre específica de células dendríticas	Anticuerpo Invitrogen DC SIGN (eBioscience, eB-h209, 17-2099-41); Anticuerpo BD Biosciences DC SIGN (BD.DCN46, 551186)
35	DEC205	Racimo de diferenciación 205	Anticuerpo EMD Millipore LY75 (Millipore, HD30); Anticuerpo BioLegend LY75 (BioLegend, 342203)
	11--2 Kb	MHC Clase I (H-2Kd)	Anticuerpo BioLegend H2-K1 (BioLegend, 28-8-6, 114603); Anticuerpo BioLegend H2-K1 (BioLegend, 28-14-8, 14-5999-85)
	TspanB	Tetraspanina-8	Anticuerpo R and D Systems TSPAN8

			(R&D Systems, MAB4734)
5	Tspan29	Tetraspanina-29	Anticuerpo CD9 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, sc-59140); Invitrogen CD9 antibody (eBioscience, eBioSN4; BD Biosciences CD9 antibody (BD Pharmmgen, 555370)
	ITGAL	Subunidad de integrina alfa L	TS 1/22.1.1.13.3; MI7/4.4.11.9
10	ITGAM	Subunidad de integrina alfa M	Anticuerpo monoclonal CD1 Ib (VIM12) (CD11B00); BD Biosciences
			Anticuerpo CD1 Ib (BD Pharmingen, ICRF44; 555385)
15	ITGAX	Subunidad de integrina alfa X	Anticuerpo Anti-Integrina aX, clon N418 (MAB1399Z); Anticuerpo CD1 Ie BD Biosciences (BD Bioseience, B-ly6; 560369)
20	CD44	Racimo de diferenciación 44	Anticuerpo CD44 Invitrogen (eBioscience, VFF-7; MA1-82392); Anticuerpo CD44 Invitrogen (eBioscience, IM7; MAM 0225); Anticuerpo CD44 Invitrogen (eBioscience' 5F12; MA5-12394); BD Anticuerpo CD44 Biosciences (BD Biosciences, 515; 550990 OR 550988)
25	ITGA3	Subunidad de integrina alfa 3	Anticuerpo de integrina alfa 3 EMD Millipore (Millipore, P1B5; MAB19 52Z OR MAB1952P)
30	ITGA4	Subunidad de integrina alfa 4	Anticuerpo XTGA4 Bio X Cell (BioXcell, PS/2) (BE0071-5MG); Anticuerpo ITGA4 BD Biosciences (BD Biosciences, 561892); Anticuerpo ITGA4 BD Biosciences (BD, 340976); Anticuerpo ITGA4 EMD Millipore (Millipore, P4C2; MAB 1955}
35	ITGAV	Subunidad de integrina alfa V	Anticuerpo de Abcam integrina alfa v (Abcam, ab77906); Anticuerpo de Abcam integrina alfa v (Abcam,

5			ab78289); Anticuerpo de Abcam integrina alfa v (Abcam, ab16821); Anticuepo de Invitrogen integrina alfa v (Thermo Fisher Seientifie, 272-17EÓ, MA1- 91669); Anticuerpo de R & D Systems integrina alfa v (R&D Systems, MAB2528)
10	ITGB3	Subunidad de integrina alfa 3	Anticuerpo de Abcam integrina beta3 (Abcam, ab78289); Anticuerpo de Abnova integrina beta3 (Abnova, MHF4, MAB7098)
15	SELL	Selectina L	Anticuerpo CD62L BioLegend (Biolegend, 304804); Anticuerpo CD62L BioLegend (Biolegend, 304810)
20	CD81	Molécula CD81	Anticuerpo CD81 BD Bioscienees (BD Pharmingen, 555675); Anticuerpo CD81 RandD Systems (R&D Systems, MAB4615)
25	LRPI	Proteína 1 relacionada con el receptor LDL	Anticuerpo LRPI Invitrogen (Life Technologies, 37-7600); Anticuerpo LRPI Invitrogen (Thermo Fisher, MAL 27198)
30	VCAM1	Molécula de adhesión celular vascular 1	Anticuerpo VCAM-1 Invitrogen (Caltag, IG11B1; MAS-16429); Anticuerpo anti- VC-AM-1 Immunotech
	CD151	Molécula CD151 (grupo sanguíneo Raph)	Anticuerpo CD151 BD Biosciences (Becton Diekmson, 556056); Anticuerpo CD151 Epitomics (Epitomics, 5901-1)

En una modalidad, el agente que se administra es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente dirigido contra un componente de un inflammasoma de mamífero o un antígeno o epítipo derivado del mismo. En otra modalidad, el agente que se administra es un ARN anti-sentido o ARNsi dirigido contra un componente de un inflammasoma de mamífero. El componente de inflammasoma puede ser un componente de

cualquier inflammasoma conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, el inflammasoma NALP1, NALP2, NALP3, NLRC4 o AIM2. En una modalidad típica, el anticuerpo se enlaza específicamente a ASC o un antígeno o epítipo derivado del mismo. Sin embargo, un anticuerpo contra cualquier otro componente de un inflammasoma de mamífero (por ejemplo, el inflammasoma NALP1, NALP2, NALP3, NLRC4 o AIM2) se puede usar.

Un anticuerpo como se describe en la presente puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmentos activos de los mismos. Los anticuerpos o fragmentos activos pueden ser quiméricos, humanos o humanizados como se describe en la presente.

Cualquier anticuerpo adecuado o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente que enlaza específicamente ASC se puede usar, por ejemplo, un anticuerpo que inhibe la actividad de ASC en las células pulmonares (por ejemplo, células alveolares Tipo II) del sujeto. En una modalidad típica, el anticuerpo se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. Similarmente, en otra modalidad, el inflammasoma es el inflammasoma NALP1, y el al menos un componente es NALP1 (es decir, NLRP1). En esta modalidad, el anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

En todavía otra modalidad, el agente es uno o más inhibidores de captación de EV en combinación con uno o más anticuerpos o fragmentos activos de los mismos como se proporciona en la presente que enlazan un componente de un inflammasoma. El inhibidor de captación de EV puede ser cualquier inhibidor de captación de EV como se proporciona en la presente. El anticuerpo que enlaza un componente de un inflammasoma puede ser cualquier anticuerpo que enlaza cualquier componente de inflammasoma como se proporciona en la presente. En una modalidad, el agente administrado a un sujeto que padece de inflamación pulmonar comprende una heparina (por ejemplo, Enoxaparina) en combinación con un anticuerpo que enlaza un componente del inflammasoma AIM2 (por ejemplo, ASC).

En una modalidad, el método comprende: proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que incluye un anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente que se enlaza específicamente a al menos un componente (por ejemplo, ASC) de un inflammasoma de mamífero (por ejemplo, inflammasoma AIM2); y administrar la composición al mamífero que padece de inflamación pulmonar, en donde la administración de la composición al mamífero da por resultado una reducción de la activación de caspasa-1 en los pulmones del mamífero. En otra modalidad, el método comprende: proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que incluye un anticuerpo que se enlaza específicamente a al menos un componente (por ejemplo, ASC) de

un inflammasoma de mamífero (por ejemplo, inflammasoma AIM2); y administrar la composición al mamífero que padece de inflamación pulmonar, en donde la administración de la composición al mamífero da por resultado una reducción en los niveles de uno o más componentes de inflammasoma (por ejemplo, ASC). En todavía otra modalidad, el método comprende: proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que incluye un anticuerpo que se enlaza específicamente a al menos un componente (por ejemplo, ASC) de un inflammasoma de mamífero (por ejemplo, inflammasoma AIM2); y administrar la composición al mamífero que padece de inflamación pulmonar, en donde la administración de la composición al mamífero da por resultado una reducción ALI. La inflamación pulmonar puede ser el resultado de una lesión del CNS (por ejemplo, SCI o TBI), asma, trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), una enfermedad neurodegenerativa, o una enfermedad autoinmunitaria con un componente inflamatorio. En una modalidad, la inflamación pulmonar es provocada por una lesión del CNS tal como TBI o SCI.

