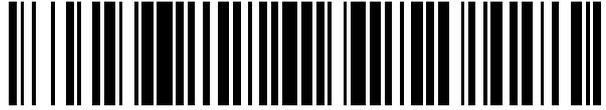


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 574**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/15** (2015.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2016 PCT/US2016/045739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17024213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 16751781 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3331538**

54 Título: **Modulación de la activación del inflammasoma de células supresoras derivadas de mieloides para el tratamiento de GvHD o tumor**

30 Prioridad:

**06.08.2015 US 20156220190 P**

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

**26.10.2020**

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA (25.0%)  
600 McNamara Alumni Center 200 Oak Street SE  
Minneapolis, MN 55455-2020, US;  
THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT  
CHAPEL HILL (25.0%);  
ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITAET FREIBURG  
(25.0%) y  
ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL  
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**BLAZAR, BRUCE R.;  
KOEHN, BRENT H.;  
MURRAY, PETER J.;  
TING, JENNY P. Y.;  
ZEISER, ROBERT y  
MILLER, JEFF S.**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 789 574 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Modulación de la activación del inflamasoma de células supresoras derivadas de mieloides para el tratamiento de GvHD o tumor

5 Resúmen

La presente invención es como se define en las reivindicaciones y se refiere a una pluralidad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) deficientes en la proteína similar a mota asociada a apoptosis que contiene una CARD (ASC) (MDSC deficientes en ASC) para usar en un método de tratamiento para un sujeto que tiene o está en riesgo de tener enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), el método comprende: administrar al sujeto una pluralidad de MDSC deficientes en ASC.

15 En la medida en que se describen otros usos de MDSC en la presente descripción, estos se incluyen únicamente con fines de referencia.

20 Esta descripción describe, en un aspecto, un método para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener enfermedad de injerto contra huésped (GvHD). Generalmente, el método incluye administrar al sujeto una pluralidad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) efectivas para mejorar al menos un síntoma o signo clínico de enfermedad de injerto contra huésped en comparación con un sujeto control adecuado.

En algunas modalidades, el método incluye una pluralidad de administraciones en serie de MDSC ya que las MDSC administradas previamente experimentan la activación del inflamasoma.

25 En algunas modalidades, al menos una parte de la pluralidad de las MDSC comprende una modificación genética que hace que las MDSC resistan la activación del inflamasoma.

En algunas modalidades, el método incluye coadministrar al sujeto un agente que inhibe la activación del inflamasoma.

30 En otro aspecto, esta descripción describe un método para tratar un tumor en un sujeto. Generalmente, el método incluye administrar al sujeto una terapia antitumoral y coadministrar al sujeto un agente incitador de inflamasoma en una cantidad efectiva para aumentar la activación del inflamasoma de las MDSC lo suficiente como para reducir la función supresora de las MDSC.

35 El resúmen anterior de la presente invención no pretende describir cada modalidad descrita o cada implementación de la presente invención. La descripción que sigue ejemplifica más particularmente las modalidades ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona orientación a través de las listas de ejemplos, donde esos ejemplos pueden usarse en diversas combinaciones. El documento núm. WO 2010/062990 se refiere a métodos para aislar, cultivar y diferenciar células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) de células madre embrionarias (ES) y células madre hematopoyéticas (HSC)

40 Highfill y otros (Blood, 2010, 116:25:5738-47) se refiere a células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) de la médula ósea que inhiben la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) a través de un mecanismo dependiente de arginasa-1 que está regulado positivamente por interleucina-13.

45 Messmann y otros (Blood, 2015, 126:9:1138-48) se refiere a MDSC generadas in vitro que previenen la GvHD murina al inducir células T tipo 2 sin desactivar la citotoxicidad antitumoral.

50 Boros y otros (Hum. Immunol., 2010, 71:11:1061-66) se refiere a células supresoras derivadas de mieloides: reguladoras naturales para la tolerancia al trasplante.

Jonleovic y otros (J. Exp. Med., 2013, 210:10:1899-1910) se refiere al inflamasoma N1rp3 que regula la enfermedad aguda de injerto contra huésped.

55 Breve descripción de las Figuras

60 La Figura 1. Las MDSC-IL13 derivadas de la médula ósea mejoran la supervivencia de GvHD, pero la supresión se ve comprometida después de cinco días in vivo. (A) Los receptores BALB/c irradiados letalmente recibieron  $1 \times 10^7$  médula ósea (solo BM) de C57Bl/6, o médula ósea más  $2 \times 10^6$  células T con depleción de CD25 (GvHD) o médula ósea, células T y  $6 \times 10^6$  MDSC-IL13 (GvHD + MDSC-IL13) como se indica. La curva de supervivencia de Kaplan-Meier representa cuatro experimentos agrupados e independientes (n = 40 animales/grupo). GvHD frente a GvHD+MDSC,  $p < 0,0001$ . (B-C) La expresión superficial de MDSC-IL13 (CD45.2<sup>+</sup>) congénica se recuperó del bazo cinco días después de la transferencia a animales irradiados que recibieron solo médula ósea (sin GvHD) o médula ósea más células T (GvHD). Los datos representan tres réplicas por grupo con  $p < 0,001$  para todos los marcadores mostrados. (D) Histogramas representativos que indican la proliferación de células T respondedoras como se indica por la dilución CFSE. Se sembraron en placas MDSC-IL13 purificados de bazos agrupados cinco días después del trasplante a  $5 \times 10^5$ /ml con un

número igual de células T respondedoras marcadas con CFSE, 0.25 µg/ml de AcM anti-CD3ε y 2.5 × 10<sup>5</sup>/ml de esplenocitos depletados en células T irradiadas en 150 µM de medio RPMI L-Arginina especialmente formulado. El histograma sombreado indica la proliferación de controles no estimulados. Los datos son representativos de tres muestras por grupo y un total de tres experimentos independientes. (E) Datos resumidos de las MDSC recuperadas que muestran la viabilidad y el número total de células recuperadas, en el portal CD11b<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup>. Los datos representan tres muestras por grupo y son representativos de tres experimentos independientes. (F) Receptores Balb/c irradiados letalmente trasplantados como anteriormente, o que recibieron tres infusiones consecutivas de MDSC-IL13 como se indica el día 0, día 3 y día 6. Todos los ratones que recibieron MDSC demostraron un aumento de la supervivencia frente a GvHD, p<0,001. MDSC vs MDSC día 0, día 3 y día 6 p<0,0001. La curva de supervivencia representa 20 animales por grupo de dos experimentos independientes, y es representativa de un experimento adicional que administra múltiples infusiones el día 0, el día 7 y el día 14.

La Figura 2. La actividad del inflammasoma es evidente en las MDSC recuperadas. (A) Transferencia Western de lisados celulares de tipo silvestre recuperados o MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> sondeados para la forma activa p10 de caspasa-1 y β-actina. El software ImageJ se usó para convertir a escala de grises, enderezar y recortar la imagen del gel para resaltar los carriles de interés de acuerdo con el tamaño. (B) Cuantificación de transferencia de caspasa-1 p10 con relación a β-actina, GvHD frente a todos los demás grupos, p<0,05. La cuantificación se llevó a cabo en transferencias escaneadas mediante análisis densitométrico a partir del software ImageJ (NIH) (C) ELISA IL-1β de sobrenadantes después del día 5, MDSC-IL13 recuperadas se sembraron en placas en medio RPMI completo durante toda la noche, GvHD frente a todos los otros grupos, p<0,05. La línea de puntos indica el límite de detección de ELISA. Todos los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 3. La inducción in vitro de inflammasoma en MDSC conduce a la pérdida de la función supresora. La inducción de inflammasoma en cultivo fresco de MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> de tipo silvestre se llevó a cabo mediante la adición de 0,2 µg/ml de LPS durante tres horas, seguido de la adición de ATP 2 mM o 0,8 µg/ml de transfección de poli(dT). (A) Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon después de 1 hora adicional y se ensayaron para la producción de IL-1β por ELISA. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (B) Las MDSC-IL13 inducidas por el inflammasoma se lavaron exhaustivamente y se sembraron en placas en un ensayo de supresión de CFSE en una relación 1:1, los datos son representativos del portal CD8 marcado con CFSE + células T respondedoras, n=6 muestras/grupo de dos experimentos independientes. NLRP3 indica tratamiento con LPS+ATP y AIM2 indica tratamiento con LPS+poli(dT), el histograma gris representa que no hay proliferación de MDSC control. El portal CD4<sup>+</sup> de las células T respondedoras se muestra en la Figura 10. (C) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier del modelo GvHD en C57Bl/6 BALB/c mediante el uso de MDSC-IL13 inducido por inflammasoma, tratado como anteriormente. MDSC vs. no MDSC p<0,0001, MDSC vs. MDSC AIM2 p<0,0001, MDSC vs. MDSC NLRP3 p =0,0029. Los datos representan n = 18 animales por grupo, combinados a partir de dos experimentos independientes. (D) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de GvHD mediante el uso de MDSC-IL13 generadas a partir de ratones tipo silvestre o ASC<sup>-/-</sup> como se indica. Los datos representan n=30 animales por grupo en tres experimentos independientes. MDSC vs no MDSC p=0,0399, MDSC vs. ASC<sup>-/-</sup> MDSC p=0,0006. (E) Los histogramas representan el % de células T marcadas con CFSE que se dividen cuando se siembran en placas contra el tipo silvestre recuperado o MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> desde el día 5 después del trasplante en una relación de 1:1 y cosechado el día 3. Se encontraron valores de p significativos (<0,05) al comparar cualquier grupo individual con MDSC-IL13 de tipo silvestre recuperado de ratones GvHD.

La Figura 4. La inducción de inflammasomas en MDSC se asocia con la pérdida de expresión de Arg1. Se indujeron MDSC-IL13 para los inflammasomas NLRP3 o AIM2 como se indica, se lavaron exhaustivamente y se volvieron a sembrar en placas en medios completos durante toda la noche. (A) Actividad enzimática de Arg1 asociado a células para tipo silvestre o (B)MDSC ASC<sup>-/-</sup>, normalizado al número total de células. Los datos se agrupan a partir de dos experimentos independientes. MDSC generadas a partir de ratones transgénicos YFP-Arg1, seguido de inducción in vitro de inflammasomas y resiembra en medios completos. (C) La fluorescencia YFP para el portal MDSC CD11b después de dos días adicionales en cultivo se indica como histogramas representativos (el histograma sombreado representa médula ósea YARG no estimulada) y (D) resumen de datos de % YFP<sup>+</sup>. (E) Detección de YFP para MDSC-IL13 recuperadas del día 5 de animales trasplantados con médula ósea solamente (sin GvHD) o médula ósea más células T enteras (GvHD). La médula ósea YARG (médula ósea YFP-Arg1) indica la fluorescencia basal de YFP. (F) Producción de IL-1β antes y después de la activación del inflammasoma NLRP3 (ATP + LPS) para el total de MDSC-IL13 o subgrupos clasificados granulocítico Ly6G+C+(Ly6G+ y monocítico Ly6C +). (G) Proliferación de CFSE de respuestas de células T CD8+ B6 impulsadas por anti-CD3ε en presencia de subconjuntos granulocíticos (Ly6G+) o monocíticos (Ly6C+) de MDSC-IL13 en una relación 1:1. (H) Bioactividad de arginasa asociada a células para MDSC-IL13 a granel y subconjuntos granulocíticos (Ly6G+) o monocíticos (Ly6C+). La línea discontinua indica actividad de fondo para esplenocitos deficientes en Arg1. Los datos concernientes a los subconjuntos de MDSC son representativos de 3 experimentos independientes.

La Figura 5. La inducción de inflammasomas en MDSC humanas interfiere con su función supresora. Se generaron MDSC humanas a partir de PBMC donantea. (A) IL-1β ELISA de sobrenadantes de MDSC tratados durante tres horas con 0,2 µg/ml de LPS durante tres horas seguido de ATP 2 mM durante una hora antes de la cosecha. Los datos son representativos n=2 experimentos. (B) Histogramas representativos de CellTrace Violet (Life Technologies, Carlsbad, CA) PBMC respondedoras marcadas en presencia de MDSC humanas cultivadas de donantes no relacionados indicados por una línea continua. La línea de puntos indica que no hay proliferación de MDSC control, el histograma gris indica PBMC solo (sin CD3ε o MDSC). No Estim representa la alorespuesta contra MDSC sin anti-CD3ε. Estim indica la adición de

microperlas anti-CD3 $\epsilon$  (2:1) + IL-2 (100 U/ml) para demostrar la supresión de MDSC de la activación de células T. Estim + Infl. Tx'd indica que las MDSC han sido tratadas con microperlas anti-CD3 $\epsilon$  + IL-2 para la activación del inflammasoma antes de sembrarse en placas. (C) Los datos agregados muestran el por ciento de división de las células T CD8 y CD4 respondedoras. Los datos representan respuestas de tres donantes PBMC no relacionados, y es representativo de dos experimentos independientes.

La Figura 6. Fenotipo extendido de MDSC-IL13 recuperadas. Expresión superficial de MDSC-IL13 (CD45.2 +) congénicas recuperadas de bazos cinco días después de la transferencia a animales irradiados que reciben solo médula ósea (sin GvHD) o médula ósea más células T (GvHD). Los datos representan tres réplicas por grupo con p=ns (>0,05) para todos los marcadores mostrados. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 7. Recuperación de MDSC-IL13 CD45.2+. (A) Diagrama de flujo representativo que muestra frecuencias de esplenocitos CD45.2<sup>+</sup> agrupados antes y después del enriquecimiento. Los gráficos de la parte inferior representan células del portal indicadas en el gráfico superior (CD45.2+ CD45.1-ve) (B) Eficacia de enriquecimiento de las MDSC-IL13 (CD45.2+) de los grupos No GvHD y GvHD. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, n = 3 por grupo.

La Figura 8. Dosis alta de MDSC-IL13. Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el efecto del aumento de las dosis de MDSC-IL13 día 0 en el modelo de GvHD. Con el fin de distinguir los grupos de tratamiento MDSC 2x y 3x, los datos ya mostrados en la Figura 1F se indica mediante una línea de puntos y símbolos ligeramente más pequeños. Los datos representan la combinación de dos experimentos independientes con n=10 por grupo para dosis 2x y 3x. Todos los ratones que recibieron MDSC demostraron un aumento de la supervivencia frente a GvHD p<0,001. 1x, 2x, o 3x las dosis de día 0 de MDSC-IL13 no son significativamente diferentes entre sí.

La Figura 9. MDSC-IL13 fenotipo de infusión día 0. Expresión superficial de los marcadores indicados para B6 de tipo silvestre (sombreado) y ASC ko (negrita) MDSC-IL13 el día de la cosecha (día +4 cultivo) antes de la infusión. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

La Figura 10. Pérdida de supresión inducida por el inflammasoma dependiente de ASC para las células T CD4 respondedoras. Como en la Figura 3B, se trataron células de tipo silvestre (wt) o MDSC-IL13 ASC ko como se indica, y se lavaron exhaustivamente y luego se aplicaron a un ensayo de proliferación CFSE de células T en una relación 1:1. Se muestran gráficos representativos de células T CD4<sup>+</sup> respondedoras del portal, de dos experimentos independientes.

Descripción detallada de las modalidades ilustrativas

La presente invención es como se define en las reivindicaciones y se refiere a una pluralidad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) deficientes en proteína similar a la mota asociada a apoptosis que contiene una CARD (ASC) (MDSC deficiente en ASC) para usar en un método de tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), el método comprende: administrar al sujeto una pluralidad de MDSC deficientes en ASC.

Esta descripción describe, en un aspecto, un método para mejorar el uso de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) para inhibir la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD). Generalmente, los métodos implican combinar el uso de MDSC con al menos un enfoque para limitar la activación in vivo del inflammasoma de MDSC.

Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) son una población inmunorreguladora de origen natural que participa en la inhibición de las respuestas inflamatorias en curso. La generación in vitro de MDSC a partir de médula ósea puede mejorar la supervivencia en un modelo agudo de enfermedad letal de injerto contra huésped (GvHD). Sin embargo, la infusión de MDSC de donantes solo mejora parcialmente la letalidad de GvHD. Con el fin de mejorar el beneficio terapéutico potencial y, en última instancia, los resultados de supervivencia de la terapia con MDSC, esta descripción describe una investigación del destino de MDSC después de la transferencia en el contexto de GvHD aguda (aGvHD). Las MDSC transferidas a receptores letalmente irradiados de injertos hematopoyéticos de donantes alogénicos se exponen a un ambiente inflamatorio intenso asociado con aGvHD, que puede socavar directamente la capacidad supresora de las MDSC. Bajo afecciones inflamatorias de GvHD, las MDSC pueden perder la función supresora y, por lo tanto, su potencial para inhibir la letalidad de GvHD. Incluso una breve exposición in vitro a mediadores de la activación del inflammasoma puede negar el potencial supresor de las MDSC de origen humano y murino en cultivo. De acuerdo con un papel para el inflammasoma, las MDSC de donantes deficientes en el adaptador ASC (proteína similar a mota asociada a apoptosis que contiene una CARD) que ensambla complejos de inflammasoma confieren una mejor supervivencia de los ratones que desarrollan GvHD en comparación con las MDSC de donantes de tipo silvestre. Estos datos sugieren que usar las MDSC como un enfoque terapéutico para inhibir GvHD y otras afecciones inflamatorias sistémicas puede ser más efectivo cuando se combina con enfoques que limitan la activación in vivo del inflammasoma de MDSC, de esta manera permite a las MDSC mantener su potencial supresor.