En una modalidad, los métodos proporcionados en la presente implican además detectar un nivel o actividad de uno o más componentes de un inflammasoma de mamífero en una muestra de un sujeto sospechoso de padecer de inflamación pulmonar. El método para detectar el nivel de o actividad implica medir el nivel de al menos una proteína de inflammasoma (por ejemplo, ASC o AIM2) en la muestra obtenida del sujeto; determinar la presencia o ausencia de un nivel elevado o actividad del al menos una proteína de inflammasoma (por ejemplo, ASC o AIM2). El nivel o actividad del al menos una proteína de inflammasoma se puede mejorar con respecto al nivel del al menos una proteína de inflammasoma en una muestra de control. El nivel o actividad del al menos una proteína de inflammasoma en la firma de proteína se puede mejorar con respecto a un valor de referencia predeterminado o intervalo de valores de referencia. La al menos una proteína de inflammasoma puede ser la proteína 1 que contiene el dominio de pirina de repetición rica en leucina de enlace a nucleótido (NLRP1), NLRP2, NLRP3, NLRC4, AIM2, proteína similar a speck asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa (ASC), caspasa-1, o combinaciones de los mismos. La muestra puede ser líquido cefalorraquídeo (CSF), saliva, sangre, suero, plasma, orina o un aspirado pulmonar.

30 **Anticuerpos que se Enlazan Específicamente a Al Menos un Componente de un Inflammasoma de Mamífero**

Los métodos descritos en la presente para reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero incluyen composiciones que incluyen un anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente que se enlaza específicamente a al menos un componente (por ejemplo, ASC, AIM2) de un inflammasoma de mamífero (por ejemplo, el inflammasoma AIM2). Una composición para tratar y/o reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero puede incluir además al menos un portador o diluyente farmacéuticamente

aceptable. Los anticuerpos ejemplares dirigidos contra los componentes de un inflammasoma de mamífero para el uso en los métodos en la presente pueden ser aquellos encontrados en US8685400, los contenidos de los cuales se incorporan en la presente a manera de referencia en su totalidad.

5 En una modalidad, una composición para tratar y/o reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero incluye un anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente que se enlaza específicamente a un dominio o porción del mismo de una proteína ASC de mamífero tal como, por ejemplo, una proteína ASC humana, de ratón o rata. Se puede usar cualquier anticuerpo anti-ASC adecuado, y varios son comercialmente
10 disponibles. Ejemplos de anticuerpos anti-ASC para el uso en los métodos en la presente pueden ser aquellos encontrados en US8685400, los contenidos de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia en su totalidad. Ejemplos de anticuerpos anti-ASC comercialmente disponibles para el uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a 04-147 Anti-ASC, anticuerpo monoclonal de ratón clon 2E1-7 de
15 MilliporeSigma, Anticuerpo AB3607 - Anti-ASC de Millipore Sigma, orb94021 Anti-ASC de Biorbyt, LS-C331318-50 Anti-ASC de Lifespan Biosciences, AF3805 Anti-ASC de R & D Systems, NBP1-78977 Anti-ASC de Novus Biologicals, 600-401-Y67 Anti-ASC de Rockland Immunochemical, D086-3 Anti-ASC de MBL International, AL177 anti-ASC de Adipogen, anticuerpo anti-ASC monoclonal (clon o93E9), anticuerpo anti-ASC (F-9) de Santa Cruz
20 Biotechnology, anticuerpo anti-ASC (B-3) de Santa Cruz Biotechnology, anticuerpo policlonal ASC - ADI-905-173 de Enzo Life Sciences, o A161 Anti-Humano ASC - Leinco Technologies. La proteína ASC humana puede ser el número de acceso NP_037390.2 (Q9ULZ3-1), NP_660183 (Q9ULZ3-2) o Q9ULZ3-3. La proteína ASC de rata puede ser el número de acceso NP_758825 (BAC43754). La proteína ASC de ratón puede ser el número de acceso
25 NP_075747.3. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a un dominio PYRIN-PAAD-DAPIN (PYD) o una porción o fragmento del mismo de una proteína ASC de mamífero (por ejemplo, ASC humana, de ratón o rata). En esta modalidad, un anticuerpo como se describe en la presente se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% (por ejemplo, 65, 70, 75, 80, 85%) de identidad de secuencia con un dominio PYD o fragmento
30 del mismo de ASC humana, de ratón o rata. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a un dominio de reclutamiento de caspasa C-terminal (CARD) o una porción o fragmento del mismo de una proteína ASC de mamífero (por ejemplo, ASC humana, de ratón o rata). En esta modalidad, un anticuerpo como se describe en la presente se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% (por ejemplo, 65, 70, 75, 80, 85%) de
35 identidad de secuencia con un dominio CARD o fragmento del mismo de ASC humana, de ratón o rata. En aún otra modalidad, el anticuerpo se enlaza a una porción o fragmento del mismo de una secuencia de proteína ASC de mamífero (por ejemplo, ASC humana, de ratón o

rata) situada entre los dominios PYD y CARD. En otra modalidad, una composición para tratar y/o reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero incluye un anticuerpo que se enlaza específicamente a una región de ASC de rata, por ejemplo, secuencia de aminoácidos ALRQTQPYLVTDLQES (SEQ ID NO:1) (es decir, residuos 178-193 de ASC de rata, número de acceso BAC43754). En esta modalidad, un anticuerpo como se describe en la presente se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% (por ejemplo, 65, 70, 75, 80, 85%) de identidad secuencia con la secuencia de aminoácidos ALRQTQPYLVTDLQES (SEQ ID NO:1) de ASC de rata. En otra modalidad, una composición para tratar y/o reducir la inflamación en el CNS de un mamífero incluye un anticuerpo que se enlaza específicamente a una región de ASC humana, por ejemplo, secuencia de aminoácidos RESQSYLVEDLERS (SEQ ID NO:2). En una modalidad, un anticuerpo que se enlaza a un dominio ASC o fragmento del mismo como se describe en la presente inhibe la actividad de ASC en las células pulmonares, por ejemplo, células alveolares Tipo II de un mamífero.

En otra modalidad, una composición para reducir la inflamación en los pulmones d un mamífero incluye un anticuerpo o un fragmento activo del mismo como se proporciona en la presente que se enlaza específicamente a NLRP1 (por ejemplo, anticuerpo de pollo anti-NLRP1) o un dominio del mismo. Se puede usar cualquier anticuerpo anti-NLRP1 adecuado, y varios comercialmente disponibles. Ejemplos de anticuerpos anti-NLRP1 para el uso en los métodos en la presente pueden ser aquellos encontrados en US 8685400, los contenidos de la cual se incorporan en la presente a manera de referencia en su totalidad. Ejemplos de anticuerpos anti-NLRP1 comercialmente disponibles para el uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a anticuerpo policlonal NLRP1 humano AF6788 de R&D Systems, anti-NLRP1 ANF22 policlonal de conejo EMD Millipore, anti-NLRP1 100-56148 policlonal de conejo Novus Biologicals, anti-NLRP1 SAB1407151 policlonal de ratón Sigma-Aldrich, anti-NLRP1 ab3683 policlonal de conejo Abcam, anti-NLRP1 orb325922 policlonal de conejo Biorbyt, anti-NLRP1 MBS7001225 policlonal de conejo mybiosource, AF6788 policlonal de oveja R&D systems, anti-NLRP1 oaed00344 monoclonal de ratón Aviva Systems, anti-NLRP1 ARO54478_P050 policlonal de conejo Aviva Systems, anti-NLRP1 AP07775PU-N policlonal de conejo Origene, anti-NLRP1 ABIN768983 policlonal de conejo Antibodies online, anti-NLRP1 3037 policlonal de conejo Prosci, anti-NLRP1 12256-1-AP policlonal de conejo Proteintech, anti-NLRP1 ALX-804-803-C100 monoclonal de ratón Enzo, anti-NLRP1 MAI-25842 monoclonal de ratón, anti-NLRP1 GTX16091 monoclonal de ratón GeneTex, anti-NLRP1 200-401-CX5 policlonal de conejo Rockland, o anti-NLRP1 4990 policlonal de conejo Cell Signaling Technology. La proteína NLRP1 humana puede ser el número de acceso AAH51787, NP_001028225, NP_055737, NP_127497, NPJ 27499, o NP_127500. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a una Pirina, NACHT, LRR1-6, FIIND

o dominio CARD o una porción o fragmento del mismo de una proteína NLRP1 de mamífero (por ejemplo NLRP1 humana). En esta modalidad, un anticuerpo como se describe en la presente se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% (por ejemplo, 65, 70, 75, 80, 85%) de identidad de secuencia con un dominio específico (por ejemplo, Pirina, NACHT, LRR1-6, FIIND o CARD) o fragmento del mismo de NLRP1 humana.