Por ejemplo, el trasplante alogénico de células hematopoyéticas (aHCT) es una terapia potencialmente curativa para una variedad de enfermedades hematológicas que incluyen leucemias y linfomas. El riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) permanece como un obstáculo para el uso generalizado del trasplante

alógeno para muchas enfermedades que incluyen, por ejemplo, trastornos linfohematopoyéticos malignos y no malignos. La inmunoterapia celular dirigida como complemento de aHCT puede controlar la GvHD al tiempo que reduce los efectos secundarios asociados con los regímenes de acondicionamiento al ser altamente selectiva y autorregularse internamente. Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), definidas en sentido amplio como células de linaje mielóide con capacidad supresora, emergen coincidentes con patologías tales como tumores, traumatismos e infecciones. La producción de MDSC de novo a partir de la médula ósea (BM) se produce en respuesta a la inflamación y a la liberación del factor de crecimiento (por ejemplo, GM-CSF, G-CSF).

Las MDSC pueden suprimir la patología inmune sistémica a través de mecanismos únicos que incluyen la privación local de aminoácidos, óxido nítrico, prostaglandina E2, citocinas antiinflamatorias, especies reactivas de oxígeno, así como también la promoción de células T reguladoras (Tregs). Los cultivos de MDSC derivados de médula ósea incubados con interleucina-13 (IL-13) suprimen aGvHD a través de una depleción de L-arginina dependiente de la arginasa 1, que a su vez inhibe las respuestas alógenas de las células T.

La GvHD aguda (aGvHD) a menudo se describe con tres fases: acondicionamiento del trasplante, cebado de células T del donante y apoptosis del tejido en fase efectora. El régimen de acondicionamiento y el cebado rápido de una alta frecuencia de células T aloespecíficas de donantes conducen a una inflamación sistémica intensa. Dado que aGvHD expande las células T del donante que tienen la capacidad de atacar al receptor, un enfoque efectivo para inhibir la letalidad implica amortiguar las respuestas de las células T temprano en el postrasplante, cuando la inflamación está aumentando y las células T aloreactivas están contribuyendo a la lesión orgánica, lo que amplifica la respuesta inflamatoria. Así, de esa manera, para que las MDSC del donante proporcionen una terapia eficaz, estas células deben permanecer viables y funcionar durante un período de tiempo suficientemente largo como para impedir el cebado y la expansión de las células T aloreactivas.

El inflammasoma es un complejo multimolecular que actúa como un componente aguas abajo de las vías de detección inmunitarias innatas. Los factores asociados con la activación del inflammasoma incluyen, por ejemplo, la fuga intestinal de productos bacterianos y moléculas asociadas al peligro (DAMP) desde las células muertas y moribundas. Para que se produzca la activación del inflammasoma, las señales de inicio convergen y conducen a la proteína adaptadora ASC (proteína similar a la mota asociada a la apoptosis que contiene una CARD)-escisión autocatalítica mediada por procaspasa-1, y finalmente escisión y exportación de IL-1 $\beta$  o IL-18 activas. Las moléculas involucradas en los diferentes inflammasomas varían en dependencia de la fuente de señales de activación y la molécula aguas arriba que se une con ASC. Por ejemplo, los inflammasomas de la familia del receptor similar a AIM2 (ALR) pueden iniciarse por unión de dsADN citosólico a AIM2 (ausente en el mieloma 2), mientras que el inflammasoma NLRP3 (familia de receptor similar a NOD, dominio de pirina que contiene 3) se activa por señales de peligro de microbios y del huésped y cambios en el contenido extracelular de ATP.

Esta descripción demuestra que una sola infusión temprana de MDSC posterior al trasplante suprime transitoriamente pero no elimina la GvHD en un modelo murino de GvHD letal. Los datos establecen que la inflamación de GvHD conduce a las MDSC hacia un estado de activación del inflammasoma, que es contraproducente para la función supresora de las MDSC en ratones con GvHD. Sin embargo, la alteración genética de las MDSC de donantes para desactivar la activación del inflammasoma puede aumentar la supervivencia en GvHD con relación a la terapia de control de MDSC. Además, las mismas vías están activas en las MDSC humanas. En conjunto, esta nueva información puede mejorar la aplicación terapéutica de las MDSC.

Las MDSC en el contexto de GvHD experimentan una rápida diferenciación a CD11c<sup>+</sup> de fenotipo activado

Las MDSC se generaron a partir de cultivos frescos de médula ósea (BM) con factores de crecimiento de citocinas GM-CSF y G-CSF en cuatro días. La activación de MDSC cultivadas 24 horas antes de la cosecha con IL-4 o IL-13 estimula la expresión de arginasa-1 y promueve la supresión funcional de las células T tanto in vitro como en el contexto de la GvHD. Para demostrar que las MDSC-IL13 son efectivas para prolongar la supervivencia en un modelo murino de aGvHD, a los receptores BALB/c irradiados letalmente se les dio médula ósea alógena C57Bl/6 más células T depletadas en CD25 para inducir aGvHD, en presencia o ausencia de terapia celular con MDSC-IL13 en el día 0. Las células T inducen aGvHD que resulta en un tiempo medio de supervivencia de 24,5 días. Sin embargo, los animales que recibieron terapia con MDSC-IL13 habían extendido la supervivencia a 47,5 días (Figura 1A). A pesar de un mejor resultado clínico, la mayoría de los animales tratados sucumbieron a la muerte inducida por GvHD por el día 100, lo que sugiere que la patología se redujo o se retrasó, pero no se eliminó. Para investigar cómo las afecciones asociadas con aGvHD podrían alterar directamente la función MDSC, se administraron médula ósea o médula ósea más células T (afecciones de GvHD) con MDSC-IL13 CD45.2<sup>+</sup> congénico a animales CD45.1<sup>+</sup> que luego se sacrificaron el día 5 después del trasplante para examinar el fenotipo y la función de las MDSC recuperadas.

Fenotípicamente, las MDSC recuperadas de animales trasplantados que recibieron solo acondicionamiento más médula ósea mantuvieron una apariencia CD11c<sup>lo</sup>, MHCII<sup>lo</sup>, F4/80<sup>int</sup> inmadura (Figura 1B y Figura 1C). Sin embargo, las MDSC-IL13 que se transfirieron a animales con aGvHD (CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Células T, CD25<sup>-</sup>) regularon positivamente CD11c y MHC clase II, características distintivas de las células mieloides activadas. Además, la expresión de F4/80 aumentó, lo que sugiere que la activación y la diferenciación ocurrieron rápidamente en respuesta al ambiente inflamatorio en curso promovido por las células T alorreactivas (Figura 1B y Figura 1C). Otros marcadores de coestimulación y activación se

mantuvieron sin cambios (Figura 6). Para medir el estado funcional de las MDSC recuperadas, las MDSC aisladas ex vivo se cultivaron conjuntamente con células T marcadas con CFSE anti-CD3 $\epsilon$  activadas por AcM. Las MDSC-IL13 de los animales al día 5 de trasplantados solo con médula ósea fueron altamente supresoras (Figura 1D, sin GvHD). Por el contrario, las respuestas de células T en presencia de MDSC-IL13 recuperadas de animales con GvHD mostraron solo una ligera reducción en la proliferación global con relación al grupo control sin MDSC (Figura 1D), lo que indica una pérdida de la función de células supresoras de MDSC en receptores con GvHD.

Una explicación para la pérdida de supresión por MDSC in vivo podría ser la supervivencia comprometida de las células supresoras. La viabilidad de MDSC se mantiene mediante la supresión continua de la caspasa-8 extrínseca y las vías intrínsecas de muerte mitocondrial. La manipulación de cualquiera de estas vías puede causar una disminución rápida en la viabilidad de MDSC y una disminución concomitante de la supresión. Se investigó el número y la viabilidad de las células transferidas en los bazo de los receptores tras la transferencia. No se observaron diferencias significativas entre la médula ósea solamente y las afecciones de GvHD al observar el número total de células CD45.2<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> o la viabilidad en el día 5 (Figura 1E). Estos datos sugieren que las MDSC-IL13 reducen la aGvHD por un período limitado de tiempo después del trasplante y que las MDSC-IL13 subsecuentemente pierden la función supresora en la afección de GvHD, lo que resulta en la imposibilidad de mantener un beneficio terapéutico.

Múltiples infusiones de MDSC-IL13 mejoran la supervivencia a largo plazo de la GvHD

El aumento de la relación de MDSC-IL13 con respecto a células T durante la inducción de GvHD de 3:1 a 6:1 (2x) o 9:1 (3x) al momento del trasplante no aumentó significativamente la supervivencia general (Figura 8). Por el contrario, las dosis repetitivas de MDSC-IL13 recién cultivadas promovieron y/o mantuvieron un ambiente supresor durante el período de peritransplante de cebado de células T durante la aGvHD. Se administraron tres infusiones de cultivos de MDSC-IL13 en el día 0, día 3 y día 6 después del trasplante, para un total de una relación de células MDSC-T agregadas de 9:1. Múltiples infusiones de MDSC-IL13 promovieron una cohorte (50%) de supervivientes a largo plazo versus <10 % de supervivientes a largo plazo cuando se les administró la infusión de MDSC-IL13 un solo día 0 (Figura 1F). La observación de que las infusiones repetidas de MDSC-IL13 recién cultivadas aumentan la supervivencia respalda la hipótesis de que el ambiente inflamatorio intenso encontrado durante la inducción de aGvHD no afecta la persistencia o la viabilidad de MDSC, sino que cambia el ambiente del huésped, de modo que las MDSC-IL13 transferidas son efectivamente menos supresoras con el tiempo.