En una modalidad, un anti-NLRP1 de pollo policlonal que se diseñó a la medida y se produjo por Ayes Laboratories se usa para reducir la inflamación pulmonar. Estos anticuerpos se pueden dirigir contra la siguiente secuencia de aminoácidos en NLRP1 humana: CEYYTEIREREREKSEKGR (SEQ ID NO: 3). En una modalidad, un anticuerpo que se enlaza a un dominio NLRP1 o fragmento del mismo como se describe en la presente inhibe la actividad de NLRP1 en las células pulmonares, por ejemplo, célula alveolares Tipo II de un mamífero.

En todavía otra modalidad, una composición para reducir la inflamación en los pulmones de un mamífero incluye un anticuerpo o fragmento de activo del mismo como se proporciona en la presente que se enlaza específicamente a AIM2 o un dominio del mismo. Cualquier anticuerpo anti-AIM2 adecuado se puede usar, y varios son comercialmente disponibles. Ejemplos de anticuerpos anti-AIM2 comercialmente disponibles para el uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a, un anti-AIM2 policlonal de conejo. Número Cat. 20590-1-AP de Proteintech, anticuerpo anti-ATMS Abcam (ab1119791), anti-AIM2 policlonal de conejo (región N-terminal) Número Cat. AP3851 de ECM biosciences, anti-ASC policlonal de conejo Número Cat. E-AB-30449 de Elabsciences, anticuerpo monoclonal de ratón Anti-AIM2 llamado Anticuerpo AIM2 (3C4G11) con el número de catálogo sc-293174 de Santa Cruz Biotechnology, anticuerpo AIM2 monoclonal de ratón con el número de catálogo TA324972 de Origene, anticuerpo monoclonal AIM2 (10M2B3) de Thermofisher Scientific, anticuerpo policlonal de conejo AIM2 ABIN928372 o ABIN760766 de Antibodies-online, anticuerpo policlonal anti-AIM2 de cabra Biomatix por el Número cat. CAE02153, anticuerpo policlonal Anti-AIM2 (OABF01632) de Aviva Systems Biology, anticuerpo anti-AIM2 policlonal de conejo LS-C354127 de LSBio-C354127, anticuerpo anti-AIM2 monoclonal de conejo de Cell Signaling Technology, con el número cat MA5-16259.

Anticuerpo monoclonal anti-AIM2 policlonal de conejo de Fab Gennix International Incorporated, Número Cat. AIM2 201AP, anti-AIM2 policlonal de conejo MyBiosource número cat MBS855320, anti-AIM2 policlonal de conejo Signalway número de catálogo 36253, anti-AIM2 policlonal de conejo Novus Biological número de catálogo 43900002, anti-AIM2 GTX54910 policlonal de conejo, Prosci, anti-AIM2 26-540 policlonal de conejo, anti-AIM2 orb333902 monoclonal de ratón Biorbyt, anti-AIM2 orb333902, anti-AIM2 ab93015 policlonal de conejo Abcam, anti-AIM2 ab76423 policlonal de conejo Abcam, anti-AIM2 SAB1406827 policlonal de conejo Signma Aldrich, o anti-AIM2 3B10 Biolegend. La proteína AIM2 humana

puede ser el número de acceso NX014862, NP004824, XP016858337, XP005245673, AAB81613, BAF84731 o AAH10940. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a una Pirina o dominio HIN-200 o una porción o fragmento del mismo de una proteína AIM2 de mamífero (por ejemplo AIM2 humana). En esta modalidad, un anticuerpo como se describe en la presente se enlaza específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% (por ejemplo, 65, 70, 75, 80, 85%) de identidad de secuencia con un dominio específico (por ejemplo, Pirina o HIN-200) o fragmento del mismo de AIM2 humana. En una modalidad, un anticuerpo que se enlaza a un dominio AIM2 o fragmento del mismo como se describe en la presente inhibe la actividad de AIM2 en las células pulmonares, por ejemplo, células alveolares Tipo II de un mamífero.

Los anticuerpos anti-inflamasoma (por ejemplo, Anti-ASC, anti-NLRP1 o anti-AIM2) como se describen en la presente incluyen anticuerpos de roedor policlonales y monoclonales, anticuerpos humanos policlonales y monoclonales, o cualquiera de las porciones de los mismos, que tiene al menos una región de enlace a antígeno de una región variable de inmunoglobulina, el anticuerpo que se enlaza específicamente a un componente de un inflamasoma de mamífero (por ejemplo, inflamasoma AIM2) tal como, por ejemplo, ASC o AIM2. En algunos casos, el anticuerpo es específico para ASC tal que un anticuerpo es específico para ASC si se produce contra un epítipo del polipéptido y se enlaza al menos a parte de la proteína natural o recombinante.

Métodos para determinar la especificidad y afinidad de anticuerpo monoclonal por inhibición competitiva se pueden encontrar en Harlow, y colaboradores, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, Colligan y colaboradores, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601, 1983, las referencias que se incorporan completamente en la presente a manera de referencia.

Los anticuerpos anti-inflamasoma (por ejemplo, Anti-ASC y anti-AIM2) de la presente invención se pueden hacer rutinariamente de acuerdo con los métodos tal como, pero no limitados a inoculación de un animal apropiado con el polipéptido o un fragmento antigénico, estimulación in vitro de poblaciones de linfocitos, métodos sintéticos, hibridomas, y/o células recombinantes que expresan ácido nucleico que codifica estos anticuerpos anti-ASC o anti-NLR1. La inmunización de un animal usando ASC recombinante purificado o fragmentos de péptidos del mismo, por ejemplo, residuos 178-193 (SEQ ID NO: 1) de ASC de rata (por ejemplo, número de acceso BAC43754) SEQ ID NO:2 de ASC humana, es un ejemplo de un método para preparar anticuerpos anti-ASC. Similarmente, la inmunización de un animal usando NLRP1 recombinante purificada o fragmentos del péptido de la misma, por ejemplo, residuos MEE SQS KEE SNT EG-cys (SEQ ID NO:4) de NALP1 de rata o SEQ ID NO:3 de NALP1 humana, es un ejemplo de un método para preparar anticuerpos anti-NLRP1.

Los anticuerpos monoclonales que enlazan específicamente ASC o NLRP1 se pueden obtener por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975; Patente de E.U.A. No. 4,376,110; Ausubel y colaboradores, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); Harlow and Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988; Colligan y colaboradores, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), los contenidos de las cuales se incorporan en la presente completamente a manera de referencia. Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede cultivar *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

Administración de Composiciones

Las composiciones de la invención se pueden administrar a los mamíferos (por ejemplo, roedores, humanos) en cualquier formulación adecuada. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ASC se pueden formular en portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables tal como solución salina fisiológica o una solución de sal amortiguada. Los portadores y diluyentes adecuados se pueden seleccionar sobre la base del modo y vía de administración y la práctica farmacéutica estándar. Una descripción de portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables ejemplares, así como formulaciones farmacéuticas, se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto estándar en este campo, y en USP/NF. Otras sustancias se pueden agregar a las composiciones para estabilizar y/o conservar las composiciones.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a mamíferos por cualquier técnica convencional. Típicamente, esta administración será mediante inhalación o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, o introducción intratecal). Las composiciones también se pueden administrar directamente a un sitio objetivo mediante, por ejemplo, suministro quirúrgico a un sitio objetivo interno o externo, o por catéter a un sitio accesible por un vaso sanguíneo. Las composiciones se pueden administrar en un bolo individual, múltiples inyecciones, o por infusión continua (por ejemplo, intravenosamente, por diálisis peritoneal, infusión por bomba). Para la administración parenteral, las composiciones se formulan de manera preferente en una forma sin pirógeno esterilizada.

Dosis Efectivas

Las composiciones descritas en lo anterior se administran de manera preferente a un mamífero (por ejemplo, una rata, humano) en una cantidad efectiva, es decir, una cantidad capaz de producir un resultado deseable en un mamífero tratado (por ejemplo, reducir la

inflamación en el CNS de un mamífero sometido a una lesión traumática al CNS o apoplejía o que tiene una enfermedad autoinmunitaria o CNS). Esta cantidad terapéuticamente efectiva se puede determinar cómo se describe a continuación.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones utilizadas en los métodos de la invención se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándares, usando ya sea células en animales de cultivo o experimentales para determinar la LD₅₀ (la dosis letal a 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren esas composiciones que muestran índices terapéuticos grandes. Mientras que aquellos que muestran efectos secundarios tóxicos se pueden usar, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que minimice el daño potencial de estos efectos secundarios. La dosificación de las composiciones preferidas depende de manera preferente dentro de un intervalo que incluye una ED₅₀ con poco o nada de toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

Como es bien conocido en las técnicas médicas y veterinaria, las dosificaciones para cualquier sujeto depende en muchos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, área superficial corporal, edad, la composición particular que se administra, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran concurrentemente.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos específicos. Los ejemplos se proporcionan para ilustración solamente y no se deben considerar como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Función de la señalización del inflamasoma mediada por EV en ALI después de TBI y efectos de su neutralización

La disfunción pulmonar se presenta frecuentemente como una complicación de Lesión Cerebral Traumática Grave (1). Aproximadamente 20-25 por ciento de sujeto con TBI desarrollan lesión pulmonar aguda (ALI) (2), pero los mecanismos que median la patología de ALI inducida por TBI siguen siendo deficientemente definidas. La literatura previa ha soportado la idea de que la disfunción pulmonar después de la TBI es debido a la respuesta simpática a la presión intracraneal incrementada que conduce a disfunción cardiopulmonar (42). Estudios más recientes, sin embargo, han mostrado que una respuesta inflamatoria sistémica también desempeña una función clave en la lesión pulmonar inducida por TBI (43). Específicamente, la ruta del receptor del ligando HMGB1-RAGE sirve como un mecanismo de transducción central para la disfunción pulmonar después de la TBI (8). Además, HMGB1 induce a activación de inflamasoma AIMS (37). Además la literatura previa revela que los patógenos secretan EV que llevan DAMPs, tal como HMGB1, y desencadenan la inflamación (Buzas y colaboradores, 2014). Varios estudios han mostrado que la barrera hematoencefálica

(BBB) es permeable después de la TBI tan temprano como 3-6 horas después de la lesión dando por resultado daño a la barrera protectora entre el cerebro y el compartimiento intravascular y conduce a la fuga de proteínas y fluido (44). La alteración de la BBB después de la lesión da por resultado la secreción de mediadores inflamatorios, tal como DAMPs, que pueden aumentar la inflamación cerebral y dañar los órganos distales (5). Varios mediadores inflamatorios pueden actuar como marcadores claros de lesión cerebral, sin embargo, su validez no está ampliamente aceptada (45). Además, actualmente no existe ningún tratamiento o marcador biológico clínicamente aprobado para la ALI inducida por TBI. Recientemente, la EV ha sido un área de interés en la búsqueda de biomarcadores para una variedad de tipos diferentes de enfermedades, incluyendo lesión pulmonar (46) y TBI (47). Se ha mostrado previamente que en la EV aislada del líquido cefalorraquídeo del paciente con TBI, existe un incremento de proteínas de inflamasoma cuando se comparan a muestras de control (14). En este ejemplo, se examinó la contribución de la señalización de inflamasoma mediada por EV en la etiología de ALI inducida por TBI.

Materiales y Métodos

Animales y Lesión Cerebral Traumática

Todos los procedimientos animales fueron aprobados por the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Miami Miller School of Medicine (Animal Welfare Assurance A3224-01) y se hicieron de acuerdo con la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Se siguieron las directrices ARRIVE cuando se condujo este estudio. Todos los ratones C57/BL6 fueron de 8-12 semanas y de 24 a 32 gramos. Los ratones se eligieron al azar prospectivamente a grupos experimentales (simulación, 4h, 24) para TBI, grupos experimentales (sin tratamiento previo, solución salina simulada, no tratada, enoxaparina, anti-ASC) para transferencia adoptiva y tratamiento. Para los grupos de experimento TBI, los animales falsos se sometieron a procedimiento quirúrgico pero no se lesionaron. Para estudios de tratamiento de transferencia adoptiva, el grupo de solución salina simulado se sometió a procedimientos quirúrgicos y recibió solución salina como tratamiento de vehículo. Los animales sin tratamiento previo no se sometieron a procedimientos quirúrgicos. Un tamaño de muestra de 5 a 6 se usó para cada grupo basado en el análisis de potencia (usando el análisis de potencia G^* , con un tamaño de efecto $F=0.85$, α un conjunto 0.05) y datos históricos^{49, 50}. Todos los ratones se alojaron en la instalación animal sin antígenos virales (VAF) en the Lois Pope Life Center at the University of Miami en sitios de luz/oscuridad de 12 horas y se suministró a alimento y agua ad libitum. La instalación lleva a cabo procedimientos de cría dos veces por semana y comprueba diariamente las condiciones de los animales. Los animales se observaron pos-operatorio, donde se mantuvieron en una almohadilla de calentamiento y se controló la temperatura corporal con una sonda rectal

donde se mantuvo a 37°C, en las salas de operaciones de los inventores y después se transfirió a los cuartos de los animales.

Antes de la cirugía los animales se anestesiaron con cetamina y xilacina (intraperitoneal, i.p.). Los animales anestesiados entonces se colocaron en una almohadilla de calentamiento para asegura una temperatura corporal de 37°C. Se llevó a cabo la TBI usando un modelo de Impacto Cortical Controlado (CO). Se hizo una craneotomía de 5 mm en la corteza derecha (---2.5 mm posterior, 2.0 mm lateral de Bregma). Se indujo la lesión usando el dispositivo ECCI-6.3 (Custom Design y Fabrication, Richmond, VA, EUA) con un 3 mm impounder a 6 m/s de velocidad, 0.8 mm de profundidad, y 150 ms de duración de impacto (15). Después de estos procedimientos los animales se regresaron a sus jaulas y se les proporcionó alimento y agua. Los animales se sacrificaron a 4 horas y 24 horas después de la TBI como se describe. Los animales falsos se anestesiaron y se sometieron a la misma incisión pre-quirúrgica como animales lesionados pero no se sometieron a una craneotomía o contusión.

15

Recolección del tejido

Todos los animales se anestesiaron con cetamina y xilacina, antes de la perfusión. Los animales entonces se sometieron a perfusión traqueal. Los pulmones se enfundaron con 4% de paraformaldehído (PFA) usando un catéter traqueal a 20 cm H₂O y después se fijaron en 4% de PFA durante la noche a 4°C. Los tejidos pulmonares fijos se incrustaron en parafina y se procesaron secciones de 5 µm (16). Se recolectó el tejido pulmonar derecho para aislamiento de proteínas y análisis moleculares. Los animales después se sometieron a decapitación y se recolectó el tejido cortical derecho para aislamiento de proteínas y análisis moleculares.