Conversión asociada a la producción de IL-1 $\beta$ , activación del inflammasoma

La actividad del inflammasoma NLRP3 del huésped puede exacerbar la GvHD en un modelo murino. Además, los pacientes con GvHD pueden exhibir niveles aumentados de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en suero asociados a inflammasoma. Adicionalmente, las MDSC producen fácilmente IL-1 $\beta$  cuando se exponen a ciertos agentes quimioterapéuticos, lo cual da como resultado una respuesta antitumoral alterada. Los lisados celulares de MDSC-IL13 recuperados después de cinco días en afecciones de GvHD se sondearon para la forma procesada p10 de caspasa-1, un mediador aguas arriba de la actividad del inflammasoma. Los análisis de transferencia Western mostraron cantidades aumentadas de caspasa-1 p10 en MDSC-IL13 recuperadas de afecciones de GvHD con relación a MDSC-IL13 recuperadas de receptores controles de trasplante de médula ósea solamente (Figura 2A y Figura 2B). Además, se encontró evidencia para la conversión de MDSC a la activación del inflammasoma cuando las MDSC-IL13 recuperadas se sembraron en medios completos para un cultivo durante toda la noche; el análisis de los sobrenadantes demostró un aumento de IL-1 $\beta$  en las afecciones de GvHD (Figura 2C). Estos datos establecen una correlación entre MDSC-IL13 en el contexto de las afecciones aGvHD y la actividad del inflammasoma.

La inducción in vitro de IL-1 $\beta$  por MDSC-IL13 involucra ASC

IL-1 $\beta$  puede interferir directamente con la supresión y la promoción de la función efectora T mediada por Treg. Para investigar más a fondo el papel de la activación del inflammasoma y la producción de IL-1 $\beta$ , se examinó la inducción del inflammasoma in vitro en MDSC-IL13 cultivadas. NLRP3 y AIM2 representan dos familias principales de inflammasomas en las cuales una variedad de señales pueden potenciar la cascada del inflammasoma, pero la proteína adaptadora ASC puede ser un componente común requerido para la activación completa del inflammasoma. Se usó médula ósea tipo silvestre y ASC<sup>-/-</sup> (*Pycard*<sup>-/-</sup>) para generar MDSC-IL13 para probar si podían inducirse por actividad de inflammasoma. En el momento de la transferencia, las MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> tenían un fenotipo de superficie similar a las MDSC-IL13 de tipo silvestre (Figura 9). El inflammasoma NLRP3 se probó al incubar MDSC-IL13 con LPS durante tres horas seguido de ATP, mientras que el inflammasoma AIM2 se involucró mediante el uso de LPS seguido de transfección de poli(dT). En tan solo una hora después del estímulo secundario, se detectó IL-1 $\beta$  en sobrenadantes del cultivo de MDSC-IL13 de tipo silvestre (Figura 3A). Sin embargo, las MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> no produjeron IL-1 $\beta$  detectable, lo que establece que las MDSC-IL13 son capaces de responder rápidamente a los cambios en su entorno para producir el mediador proinflamatorio IL-1 $\beta$  de una manera dependiente de ASC. Además, la inducción de las MDSC-IL13 por inflammasoma puede alterar sus capacidades supresoras. Al seguir el mismo procedimiento para inducir inflammasomas en solo cuatro horas, las MDSC-IL13 se lavaron exhaustivamente y se sembraron en placas en un ensayo de supresión in vitro de la proliferación de células T para la estimulación de anti-CD3 $\epsilon$ . La inducción in vitro del inflammasoma reduce la capacidad de las MDSC-IL13 de suprimir funcionalmente la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> (Figura 3B) y CD4<sup>+</sup> (Figura 10). Este efecto, además, dependía de

ASC, lo cual apoya la hipótesis de que la activación del inflammasoma se asocia con una pérdida de la función supresora en lugar de, por ejemplo, la viabilidad comprometida y/u otros factores de maduración.

La inducción de inflamomas reduce la eficacia de las MDSC-IL13 en GvHD

Las MDSC-IL13 cultivadas *in vitro* se trataron como anteriormente para la activación del inflammasoma NLRP3 o AIM2, seguido de un lavado exhaustivo antes de la transferencia al modelo de aGvHD. Como se observa para la supresión *in vitro*, la activación del inflammasoma de MDSC-IL13 redujo el beneficio de supervivencia de GvHD en comparación con la terapia de control MDSC-IL13, que aumentó significativamente la supervivencia de GvHD ( $p < 0,0001$ , Figura 3C).

Dado que la conversión de MDSC-IL13 a un estado maduro activado por inflammasoma después de la transferencia terapéutica está implicada en el establecimiento de aGvHD, el uso de MDSC-IL13 genéticamente incapaz de activar el inflammasoma puede mantener mejor la función y mejorar aún más la supervivencia de GvHD. De hecho, los destinatarios de MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> habían mejorado aún más la supervivencia con relación a las MDSC-IL13 de tipo silvestre ( $p = 0,0006$ ), las cuales fueron significativamente mejores que el grupo sin MDSC (Figura 3D). Además, las MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> recuperadas de animales con GvHD cinco días después de la transferencia habían aumentado la capacidad supresora de las células T en comparación con las MDSC-IL13 de tipo silvestre (Figura 3E). Estos hallazgos juntos implican directamente la activación intrínseca del inflammasoma MDSC-IL13 en afecciones de GvHD como un papel en la limitación de la eficacia de la terapia celular MDSC.

El mecanismo para la supresión mediada por MDSC-IL13 de GvHD es la actividad arginasa-1 (arg1) que socava directamente la capacidad de respuesta de las células T y promueve la supervivencia de GvHD. La bioactividad de la enzima arg1 de MDSC-IL13 después de la inducción de inflammasoma se midió para determinar si la actividad de arg1 se reducía junto con la inducción del inflammasoma. Se encontró una caída marcada en la actividad de arg1 medida por el ARNm (no mostrado) o por la actividad bioenzimática cuando se indujeron inflamomas NLRP3 o AIM2 (Figura 4A y Figura 4B). Una caída similar no fue evidente en las MDSC ASC<sup>-/-</sup>, aunque hubo una tendencia, lo cual sugiere que las vías pueden no estar directamente vinculadas. Para investigar más a fondo la actividad arg1, se usaron animales transgénicos YFP-Arg1 (YARG, en los que la expresión arg1 está vinculada a la proteína de fluorescencia amarilla (YFP)), lo que permite analizar rápidamente una pérdida de expresión asociada. IL-13 regula positivamente con facilidad la fluorescencia de YFP, mientras que IFN $\gamma$  (que induce MDSC que expresan iNOS) no aumentó la fluorescencia de YFP (Figura 4C y Figura 4D). Como anteriormente, la inducción del inflammasoma a través de las vías NLRP3 o AIM2 resultó en una pérdida concomitante de fluorescencia de YFP, lo que indica que la expresión de arg1 se había detenido en asociación con las afecciones inductoras de inflammasoma. Finalmente, las MDSC-IL13 generadas a partir de animales transgénicos YARG se aplicaron al modelo de trasplante, al suministrar solo médula ósea o médula ósea más células T completas para afecciones de GvHD. La fluorescencia de YFP a partir de las MDSC recuperadas después de cinco días a partir de animales con médula ósea sola, se redujo con relación a la expresión inmediatamente después del cultivo, pero todavía se detectaron fácilmente por encima del fondo (Figura 4E). Sin embargo, en las MDSC-IL13 recuperadas de animales con GvHD, la YFP ya no era detectable, al reducirse a los niveles de fondo observados en la médula ósea no estimulada. Estos resultados respaldan aún más un vínculo entre una pérdida de expresión de arg1 y la actividad del inflammasoma durante la GvHD.