25

Ensayo de aislamiento de Piroptosoma

Lisados de tejido pulmonar de ratón se filtraron a través de una membrana (Millipore) de difluoruro de polivinilideno de bajo enlace (PVDF) de 5µm. Después de la filtración, el sobrenadante se centrifugó a 2,700 xg durante 8 minutos. La pelletilla se volvió a suspender en 40 µl de solución amortiguadora de ácido 3[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-propanosulfónico (CHAPS) (20 mmol/L de HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mmol/L de MgCl₂, 0.5 mmol/L de EGTA, 0,1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, coctel inhibidor de proteasa, y 0.1% CHAPS). El piroptosoma se formó en pelletillas por centrifugación a 2,700 xg durante 8 minutos. La pelletilla después se volvió a suspender y se incubó en 27.8 µl de solución amortiguadora CHAPS con 2.2 µl de sustrato de disuccinimidilo (9) durante 30 minutos a temperatura ambiente para reticular los dímeros ASC. Por último, se agregó una cantidad igual de solución amortiguadora 2x Laemmli y las proteínas se analizaron por inmunotinción usando anticuerpos comercialmente disponibles a ASC y Gasdermina D (GSD).

35

Extracción Nuclear y Citoplásmica

Se extrajeron fracciones nucleares y citoplásmicas usando los Reactivos de Extracción Nuclear y Citoplásmica NE-PER (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de tejido pulmonar de ratones se cortaron en piezas de
 5 20-100 mg y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. Las piezas del tejido se homogeneizaron con el Reactivo de Extracción Citoplásmico y se centrifugaron a 16,000 x g durante 5 minutos. Después el sobrenadante (extracto celular) se removió y la pellet se centrifugó con el Reactivo de Extracción Nuclear (Thermo Scientific) a 16,000 x g durante 10 minutos. Este sobrenadante correspondió a la fracción nuclear, que se removió y se almacenó
 10 a -80° C.

Inmunotinción

Muestras de tejido pulmonar y cerebral se congelaron de manera instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron en -80°C. Secciones de 2-mm del tejido pulmonar inferior derecho y cortical derecho se homogeneizaron en solución amortiguadora de extracción que contiene
 15 coctel inhibidor de proteasa y fosfatasa (Sigma, St Louis, MO, EUA) y se resolvió en 4-20% de geles pre-vaciados Tris-TGX Criterion (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) como se describe en de Rivero Vaccari y colaboradores 2015 (13) usando anticuerpos para caspasa-1 (Novus Biologicals), ASC (Santa Cruz), IL-1 β (Señalización Celular), IL-18 (Abcam) AIM2 (Santa Cruz) y HMGB1 (Millipore). La cuantificación de la densidad de banda se llevó a cabo usando
 20 Imagen Lab y todos los datos se normalizaron a β -actina.

Inmunohistoquímica

Secciones de tejido se desparafinizaron en xileno y después se rehidrataron usando etano y solución salina amortiguada Tris. Los procedimientos inmunohistoquímicos entonces se llevaron a cabo para tinción doble como se describe previamente (16). Las secciones se
 25 incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos contra Caspasa-1 y ASC (Millipore), AIM2 (Santa Cruz), HMGB1 (Millipore) y SPC (Millipore). Se examinaron secciones pulmonares inmunoteñidas de ratones falsos, de 4 y 24 horas, con un microscopio confocal de exploración láser Zeiss (Zeiss, Inc., Thornwood, NY, EUA). Las secciones pulmonares fueron analizadas por individuos que estaban cegados a los grupos.

Aislamiento EV

Los EV se aislaron de suero de ratones lesionados con TBI y los ratones lesionados usando la solución de Aislamiento de Exosoma Total de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, se centrifugaron μ l de cada muestra a 2000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante después se incubó con 20 μ l de reactivo de Aislamiento de Exosoma Total
 35 (TEI) durante 30 minutos a 4°C seguido por centrifugación a 10,000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaron los sobrenadantes y se volvió a suspender la pellet en 100 μ l de PBS. Los EV se caracterizaron por la expresión de CD81 y por el análisis de

Rastreo Nanosight (FIGURA 6).

Transferencia Adoptiva de EV

EV derivado de suero de C57BL-6 TBI y ratones falsos se inyectaron en ratones C57BL-6 sin tratamiento previo a través de la vena yugular en una dosis de 1.0×10^{10} partículas por gramo/peso corporal ⁴⁸. El conteo de partículas se midió por el análisis de Rastreo Nanosight y las muestras se diluyeron por consiguiente. Antes de la cirugía se anestesiaron los animales con cetamina y xileno. Se hizo una incisión de 1-2 cm entre la mandíbula y la clavícula. La vena yugular se elevó y se ató, seguido por la colocación de un catéter. Se transfirieron EV derivadas de suero y se recolectaron los tejidos pulmonares y cerebrales 24 horas después de la inyección para análisis (n=5).

Tratamiento de Enoxaparina y Anti-ASC

EV derivada de suero de ratones con TBI se inyectaron en ratones C57-BL6 sin tratamiento previo a través de una inyección en la vena yugular. Una hora después, la Enoxaparina (3 mg kg) (n=4) y Anti-ASC (5mg kg) (n=4) se administraron a los animales recipientes. Se usaron los siguientes grupos: 1) el grupo sin tratamiento previo no recibió tratamiento, 2) se usó el grupo de solución salina simulado o como un control negativo y se sometió a inyección en la vena yugular de solo solución salina, 3) el grupo no tratado recibió EV de los ratones con TBI sin cualquier tratamiento y se usó como un control positivo, 4) el grupo ENOX recibió EV de ratones con TBI y Enoxaparina, y 5) el grupo Anti-ASC recibió EV de los ratones con TBI y Anti-ASC. Fu aleatorio el orden de tratamiento. Los tejidos pulmonares y cerebrales se recolectaron 24 horas después de la inyección para el análisis. Cabe destacar que el anticuerpo anti-ASC usado en los experimentos de tratamiento fue un anticuerpo monoclonal humanizado contra ASC y reconoce la ADC de murino, humana y cerdo.

Histología y Puntuación de la Lesión Pulmonar

Se tiñeron secciones de tejido pulmonar con un método de hematoxilina y eosina estándar para histología, morfometría y puntuación de ALI. Secciones del pulmón se puntuaron por un patólogo ciego usando el Sistema de Puntuación de Lesión Pulmonar de the American Thoracic Society Workshop Report (17). Se eligieron veinte campos de potencia alta aleatorios para puntuación. Los criterios para la puntuación de ALI se basaron en el número de neutrófilos en el espacio alveolar, espacio intersticial, membranas hialinas, restos proteínicos tiñeron los espacios de aire y el engrosamiento septal alveolar. Basado en estos criterios se dio una puntuación entre 0 (sin lesión) y 1 (lesión grave).

Análisis Estadísticos

Los datos usando una prueba T de Student para dos grupos y un ANOVA de una vía seguido por múltiples pruebas de comparación de Tukey, (GraphPad Prism versión 7.0) para dos o más grupos. Se usó la prueba de D'Agostino-Pearson para probar la normalidad. Los datos se expresan como media +/-SEM. Los valores P de significancia usados fueron * p<0.05.

Resultados

La TBI grave incrementa las proteínas de inflammasoma AIM2 y la expresión de HMGB1 en el cerebro de ratones

Los niveles excesivos de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β e IL-18, y las proteínas de inflammasoma se asocian con daño secundario después de la lesión cerebral por percusión de fluido (18). Para determinar si el CCI grave indujo el procesamiento de citoquinas pro-inflamatorias y alteraciones en niveles de proteínas de inflammasoma, se analizaron lisados corticales, sin embargo existe una investigación limitada en la activación de inflammasoma en la TBI grave. En este Ejemplo, después del CCI grave, examinaron los lisados corticales para los niveles de caspasa-1 (FIGURA 1A, 1B) ($p < .001$), ASC (FIGURA 1A, 1C) ($p = .003$), IL-18 (FIGURA 1A, 1D) ($p = .0042$), AIM2 (FIGURA 1A, 1F) ($p = 0.0197$) e IL-1 β (FIGURA 1A, 1G) ($p = 0.0141$) en 4 y 24 horas después de la lesión. Los niveles de caspasa-1, ASC, AIM2, e IL-1 β se elevaron a 4 horas después del CCI y se redujeron por 24 horas. El curso del tiempo de maduración de las citoquinas inflamatorias se diferenció ligeramente pero alcanzó su máximo por 24 horas después de TBI. Puesto que otros han mostrado una función para el inflammasoma DAMP HMGB1 que activa el inflammasoma AIM2, los niveles de estas proteínas también se determinaron en los lisados corticales. Como se muestra en las FIGURAS 1A, 1E, el CCI indujo un incremento significativo en los niveles de HMGB1 (FIGURAS 1A, 1E) ($p = 0.0121$) en 4 y 24 horas después de la lesión. Estos datos indican que después del CCI grave en los ratones, los niveles de las proteínas inflammasoma AHV12 se elevaron significativamente en la corteza después de la lesión.

La TBI grave incrementa la proteína de inflammasoma ATJVI2 y la expresión HMGB1 en los pulmones de ratones

Para determinar si el CCI indujo la activación del inflammasoma en los pulmones, se llevó a cabo un análisis de inmunotinción de lisados pulmonares para la caspasa-1 (FIGURA 1H, 1I) ($p = .0026$), ASC (FIGURA 1H, 1J) ($p = .0427$), IL-18 (FIGURA 1H, 1K) ($p = .0025$), IL-1 β (FIGURA 1H, 1N) ($p = .0012$) y AIM2 (FIGURA 1H, 1M) ($p < .001$), y NLRP3 ($p = .0047$) (FIGURA 1A-1N complementaria). El nivel incrementado de caspasa-1, ASC, IL-18 y AIM2 se incrementó significativamente a 4 horas y 24 horas después de la lesión como es comparado con el control simulado. Sin embargo, el curso de tiempo del incremento en la expresión de la proteína difirió ligeramente de aquel observado en el cerebro en la cual alcanzó su máximo 24 horas después de CCI. Puesto que el HMGB1-RAGE desempeña una función en el mecanismo por el cual la TBI induce la disfunción pulmonar (8), se analizaron lisados pulmonares para niveles de la expresión de la proteína HMGB1. Las FIGURAS 1H, 1L ($p = .0158$) muestran que la expresión de HMGB1 se incrementó a 4 y 24 horas después de la TBI, indicando que el inflammasoma AIM2 y HMGB1 desempeñaron una función en la respuesta inflamatoria en los pulmones post-TBI.

La TBI induce la piroptosis en los pulmones de ratón

Como se mostró previamente, la activación del inflamasoma A1M2 en las neuronas corticales conduce a muerte celular piroptótica (19). Para investigar si la TBI da por resultado piroptosis en el tejido pulmonar en los ratones, el piroptosoma en el tejido pulmonar se aisló después de la TBI. Los animales con TBI, sacrificados 4 horas post-lesión mostraron evidencia de oligomerización de ASC comparados con los animales falsos (FIGURA 4A). Los dímeros de ASC, y trímeros se observaron en los animales con TBI (50, 75 kDA respectivamente). Estos resultados fueron indicativos de la formación de piroptosoma, que se puede caracterizar por el montaje supramolecular de oligómeros ASC. Además, la gasdermina D (GSDMD), que se escinde en la activación de caspasa-1 y desencadena la piroptosis y la liberación de IL-1 β (20), se incrementó significativamente en los pulmones de animales con TBI comparados con los simulados (FIGURA 4B y 4C) ($p=0.0001$). Estos descubrimientos indicaron que la piroptosis contribuye en la muerte celular en el tejido pulmonar después de la TBI.

15

La TBI incrementa la inmunoreactividad de proteínas de inflamasoma en las células epiteliales alveolares tipo II.

La TBI puede conducir a la fuga capilar, dando por resultado permeabilidad vascular incrementada y daño a las células epiteliales alveolares especializadas, llamadas neumocitos tipo II (5). Para examinar los efectos celulares de la TBI en la expresión de inflamasoma en los pulmones después de la lesión, se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico en las lesiones pulmonares de los animales lesionados a 4 horas, y 24 horas falsos. Células epiteliales alveolares Tipo II se sabe que son el tipo principal de células pulmonares lesionadas en ALI (17). Se tiñeron secciones de pulmón con anticuerpos contra AIM2, caspasa-1, y ASC (verde) y se co-tiñeron con proteína C Pro-surfactant (Pro-SPC, rojo), un marcador de células epiteliales tipo II, y tinción nuclear DAPI (azul). Como se muestra en la FIGURA 2A-2C, la caspasa-1 activa (FIGURA 2A), ASC (FIGURA 2B), así como AIM2 (FIGURA 2C) están presentes en las células positivas de SPC (flechas). La inmunoreactividad de estas proteínas de inflamasoma se incrementó después de la TBI. Estos descubrimientos indican que las proteínas de inflamasoma se expresan en las células epiteliales alveolares tipo II y que la TBI da por resultado inmunoreactividad incrementada en estas células.

30

La TBI incrementa la expresión de HMGB1 nuclear y citoplásmica

A fin de determinar la distribución celular de HMGB1 en las célula pulmonares después de la TBI, se aislaron fracciones nucleares y citoplásmicas de homogenados de pulmón (FIGURA 3A, 3C) ($p=.0337$). La inmunotinción indicó que ambas fracciones tuvieron incrementos significativos en la expresión de HMGB1 a 4 horas post-TBI (FIGURA 3B, 3D) ($p=.0345$). El análisis inmunohistoquímico de HMGB1 también se llevó a cabo a fin de determinar los

35

cambios en la inmunoreactividad en las secciones pulmonares después de la TBI. Las secciones se co-tiñeron para HMGB1 (verde) y SPC (rojo) y tinción nuclear DAPI (azul). La inmunoreactividad de HMGB1 se implementó a 4 horas y 24 horas cuando se comparó con la simulación. Se observó inmunoreactividad débil de HMGB1 en las células positivas de SPC (flecha) (FIGURA 3E); por lo tanto, sugiriendo que los cambios HMGB1 en el tejido pulmonar lesionado pueden ser citoplásmicos.

La TBI induce cambios en la morfología del pulmón e induce ALI

ALI se puede caracterizar por procesos inflamatorios que conducen a edema alveolar e intersticial así como infiltración de células inflamatorias en el espacio alveolar (23). El análisis histopatológico del tejido pulmonar (FIGURA 5A) indica que la TBI grave provoca cambios sustanciales en la arquitectura del pulmón y la morfología a 4 y 24 horas después la lesión. Los animales falsos mostraron una morfología alveolar normal, mientras que los animales lesionados mostraron cambios agudos en el edema alveolar pero se redujo ligeramente por 24 horas después de la lesión (flechas largas). Además, hubo evidencia de infiltración de neutrófilos (cabezas de flecha) y cambios en la morfología de las membranas capilares alveolares (*) en ambos puntos de tiempo. Los animales lesionados mostraron signos de edema intersticial, que fue más pronunciada 4 horas pos-lesión, pero aún fue evidente a 24 horas pos-lesión (flechas cortas). Por último, los animales lesionados también mostraron evidencia de engrosamiento del lado intersticial y el septo alveolar (libra, #).

Para confirmar que la lesión grave induce ALI, se analizaron secciones histológicas usando el sistema de puntuación ALI definido por the American Thoracic Society (17). Este sistema se basa en la evidencia de infiltración de neutrófilos en los espacios alveolares e intersticiales, la formación de membrana y hialina, restos proteínicos que llenan los espacios de aire, y engrosamiento del septo alveolar (17). Estas características se elevaron significativamente en los animales lesionados y las puntuaciones ALI fueron más altas en general en los animales con TBI comparados con los falsos (FIGURA 5B) ($p=0.0017$).