Las MDSC a menudo se definen como heterogéneas, con dos subconjuntos principales descritos en los sistemas murinos que son granulocíticos (Ly6G<sup>+</sup>) y monocíticos (Ly6C<sup>+</sup>G<sup>-</sup>). Cada subconjunto se evaluó para determinar si cada uno tenía una capacidad similar para la activación del inflammasoma y cómo la capacidad supresora podría verse afectada de manera diferencial. Las MDSC-IL13 de la médula ósea cultivada son >90 % de Ly6C<sup>+</sup> (Figura 9), y se clasificaron según la expresión de Ly6G. Las condiciones de activación del inflammasoma NLRP3 conducen a niveles equivalentes de producción de IL1 $\beta$  tanto para el subconjunto Ly6C<sup>+</sup>G<sup>-</sup> monocítico como para el Ly6G<sup>+</sup> granulocítico (Figura 4F). Sin embargo, cuando se aplicó a un ensayo de supresión *in vitro* independiente de la activación del inflammasoma, la capacidad supresora estaba contenida prácticamente en su totalidad dentro del subconjunto Ly6C<sup>+</sup>G<sup>-</sup> (Figura 4G). Además, la bioactividad arg1 se asoció con el subconjunto monocítico (Figura 4H). Juntos, estos datos indican que la pérdida de la función supresora en ratones GvHD se asoció con actividad del inflammasoma y no debido a un cambio hacia Ly6G<sup>+</sup> o a diferencias en la capacidad de producción de IL1 $\beta$ . Así, de esa manera, las frecuencias relativamente más altas del subconjunto Ly6C<sup>+</sup>G<sup>-</sup> en el grupo GvHD versus no GvHD, no tiene en cuenta la pérdida de la capacidad supresora *in vivo*.

Las MDSC humanas cultivadas pierden su función cuando se activa su inflammasoma.

Las MDSC se generaron a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como se describió previamente (Lechner y otros, 2010, J Immunol 185(4):2273-2284). Estas MDSC se usaron para investigar si las MDSC humanas podrían tener una predisposición similar a la pérdida de función activada por el inflammasoma que se encontró en las MDSC murinas. Las PBMC humanas, enriquecidas para el marcador mielóide CD33, se cultivaron durante siete días con GM-CSF e IL-6. En estas condiciones, las MDSC humanas suprimieron la proliferación impulsada por AcM anti-CD3 $\epsilon$  de PBMC respondedoras no relacionadas. Se confirmó que las MDSC humanas eran capaces de responder a las condiciones de activación del inflammasoma, al agregar LPS seguido de ATP para involucrar el inflammasoma NLRP3. Se necesitan tanto LPS como ATP para impulsar la producción de IL-1 $\beta$  en las MDSC (Figura 4A). A continuación, se agregaron MDSC activadas por inflammasoma al ensayo de proliferación de PBMC dirigido por AcM anti-CD3 $\epsilon$ . Al igual que

en el sistema murino, las MDSC expuestas a los componentes activadores del inflammasoma (Stim + Infl. Tx'd) perdieron la supresión concomitante con la producción de IL-1 $\beta$ .

5 Así, de esa manera, las células T alorreactivas son un factor que contribuye a la morbilidad y la mortalidad en la GvHD clínica, y el uso de terapia celular reguladora puede ser una estrategia viable para controlarlas. Las MDSC pueden generarse a partir de la médula ósea normal en un período de tiempo relativamente corto y pueden suprimir efectivamente la GvHD, la autoinmunidad y el rechazo de aloinjertos. Esta descripción informa que las MDSC activadas por la citocina IL-13 producen arg1 que, a su vez, permite que las MDSC supriman la GvHD. Sin embargo, en un modelo rígido de GvHD con desajuste completo de MHC, la terapia con MDSC promueve la supervivencia extendida pero fracasa en proteger en 10 última instancia a la mayoría de los animales de la GvHD letal. Esta descripción demuestra, además, que la activación intrínseca del inflammasoma de las MDSC transferidas adoptivamente limita la eficacia de estas in vivo. Las MDSC cultivadas son capaces de responder rápidamente de una manera dependiente de ASC para producir cantidades significativas de IL-1 $\beta$ , lo que resulta en una pérdida asociada de la supresión in vitro. Además, poco después de la transferencia in vivo, las MDSC en el contexto de aGvHD se convierten en un fenotipo maduro CD11c<sup>+</sup> y exhiben una 15 pérdida de capacidad supresora ex vivo. Estas MDSC tienen cantidades aumentadas de caspasa-1 p10, un indicador de activación del inflammasoma, y secretan IL-1 $\beta$  cuando se colocan en cultivo durante toda la noche, a diferencia de los controles en afecciones no GvHD.

20 Por el contrario, cuando la activación del inflammasoma está genéticamente prohibida mediante el uso de MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup>, la supervivencia de GvHD mejora con respecto a los receptores de trasplante MDSC-IL13 de tipo silvestre y las MDSC-IL13 ASC<sup>-/-</sup> recuperadas mantienen una mejor capacidad supresora ex vivo. Los métodos adicionales para alterar la susceptibilidad de MDSC a la activación/conversión del inflammasoma pueden incluir la desactivación génica de ASC u otros genes asociados al inflammasoma (por ejemplo, NLRP3, AIM2, Caspase-1). Las modificaciones génicas pueden obtenerse mediante el uso de, por ejemplo, sh/siARN, TALEN, meganucleasa, megaTALEN y/o tecnologías CRISPER, 25 y/o mutagénesis dirigida al sitio.

30 Las células mieloides están involucradas en el inicio y la conformación de las respuestas inmunitarias tanto en direcciones proinflamatorias como antiinflamatorias, y demuestran una notable plasticidad. Esta adaptabilidad puede ser tanto una bendición como una maldición, ya que le permite generar rápidamente células altamente supresoras a partir de la médula ósea normal in vitro, pero permite la eficacia transitoria observada tras la transferencia a un ambiente inflamatorio severo como el aGvHD. Si bien las MDSC se describen como de naturaleza heterogénea y los marcadores fenotípicos no siempre se traducen entre modelos de enfermedades o especies, las vías de activación del inflammasoma parecen estar altamente conservadas. En los datos informados en esta descripción, las MDSC generadas a partir de médula ósea de ratón o 35 PBMC humanas activan fácilmente los inflammasomas, lo que resulta en la producción de IL-1 $\beta$  que se correlaciona con una pérdida de la función supresora. Los pacientes con aGvHD pueden exhibir caspasa-1 escindida y aumento de IL-1 $\beta$ , lo que respalda aún más la conclusión de que GvHD se asocia con la activación del inflammasoma. Las MDSC están asociadas de forma casi ubicua con tumores establecidos y pueden perturbar activamente las intervenciones de terapia inmunológica. Una distinción entre la activación de MDSC del inflammasoma inducida por tumor y la inducida por GvHD es que el desarrollo de MDSC asociado a tumor ocurre en el contexto de inflamación crónica localizada, en contraste con la 40 intensa respuesta inflamatoria sistémica de GvHD.

45 Debido a que las MDSC activadas por GVHD secretan IL-1 $\beta$ , es posible que tales MDSC hayan contribuido al proceso de letalidad de GVHD. IL-1 $\beta$  tiene efectos pleiotrópicos que dependen de la célula que lo produce, el estado del microambiente circundante y la expresión temporal, pero generalmente se entiende que es proinflamatorio y en algunos casos contrarregulador. Cuando las células MDSC-IL13 recuperadas de los receptores de trasplante de GvHD del día +5 se aplican a un ensayo de supresión in vitro, la proporción de células T que proliferan no fue diferente de los controles sin MDSC, aunque las células T en proliferación experimentaron menos divisiones celulares, lo que sugiere que quedó cierta capacidad supresora. Estos datos sugieren que las MDSC-IL13 activadas por GVHD no generaron directamente la letalidad de la GVHD, de acuerdo con el hallazgo de que las curvas de supervivencia en los receptores tratados con 50 MDSC-IL13 eran paralelas a las de los controles sin MDSC, después de un retraso de 2-3 semanas. La expresión de arginasa-1, que promueve el beneficio de supervivencia conferido por las MDSC-IL13 durante la transferencia adoptiva, se inhibió en las MDSC activadas por inflammasoma, lo que potencialmente explicaría la pérdida de supresión por las MDSC de los donantes.

55 La familia NLR de mediadores de inflammasoma, tal como NLRP3, es un candidato para promover la conversión del inflammasoma en afecciones de GvHD, ya que tanto el ATP como las señales de peligro asociadas se encuentran después del acondicionamiento y pueden participar en la mejora de GvHD. La activación del inflammasoma NLRP3 en el contexto de GvHD se ha demostrado tanto para los protocolos de inducción de radioterapia como de quimioterapia, lo que resulta en daño tisular y liberación de patrones moleculares asociados al peligro (DAMP). Las MDSC transferidas adoptivamente, 60 además, pueden ser susceptibles a la inducción del inflammasoma, y los mismos mediadores pueden contribuir a la activación in vivo. Los reactivos que se dirigen de manera selectiva al inflammasoma NLRP3 pueden promover el doble propósito de inhibir la activación del inflammasoma en el huésped en las MDSC del donante infundido. Por ejemplo, MCC950, un inhibidor de molécula pequeña, y  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), una cetona producida bajo estrés metabólico han demostrado especificidad hacia la activación suprimida de NLRP3 y las enfermedades mediadas por NLRP3. 65 Alternativamente, los productos virales y bacterianos, tales como el dsADN pueden, además, ser potentes impulsores tanto de GvHD como de la familia de inflammasomas del receptor similar a AIM2. Si bien el desarrollo de GvHD no está en

dependencia de la actividad de la vía MyD88/TRIF del huésped, la liberación de dsADN por las células muertas/moribundas por la radiación y las lesiones inducidas por GvHD pueden amplificar la letalidad bajo algunas condiciones.

5 Tomados en conjunto, los datos informados en esta descripción indican que el potencial terapéutico de las MDSC de donantes puede aumentarse mediante la reducción del grado en que el entorno inflamatorio de GvHD inhibe la medida en que las MDSC experimentan la activación del inflammasoma. El pretratamiento de la terapia celular terapéutica con MDSC para inhibir específicamente la activación del inflammasoma mediante alteración genética (por ejemplo, desactivación de la expresión génica, sh/siR-NA/meganucleasa, megaTALs, CRISPER) o mediante inhibición farmacológica (MCC950/BHB) son métodos para mantener intrínsecamente la función de las MDSC. Además, el tratamiento farmacológico o la focalización específica de las MDSC in vivo para suministrar fármacos y agentes que pueden regular la formación o función del inflammasoma o agentes que regulan factores incitantes en el paciente que conducen a la activación del inflammasoma del paciente (antes, durante y/o después del trasplante) pueden reducir, además, la conversión a inflammasoma de la terapia celular MDSC con el beneficio adicional de prevenir la actividad inflamatoria derivada del huésped, que se ha demostrado que está asociada con un aumento de la gravedad de la GvHD.

Por el contrario, en el entorno inflamado crónicamente generalmente asociado con el crecimiento tumoral, la generación de MDSC de novo y la actividad del inflammasoma a menudo están asociadas. Dicha supresión de las MDSC puede reducir o eliminar la eficacia de la quimioterapia, radioterapia, cirugía y/o inmunoterapia con fármacos, anticuerpos/proteínas, vacunas y/o terapias celulares. Los resultados presentados aquí que demuestran que la función de las MDSC se ve directamente comprometida a través de la actividad inflammasoma asociada con la GvHD aguda sugiere que el grado de inflamación influye en el soporte funcional de las MDSC. Así, de esa manera, las terapias antitumorales, tales como las enumeradas anteriormente, que tienen como objetivo la erradicación del tumor pueden promoverse aún más mediante el aumento de la activación del inflammasoma local o sistémico con la intención de eliminar/deshabilitar las MDSC asociadas al tumor.

El estado del arte del campo inicialmente sugirió que la activación crónica del inflammasoma aumentaría la función supresora de las MDSC. Sin embargo, nuestros hallazgos en GvHD indican que la activación de alto nivel de inflammasoma revierte las capacidades supresoras de las MDSC. Así, de esa manera, un enfoque novedoso para revertir la supresión de las MDSC en tumores puede implicar la activación de las MDSC dentro del tumor mediante el uso de enfoques tales como, por ejemplo, proporcionar un agente incitante tales como, por ejemplo, ácido úrico, ATP, agentes que estimulan los receptores similares a Toll, ADN, ARN y/u otros agentes que pueden regular positivamente la función del inflammasoma.

Así, de esa manera, en un aspecto, esta descripción describe un método para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener enfermedad de injerto contra huésped (GvHD). Generalmente, el método incluye administrar al sujeto una pluralidad de MDSC en una cantidad efectiva para mejorar al menos un síntoma o signo clínico de la enfermedad de injerto contra huésped en comparación con un sujeto control adecuado.

Como se usa en la presente descripción, el término "tratar" o sus variaciones se refieren a reducir, limitar la progresión, mejorar o resolver, en cualquier medida, los síntomas o signos clínicos relacionados con la GvHD. Un "tratamiento" puede ser terapéutico o profiláctico. "Terapéutico" y sus variaciones se refieren a un tratamiento que mejora uno o más síntomas o signos clínicos existentes asociados con la GvHD. "Profiláctico" y sus variaciones se refieren a un tratamiento que limita, en cualquier medida, el desarrollo y/o la aparición de un síntoma o signo clínico de GvHD. Generalmente, un tratamiento "terapéutico" se inicia después de que la GvHD se manifiesta en un sujeto, mientras que el tratamiento "profiláctico" se inicia antes de que la GvHD se manifieste en un sujeto. Como se usa en la presente descripción, "síntoma" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de GvHD, mientras que "signo" o "signo clínico" se refiere a un hallazgo físico objetivo relacionado con GvHD capaz de ser encontrado por otra persona que no sea el paciente.

Además, el término "en riesgo" se refiere a un sujeto que puede o no poseer el riesgo que se describe. Así, de esa manera, por ejemplo, un sujeto "en riesgo" de desarrollar GvHD es un sujeto que posee uno o más indicios de mayor riesgo de tener o desarrollar GvHD en comparación con individuos que carecen de uno o más indicios, independientemente de si el sujeto manifiesta cualquier síntoma o signo clínico de tener o desarrollar GvHD.

En algunas modalidades, el método puede incluir administraciones repetidas de MDSC para reemplazar a las MDSC de administraciones anteriores, ya que las MDSC administradas previamente experimentan activación del inflammasoma y se hacen menos capaces de suprimir las células T alorreactivas. Es decir, volver a administrar MDSC secuencialmente puede reponer una población de MDSC que pierden la supresión en un ambiente inflamatorio con nuevas MDSC que aún no han activado su función de inflammasoma.

En algunas modalidades, la terapia puede incluir un mínimo de al menos dos administraciones de MDSC tales como, por ejemplo, al menos tres administraciones, al menos cinco administraciones, al menos diez administraciones, al menos quince administraciones, al menos veinte administraciones, al menos veinticinco administraciones, o al menos cincuenta administraciones. En algunas modalidades, la terapia puede incluir un máximo de no más de cincuenta administraciones de MDSC tales como, por ejemplo, no más de cuarenta administraciones, no más de treinta administraciones, no más de veinte administraciones, no más de diez administraciones, o no más de cinco administraciones. En algunas modalidades, la terapia puede incluir un intervalo de administraciones que tienen criterios de valoración principal definidos por cualquier

número mínimo de administraciones enumeradas anteriormente y cualquier número máximo de administraciones enumeradas anteriormente que sea mayor que el número mínimo de administraciones. Así, de esa manera, en una modalidad ilustrativa, la terapia puede incluir de tres a cinco administraciones de MDSC.

5 En algunas modalidades, las administraciones secuenciales de MDSC pueden separarse por un intervalo mínimo de al menos 24 horas, tales como, por ejemplo, al menos dos días, al menos tres días, al menos siete días, al menos 14 días, al menos 30 días, o al menos 90 días. En algunas modalidades, las administraciones secuenciales de MDSC pueden separarse por un intervalo máximo de no más de un año, no más de seis meses, no más de 90 días, no más de 60 días, no más de 30 días o no más de 14 días. En algunas modalidades, las administraciones secuenciales de MDSC pueden separarse por un intervalo caracterizado como un intervalo que tiene criterios de valoración principal definidos por cualquier intervalo mínimo entre las administraciones enumeradas anteriormente y cualquier intervalo máximo entre las administraciones enumeradas anteriormente que sea mayor que el intervalo mínimo entre administraciones. Así, de esa manera, en una modalidad ilustrativa, la terapia puede incluir MDSC administradas en un intervalo que tiene un mínimo de una vez al día hasta un máximo de una vez cada dos días.

15 En algunos casos, al menos una parte de las MDSC puede tratarse y/o incluir una modificación genética que hace que las MDSC resistan la activación del inflammasoma. En algunos casos, las MDSC pueden tratarse previamente con, por ejemplo, un fármaco, sh/siARN y/o CRISPR que hace que las MDSC resistan la activación del inflammasoma. Una modificación genética ilustrativa que hace que las MDSC resistan la activación del inflammasoma puede incluir una deficiencia en la proteína similar a la mota asociada a la apoptosis que contiene una CARD (ASC).

20 Puede lograrse un efecto similar en algunas modalidades al tratar adicionalmente al sujeto durante y/o después de la infusión de MDSC con un agente que inhibe el inflammasoma y de esta manera reducir el grado en que las MDSC infundidas están sujetas a la activación del inflammasoma. Los enfoques ilustrativos para inhibir el inflammasoma pueden incluir agentes que inhiben directamente el inflammasoma. Otros enfoques pueden implicar el uso de un agente que se dirige y/o al menos neutraliza parcialmente un agente incitador de inflammasoma. Los agentes ilustrativos de incitación al inflammasoma incluyen, por ejemplo, ácido úrico, ATP, un agente que estimula un receptor similar a Toll, ADN, ARN y/u otro agente que puede regular positivamente la función del inflammasoma.

25 La terapia, ya sea profiláctica o terapéutica, puede administrarse durante una duración mínima de al menos una semana, tal como por ejemplo, al menos dos semanas, al menos un mes, al menos tres meses, al menos seis meses o al menos un año. La terapia puede administrarse por una duración máxima de no más de 20 años, tal como por ejemplo, no más de 10 años, no más de cinco años, no más de dos años, no más de un año, no más de nueve meses, no más de seis meses, no más de tres meses, no más de dos meses, no más de un mes o no más de dos semanas. La terapia puede administrarse por una duración caracterizada como un intervalo que tiene como criterio de valoración principal cualquier duración mínima enumerada anteriormente y cualquier duración máxima enumerada anteriormente que sea mayor que la duración mínima. Así, de esa manera, en una modalidad ilustrativa, la terapia puede tener una duración de una semana a dos semanas.