Tratamiento con enoxaparina y anticuerpo anti-ASC reduce significativamente la expresión de inflammasoma y la ALI después de la transferencia adoptiva de EV de ratones con TBI

A fin de proporcionar evidencia de que la EV y su carga que se puede liberar en la circulación después de que la TBI puede inducir activación de inflammasoma en el pulmón, se llevó a cabo un experimento de transferencia adoptiva clásico usando EV derivada de suero de ratones con CCI grave. Se validaron preparaciones de EV usando el análisis de Western Blot para el marcador de EV CD81 (FIGURA 6). Los controles recibieron EV aislado de animales falsos sin tratamiento previo. Como se muestra en la FIGURA 7A-7F, la caspasa-1 activa (FIGURA 7A, 7B), ASC (FIGURA 7A, 7C), IL-18 (FIGURA 7A, 7D), AIM2 (FIGURA 7A, 7E) y HMGB1 (FIGURA 7A, 7F) se elevaron significativamente en los pulmones de los animales que

recibieron la EV de los animales lesionados con TBI cuando se compararon con los pulmones de los animales que recibieron EV de los ratones no lesionados o sin tratamiento previo o ratones sin tratamiento previo. Además, la infiltración de células inflamatorias (flechas) fue evidente en los pulmones tratados con EV de ratones con TBI (FIGURA 7G). Por último, la puntuación ALI también fue significativamente más alta en los animales que recibieron EV de ratones lesionados (FIGURA 7H). Estos estudios proporcionaron evidencia para un eje de inflammasoma respiratoria neural en el cual la EV liberado en la circulación después de la TBI activan el inflammasoma en las células objetivo pulmonares que contribuyen a la patogénesis de ALI.

A continuación, se intentó el bloqueo de captación de exosoma por el tratamiento con ya sea Enoxaparina o un anticuerpo monoclonal contra ASC después de la transferencia adoptiva de EV de ratones lesionados sin tratamiento previo. Los animales de control negativos recibieron solución salina y los animales de control positivo no recibieron tratamiento. Como se muestra en la FIGURA 8A-8F, la Caspasa-1 (FIGURA 8A, 8B), ASC (FIGURA 8A, 8C), IL-1 β (FIGURA 8A, 8D), AIM2 (FIGURA 8A, 8E), y HMGB1 (FIGURA 8A, 8F) se redujeron significativamente ($p < .0001$) como es comparado con el grupo no tratado (control positivo) después del tratamiento con Enoxaparina o un anticuerpo anti-ASC monoclonal humanizado (por ejemplo anticuerpo IC 100). Además, secciones pulmonares teñidas con H&E mostraron infiltración de neutrófilos significativamente menor en el espacio alveolar intersticial así como nada de signos de engrosamiento septal (FIGURA 9A-9D). Las puntuaciones ALI para los animales tratados con Enoxaparina y anticuerpo anti-ASC (IC 100) fueron significativamente menores comparados con el grupo no tratado (FIGURA 9E) ($p < .0001$). De esta manera, la EV liberada en la circulación después de la TBI desempeña una función en la activación de inflammasoma en las células pulmonares que conducen a la ALI.

Conclusiones

La TBI se puede asociar con mayores tasas de ciertas complicaciones médicas, especialmente disfunción del sistema nervioso central y pulmonar. En este ejemplo, la TBI grave se muestra que incrementa HMGB1 y la expresión de inflammasoma (por ejemplo, expresión de AIM2, caspasa-1 y ASC) en el tejido cortical y pulmonar e induce cambios en la morfología pulmonar consistente con ALI (por ejemplo, infiltración de neutrófilos en el espacio alveolar e intersticial, engrosamiento septal alveolar, y edema alveolar y hemorragia) e introduce la idea de un Eje Inflamatorio Respiratorio Neural. De manera importante, la TBI dio por resultado piroptosis en un tejido pulmonar (por ejemplo, presencia de edición de GSDMD) y expresión incrementada de proteínas de inflammasoma en las células epiteliales alveolares tipo II. Adicionalmente, la transferencia adoptiva de EV de ratones con TBI activo el inflammasoma e indujo la ALI, indicando que la lesión cerebral induce la liberación de EV que contiene una carga de proteínas de inflammasoma que después resultan en ALI. Por otra parte,

se mostró que tanto la inhibición de la captación de EV (Enoxaparina) como activación de inflammasoma (tratamiento con anticuerpo anti-ASC (IC 100)), existe una reducción en la expresión de la proteína de inflammasoma y en el desarrollo de ALI.

En resumen, este ejemplo mostró que la señalización de inflammasoma AIM2 desempeña una función central en el patomecanismo de la lesión pulmonar después de la TBI y muestra un mecanismo de ALI inducida por TBI que implica señalización de inflammasoma mediada por EV. Estos datos proporcionaron evidencia de que la señalización de inflammasoma mediada por EV puede desempeñar una función central en implicar un Eje Inflamatorio Respiratorio Neuronal. Por lo tanto, la orientación de este eje con los anticuerpos con las proteínas de inflammasoma o fármacos que bloquean la captación de EV puede proporcionar un procedimiento terapéutico en la ALI inducida por Neurotraumatismo en todas las áreas de medicina de cuidado crítico. En vista de estos resultados, las estrategias terapéuticas descritas pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del pulmón en general.

Incorporación a manera de referencia

Las siguientes referencias se incorporan a manera de referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

1. Pfeifer R y colaboradores (2015) Development of a standardized trauma-related lung injury model. *J Surg Res* 196(2):388-394.
2. Summers CR, Ivins B, y Schwab KA (2009) Traumatic brain injury in the United States: an epidemiologic overview. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 76(2): 105-110.
3. Erickson SE, y colaboradores (2009) Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Crit Care Med* 37(5): 1574-1579.
4. Nicolls MR y Laubach VE (2014) Traumatic brain injury: lungs in a RAGE. *Sci Transl Med* 6(252): 252fs234.
5. Rincon F, y colaboradores (2012) Impact of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after traumatic brain injury in the United States. *Neurosurgery* 71(4):795-803.
6. Andersson U y Rauvala H (2011) Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity. *J Intern Med* 270(4): 296-300.
7. Weber DJ, y colaboradores (2014) The HMGB 1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation. *Sci Transl Med* 6(252):252ral24.
8. Lu B, y colaboradores (2012) Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 488(7413): 670-674.

9. de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, y Keane RW (2014) Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34(3): 369-375.
- 5 10. Ware LB y Matthay MA (2000) The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 342(18):1334-1349.
11. Yanez-Mo M, y colaboradores (2015) Biological properties of extracellular and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066.
- 10 12. Qu Y, Franchi L, Nunez G, y Dubyak GR (2007) Nonclassical IL-1 β secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179(3): 1913-1925.
13. de Rivero Vaccari JP, y colaboradores (2015) Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *J Neurochem.* Jan;136 Suppl 1 :39-48. doi: 10.1111/jnc.13036.
- 15 14. Atkins CM, Cepero ML, Kang Y, Liebl DJ, y Dietrich WD (2013) Effects of early rolipram treatment on histopathological outcome after controlled cortical impact injury in mice. *Neurosci Lett* 532: 1-6.
15. Wu S, y colaboradores (2010) Conditional overexpression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 42(5): 552-563.
- 20 16. Matute-Bello G, y colaboradores (2011) An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44(5):725-738.
17. de Rivero Vaccari JP, y colaboradores (2009) Therapeutic neutralization of the NLRP1 inflammasome reduces the innate immune response and improves histopathology after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29(7): 1251-1261.
- 25 18. Adamczak SE, y colaboradores (2014) Pyroptotic neuronal cell death mediated by the AIM2 inflammasome. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34(4): 621-629.
- 30 19. Liu X, y colaboradores (2016) Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535(7610):153-158.
20. Dolinay T, y colaboradores (2012) Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 185(11): 1225-1234.
- 35 21. Muller MC, y colaboradores (2014) Contribution of damage-associated molecular patterns to transfusion-related acute lung injury in cardiac surgery. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 12(3):368-375.