30 Las MDSC pueden formularse en una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, "portador" incluye cualquier solvente, medio de dispersión, vehículo, recubrimiento, diluyente, agente antibacteriano y/o antifúngico, agente isotónico, agente de retardo de la absorción, tampón, solución portadora, suspensión, coloide, y similares. El uso de tales medios y/o agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse, además, ingredientes activos suplementarios en las composiciones. Como se usa en la presente descripción, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es biológicamente o de cualquier otra manera indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con las MDSC, sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar en una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

35 La composición farmacéutica puede formularse en una variedad de formas adaptadas a una ruta de administración preferida. Así, de esa manera, una composición puede administrarse a través de rutas conocidas que incluyen, por ejemplo, rutas de administración parenteral, intradérmica, transcutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc.

40 Así, de esa manera, las MDSC pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada que incluya, pero no se limite a, una solución, una suspensión, una emulsión o cualquier forma de mezcla. La composición puede suministrarse en formulación con cualquier excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Una formulación puede presentarse convenientemente en forma de dosis unitarias y puede prepararse por métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Los métodos de preparación de una composición con un portador farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de reunir las MDSC en asociación con un portador que constituye uno o más de los ingredientes accesorios. Generalmente, una formulación puede prepararse al reunir el componente activo uniformemente y/o íntimamente en asociación con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, dar forma al producto en la formulación deseada.

La cantidad de MDSC administrada puede variar en dependencia de de varios factores que incluyen, entre otros, el peso, la condición física y/o la edad del sujeto, y/o la ruta de administración. Así, de esa manera, la cantidad absoluta de MDSC incluidas en una forma de dosificación unitaria dada puede variar ampliamente, y depende de factores tales como la especie, edad, peso y condición física del sujeto, y/o el método de administración. Por consiguiente, no es práctico establecer generalmente la cantidad que constituye una cantidad de MDSC efectiva para todas las aplicaciones posibles. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la cantidad apropiada con la debida consideración de tales factores.

En algunas modalidades, una sola administración de MDSC puede incluir un mínimo de al menos  $10^5$  MDSC tal como, por ejemplo, al menos  $10^6$  MDSC, al menos  $10^7$  MDSC, al menos  $10^8$  MDSC, al menos  $10^9$  MDSC, al menos  $10^{10}$  MDSC, al menos  $10^{11}$  MDSC, o al menos  $10^{12}$  MDSC. En algunas modalidades, una sola administración de MDSC puede incluir un máximo de no más de  $10^{13}$  MDSC tal como, por ejemplo, no más de  $10^{12}$  MDSC, no más de  $10^{11}$  MDSC, no más de  $10^{10}$  MDSC, no más de  $10^9$  MDSC, no más de  $10^8$  MDSC, no más de  $10^7$  MDSC, o no más de  $10^6$  MDSC. En algunas modalidades, una sola administración de MDSC puede incluir varias MDSC caracterizadas como un intervalo que tiene criterios de valoración principal definidos por cualquier número mínimo de MDSC enumerados anteriormente y cualquier número máximo de MDSC enumerados anteriormente que sea mayor que el número mínimo de MDSC. Así, de esa manera, en una modalidad ilustrativa, una sola administración de MDSC puede incluir un intervalo de  $10^7$  MDSC a  $10^{10}$  MDSC. En otra modalidad ilustrativa, una sola administración de MDSC puede incluir un intervalo de  $4 \times 10^7$  MDSC a  $5 \times 10^8$  MDSC.

En otro aspecto, esta descripción describe un método para tratar un tumor. Generalmente, el método incluye aumentar la activación del inflammasoma de las MDSC lo suficiente como para deshabilitar la función supresora de las MDSC en los alrededores del tumor. En algunos casos, el aumento de la activación del inflammasoma puede incluir proporcionar al menos un agente de incitación al inflammasoma tal como, por ejemplo, ácido úrico, ATP, un agente que estimula un receptor similar a Toll, ADN, ARN y/u otro agente que pueda regular positivamente la función del inflammasoma.

El agente de incitación al inflammasoma puede coadministrarse con una terapia antitumoral convencional diseñada para erradicar el tumor, tal como, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, cirugía y/o inmunoterapia con fármacos, anticuerpos/proteínas, vacunas y/o terapias celulares. Como se usa en la presente descripción, "coadministrado" se refiere a dos o más componentes de una combinación administrada de modo que los efectos terapéuticos o profilácticos de la combinación pueden ser mayores que los efectos terapéuticos o profilácticos de cualquiera de los componentes administrados solos. Dos componentes pueden coadministrarse simultáneamente o secuencialmente. Simultáneamente, pueden proporcionarse componentes coadministrados en una o más composiciones farmacéuticas. La coadministración secuencial de dos o más componentes incluye casos en los que los componentes se administran de modo que cada componente pueda estar presente en el sitio de tratamiento al mismo tiempo. Alternativamente, la coadministración secuencial de dos componentes puede incluir casos en los que al menos un componente ha sido eliminado de un sitio de tratamiento, pero al menos un efecto celular de administrar el componente (por ejemplo, producción de citocinas, activación de una determinada población celular, etc.) persiste en el sitio de tratamiento hasta que uno o más componentes adicionales se administren al sitio de tratamiento. Así, de esa manera, una combinación coadministrada puede, en ciertas circunstancias, incluir componentes que nunca existen en una mezcla química entre sí.

En algunos casos, la terapia antitumoral puede administrarse a la misma dosis y frecuencia para la cual la terapia ha recibido la aprobación regulatoria. En otros casos, la terapia antitumoral puede administrarse a la misma dosis y frecuencia con la que se evalúa en estudios clínicos o preclínicos. Uno puede alterar las dosis y/o frecuencia según sea necesario para lograr un nivel deseado de efecto antitumoral cuando se coadministra con el agente de incitación al inflammasoma. Así, de esa manera, uno puede usar regímenes de dosificación estándar/conocidos y/o personalizar la dosificación según sea necesario.

De manera similar, el agente de incitación al inflammasoma puede formularse en cualquier forma adecuada. Además, por ejemplo, el agente de incitación al inflammasoma puede administrarse a la misma dosis y frecuencia para la que puede haber recibido la aprobación regulatoria. En otros casos, el agente de incitación al inflammasoma puede administrarse a la misma dosis y frecuencia con la que puede evaluarse en estudios clínicos o preclínicos. Uno puede alterar las dosis y/o frecuencia según sea necesario para lograr el nivel deseado del agente de incitación al inflammasoma. Así, de esa manera, uno puede usar regímenes de dosificación estándar/conocidos y/o personalizar la dosificación según sea necesario.

En la descripción anterior y las siguientes reivindicaciones, el término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos o más cualesquiera de los elementos enumerados; los términos "comprende", "que comprende" y sus variaciones deben interpretarse como abiertos, es decir, los elementos o etapas adicionales son opcionales y pueden o no estar presentes; a menos que se especifique de otra manera, "un", "una", "el-la" y "al menos uno" se usan indistintamente y significan uno o más de uno; y las recitaciones de intervalos numéricos por criterios de valoración principal incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

En la descripción anterior, pueden describirse modalidades particulares de forma aislada para mayor claridad. A menos que se especifique expresamente de otra manera que las características de una modalidad particular son incompatibles

con las características de otra modalidad, ciertas modalidades pueden incluir una combinación de características compatibles descritas en la presente descripción en relación con una o más modalidades.

5 Para cualquier método descrito en la presente descripción que incluya etapas discretas, las etapas pueden conducirse en cualquier orden factible. Y, según corresponda, cualquier combinación de dos o más etapas puede conducirse simultáneamente.

10 La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes. En la medida en que los ejemplos incluyan cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones, se incluye únicamente con fines de referencia.

## 10 Ejemplos

### Ratones

15 Se compraron ratones del Instituto Nacional del Cáncer de 6-8 semanas de edad BALB/c (H2<sup>d</sup>), C57BL/6NCr (H2<sup>b</sup>) y B6-Ly5.2/Cr (B6-CD45.1<sup>+</sup>, H2<sup>b</sup>). Previamente se han descrito ratones con desactivación génica ASC (Mariathasan y otros, 2004. Nature 430(6996):213-218) y ratones YFP-Arg1 (YARG) (Reese y otros, 2007. Nature 447(7140):92-96) con un fondo genético C57Bl/6. Todos los ratones fueron criados y alojados en una instalación específica libre de patógenos en jaulas microaisladoras según protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la  
20 Universidad de Minnesota.