22. Ragaller M y Richter T (2010) Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Journal of emergencies, trauma, and shock* 3(1):43-51.
23. Lee K & Rincon F (2012) Pulmonary complications in patients with severe brain injury. *Critical care research and practice* 2012:207247.
- 5 24. Yasui H, Donahue DL, Walsh M, Castellino FJ, y Ploplis VA (2016) Early coagulation events induce acute lung injury in a rat model of blunt traumatic brain injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 31 1(1):L74-86.
25. Hendrickson CM, y colaboradores (2016) The acute respiratory distress syndrome following isolated severe traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*.
- 10 26. Cross LJ y Matthay MA (2011) Biomarkers in acute lung injury: insights into the pathogenesis of acute lung injury. *Crit Care Clin* 27(2):355-377.
27. Butt Y, Kurdowska A, y Allen TC (2016) Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. *Archives of pathology & laboratory medicine* 140(4):345-350.
28. Luh SP y Chiang CH (2007) Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 8(1):60-69.
- 15 29. Matute-Bello G y Martin TR (2003) Science review: apoptosis in acute lung injury. *Critical care* 7(5):355-358.
30. Miao EA, Rajan JV, y Aderem A (2011) Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews* 243(1): 206-214.
- 20 31. Hornung V, y colaboradores (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514-518.
32. Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, y Lo YM (2003) Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clinical chemistry* 49(8): 1286-1291.
- 25 33. Fernandes-Alnemri T y Alnemri ES (2008) Assembly, purification, and assay of the activity of the ASC pyroptosome. *Methods Enzymol* 442:251-270.
34. Man SM y Kanneganti TD (2016) Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 16(1):7-21.
- 35 35. Liu L, y colaboradores (2014) HMGB1-DNA complex-induced autophagy limits AIM2 inflammasome activation through RAGE. *Biochem Biophys Res Commun* 450(1):851-856.
- 30 36. Hoesch RE, y colaboradores (2012) Acute lung injury in critical neurological illness. *Critical care medicine* 40(2):587-593.
37. Kalsotra A, Zhao J, Anakk S, Dash PK, y Strobel HW (2007) Brain trauma leads to enhanced lung inflammation and injury: evidence for role of P4504Fs in resolution. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27(5):963-974.

38. Hay (2015) Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol* 74(12): 1147-1157.
39. Zygun DA, Kortbeek JB, Fick GH, Laupland KB, y Doig CJ (2005) Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury. *Critical care medicine* 33(3):654-660.
40. Peltz ED ME, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, Sauaia A, Silliman CC, Banerjee A, Abraham E. (209) HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock* 32(1): 17-22.
41. Chi W, y colaboradores (2015) HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF-kappaB pathway in acute glaucoma. *Journal of neuroinflammation* 12: 137.
42. Woodcock T y Morganti-Kossmann MC (2013) The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in neurology* 4: 18.
43. Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, y Lee JW (2016) Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert opinion on biological therapy* 16(7):859-871.
44. Taylor DD y Gercel-Taylor C (2014) Exosome platform for diagnosis and monitoring of traumatic brain injury. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369(1652).
45. Guo H, Callaway JB, y Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* 21(7):677-687.
46. Silverman WR, y colaboradores (2009) The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 284(27): 18143-18151.
47. Tomura S, de Rivero Vaccari JP, Keane RW, Bramlett HM, y Dietrich WD (2012) Effects of therapeutic hypothermia on inflammasome signaling after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(10): 1939-1947.
48. Wiklander, O.P., Nordin, J.Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mager, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Smith, C.I., Le Blanc, K., Macchiarini, P., Jungebluth, P., Wood, M.J. and Andaloussi, S.E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* 4, 26316.
49. de Rivero Vaccari, J.P., Lotocki, G, Marcillo, A.E., Dietrich, W.D. y Keane, R.W. (2008). A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28, 3404-3414.
50. Assis-Nascimento, P., Umland, O., Cepero, M.L. and Liebl, D.J. (2016). A flow

cytometric approach to analyzing mature and progenitor endothelial cells following traumatic brain injury. *J Neurosci Methods* 263, 57-67.

Ejemplo 2: Función de la señalización de inflamasoma mediada por EV en ALI después de la TBI en pacientes humanos

- 5 Como un seguimiento a los experimentos en los ratones en el Ejemplo 1, se examinó la función de la EV aislada de pacientes con TBI humanos en la señalización de inflamasoma en células endoteliales pulmonares humanas.

En un primer experimento, la EV derivada de suero se aisló de pacientes con TBI y control usando el kit de Aislamiento de Exosoma Total (Thermofisher). Se cultivaron y se colocaron en placas Células Endoteliales Microvasculares Humanas Pulmonares (HMVEC-Lonza) en una placa de 12 pocillos. Después se alcanzó la confluencia, la EV aislada de pacientes con TBI y control se suministraron (1.94×10^8 partículas/ml) a las células para un período de incubación de 4 horas. Después de la incubación se recolectaron las células con 200 μ l de solución amortiguadora de lisis y los lisados celulares se usaron para análisis de Western Blot.

En un segundo experimento, se aislaron EV derivadas de suero de pacientes con TBI y control usando el kit de Aislamiento de Exosoma Total (Thermofisher). Se cultivaron y se colocaron en placas Células Endoteliales Microvasculares Humanas Pulmonares (HMVEC-Lonza) en una placa de 96 pocillos. Después de que se alcanzó la confluencia, la EV aislada de pacientes con TBI y control se suministraron (1.94×10^8 partículas/ml) a las células para un período de incubación de 3 horas y después 1 hora adicional con caspasa-1 FAM FLICA (Immunohistochemistry Technologies) con una relación de volumen a volumen de 1:30. Después de la incubación, el medio se removió y las células se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de apoptosis (Immunohistochemistry Technologies). Las células se co-tiñeron con Hoechst para tinción nuclear y Yoduro de Propidio para muerte celular. Se tomaron imágenes usando un microscopio EVOS y después las células se leyeron bajo un lector de placas fluorescente en una longitud de onda de excitación de 492 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

Resultados

- 30 Como se muestra en la FIGURA 10A-10F, la administración de EV derivada de suero de pacientes con TBI incrementó la expresión de la proteína de inflamasoma en las células endoteliales pulmonares. La FIGURA 10A-10E mostró que la caspasa-1, ASC, AIM2, y HMGB 1 se elevaron en PMVEC incubado con TBI-EV durante 4 horas como es comparado con PMVEC incubado con EV de control durante 4 horas. Los resultados del inmunoensayo mostraron un incremento significativo en la expresión de IL-1 β usando el ensayo Ella simple plex (FIGURA 10F).

Como se muestra en la FIGURA 11A-11C, el suministro de TBI-EV a las células

endoteliales pulmonares incrementó la inmunoreactividad de la caspasa-1 y la muerte celular.

Conclusión

Estos estudios proporcionaron evidencia adicional para un eje de inflammasoma respiratoria neural en el cual la EV se liberó en la circulación después de que la TBI activa el inflammasoma en las células objetivo pulmonares que contribuyen en la patogénesis de ALI.

Las diversas modalidades descritas en lo anterior se pueden combinar para proporcionar modalidades adicionales. Todas las patentes de E.U.A., publicaciones de solicitud de patente de E.U.A., solicitud de patente de E.U.A., patentes extranjeras, solicitud de patente extranjera y publicaciones no de patente referidas en esta especificación se incorpora en la presente a manera de referencia, en su totalidad. Los aspectos de las modalidades se pueden modificar, si es necesario para emplear conceptos de las diversas patentes, solicitud y publicaciones para proporcionar todavía modalidades adicionales.

Estos y otros cambios se pueden hacer a las modalidades en vista de la descripción detallada anterior. En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos usados no se debe considerar que limiten las reivindicaciones a las modalidades específicas descritas en la especificación y las reivindicaciones, pero se deben considerar para incluir todas estas posibles modalidades junto con el alcance completo de las equivalentes a las cuales estas reivindicaciones tienen derecho. Por consiguiente, las reivindicaciones no se limitan por la descripción.