### Generación de MDSC

25 Las MDSC murinas se generaron en cultivos de médula ósea de C57Bl/6 a  $3 \times 10^5$  células/ml en medio Eagle modificado por Dulbecco más suero fetal de ternera al 10 %, 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml y aminoácidos suplementarios (1.5 mM de cada uno de L-glutamina, L-arginina y L-asparagina). Se añadieron 100 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF/Neupogen, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) y 2.5 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos de ratón (GM-CSF, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) y los cultivos se incubaron a 37 °C, 10 % de CO<sub>2</sub> durante cuatro días. El  
30 día 3, se añadieron 40 ng/ml de IL-13 murina recombinante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) para la inducción de arginasa-1; alternativamente se añadió IFN $\gamma$  a la misma concentración. Las MDSC se cosecharon el día 4 y se retiró suavemente 70 % del sobrenadante del cultivo. Los medios restantes y las células débilmente adherentes se recogieron antes de la adición de tripsina/EDTA. Después de 10 minutos a 37 °C, las placas se rasparon ligeramente y se lavaron para recoger las células restantes, que cuando se agruparon con las células ligeramente adherentes resultaron en >92 %  
35 de recuperación de CD11b<sup>+</sup>. Para la inducción del inflammasoma, el día 4 se añadió LPS (0,2  $\mu$ g/ml) a los cultivos. Después de tres horas, para estimular el inflammasoma NLRP3, se agregó ATP 2 mM durante una hora, alternativamente para la activación del inflammasoma AIM2 se añadió poli(dT) mediante el uso del reactivo Lipofectamine 2000 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) durante una hora antes del lavado y análisis de sobrenadantes o transferencia adoptiva.

40 Las MDSC humanas se generaron a partir de PBMC de donantes normales, aislados de sangre de adultos obtenida del Memorial Blood Center (Minneapolis, MN) por centrifugación mediante el uso un gradiente Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La generación in vitro se llevó a cabo como se describió previamente (Lechner y otros, 2010. J Immunol 185(4):2273-2284), modificado por un enriquecimiento mielóide anterior CD33<sup>+</sup>, que se llevó a cabo mediante el uso del sistema Miltenyi MAC de acuerdo con las instrucciones. Los cultivos se cosecharon el día 7 para la inducción del inflammasoma, seguido de lavado y sembrado en placa en ensayos de supresión como se describió previamente (Hippen y otros, 2008. Blood 112(7):2847-2857). Las muestras del banco de sangre humana se obtuvieron mediante pautas aprobadas por el Comité sobre el Uso de Sujetos Humanos en Investigación de la Universidad de Minnesota.

### 50 GvHD

Los receptores BALB/c se irradiaron letalmente mediante el uso de 700 cGy de irradiación total del cuerpo un día antes de la infusión de  $1 \times 10^7$  células de la médula ósea donadoras de C57Bl/6,  $2 \times 10^6$  células T de ganglios linfáticos purificadas depletadas de C57Bl/6 CD25 y  $6 \times 10^6$  MDSC-IL13 cultivadas de C57Bl/6 el día 0 o como se indica. El  
55 enriquecimiento de células T se llevó a cabo mediante el uso de un sistema de aislamiento celular negativo (EASYSEP, Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canadá) y anticuerpos biotinilados contra CD19, B220, CD11b, CD11c, NK1.1,  $\gamma$  TCR y CD25 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ratones se monitorearon diariamente para la supervivencia.

### 60 Recuperación ex vivo de MDSC

Las MDSC-IL13 generadas a partir de donantes congénicos CD45.2<sup>+</sup> (B6 o ASC ko) se transfirieron a receptores CD45.1<sup>+</sup> como se describe. Cinco días después del trasplante, se agruparon los bazo de 3-4 receptores por muestra (n = 3 muestras por grupo) con el fin de aumentar la recuperación y facilitar los ensayos funcionales. Los esplenocitos CD45.2<sup>+</sup>  
65 (MDSC-IL13) se aislaron por depleción de las células T del huésped y del donante mediante el uso del método RAPIDSPHERE EASYSEP (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canadá) y el anticuerpo anti-CD45.1-biotinilado de

acuerdo con las instrucciones del fabricante, lo que resultó en > 80 % de recuperación de MDSC-IL13 CD45.2+ (Figura 7).

Clasificación de las MDSC-IL13 de subconjuntos granulocíticos (Ly6G+) y monocíticos (Ly6C + G-ve)

Los cultivos de MDSC-IL13 se marcaron en masa con anticuerpos anti-Ly6G (clon 1A8) conjugados con APC, seguidos de etiquetado de microperlas anti-APC y aplicación a columnas LS de Miltenyi MACs para separación basada en la expresión de Ly6G+ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esto dio lugar a una clasificación efectiva de los subconjuntos granulocíticos y monocíticos que luego se usaron para análisis adicional.

Citometría de flujo y ensayo de supresión

La adquisición de datos de citometría de flujo se llevó a cabo en un BD LSRFortessa y el análisis se realizó mediante el uso del software Flow-Jo (FlowJo, LLC, Ashland, OR). Para los ensayos de supresión murina, las células T respondedoras se tiñeron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) 3,5  $\mu$ M y se incubaron con 0,25  $\mu$ g/ml de anti-CD3 $\epsilon$  antes del análisis el día 3. En los ensayos de supresión de MDSC humanas, las PBMC respondedoras se marcaron con CELLTRACE Violet (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y se estimularon con perlas recubiertas con AcM anti-CD3 $\epsilon$  (DYNAL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; relación 2:1) más 100 U/ml de huIL-2; las muestras se recogieron el día 4.

ELISA, Transferencia Western y Ensayo de arginasa

La IL-1 $\beta$  murina y humana en sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante el uso de los respectivos conjuntos de ELISA BD OptEIA, según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA). Para las transferencias Western, las MDSC purificadas se lavaron y se resuspendieron en tampón de lisis que contenía RIPA, cóctel inhibidor de proteasa (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX) y fosfatasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y luego se congelaron. Se fraccionaron 4  $\mu$ g de proteína de lisados celulares en geles SDS-PAGE al 4-12 % (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), se transfirieron en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare Co., Little Chalfont, Reino Unido), y se sondearon para la detección de caspasa-1 escindida mediante el uso del AcM de conejo anti caspasa-1 p10 escindida (sc-514, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX; 1:500). Los anticuerpos secundarios que se usaron fueron el anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) para la detección de los anticuerpos anti-caspasa-1 escindida (1:10 000) y el anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP para la detección de anti- $\beta$ -actina Ab (1:2750). Se usó el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para estimar las cuantificaciones relativas de las bandas de transferencia Western. La actividad de la arginasa-1 se determinó mediante el uso del kit de ensayo de arginasa QuantiChrom (Bioassay Systems LLC, Hayward, CA). Las muestras se normalizaron a  $4 \times 10^5$  células por muestra, se lavaron, sedimentaron y resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de lisis que contenía inhibidor de proteasa y luego se analizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los estudios de supervivencia están representados por las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, con comparaciones estadísticas determinadas mediante el uso de estadísticas log-rank. La prueba t de Student se usó para el análisis estadístico de los datos adquiridos in vitro (software Prism, GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA).  $p < 0.05$  se definió como estadísticamente significativo.

En el caso de que exista alguna inconsistencia entre la descripción de la presente solicitud y la descripción de cualquier documento mencionado en la presente descripción, prevalecerá la descripción de la presente solicitud. La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han proporcionado únicamente para mayor claridad del entendimiento. No deben entenderse limitaciones innecesarias de ahí. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, sino se define por las reivindicaciones.

A menos que se indique de otra forma, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, etcétera usados en la especificación y reivindicaciones se entenderán como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente." En consecuencia, a menos que se indique de otra forma al contrario, los parámetros numéricos expuestos en la especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en dependencia de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. Finalmente, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros en la presente descripción son aproximaciones, los valores numéricos que se exponen en los ejemplos específicos se informan tan precisamente como sea posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen un intervalo inherente que resulta de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Todos los encabezados son para conveniencia del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado, a menos que así se especifique.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una pluralidad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) deficientes en proteína similar a la mota asociada a la apoptosis que contiene una CARD (ASC) (MDSC deficientes en ASC) para usar en un método de tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener la enfermedad injerto contra huésped (GvHD), el método comprende: administrar al sujeto una pluralidad de MDSC deficientes en ASC.
- 10 2. La pluralidad de MDSC deficientes en ASC para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la administración de la pluralidad de MDSC deficientes en ASC comprende una pluralidad de administraciones en serie de MDSC deficientes en ASC.
- 15 3. La pluralidad de MDSC deficientes en ASC para usar de conformidad con la reivindicación 2, en donde al menos una administración de MDSC deficientes en ASC tiene lugar al menos tres días después de una administración previa de MDSC deficientes en ASC.
- 20 4. La pluralidad de MDSC deficientes en ASC para usar de conformidad con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el método comprende al menos tres administraciones de MDSC deficientes en ASC.
- 25 5. La pluralidad de MDSC deficientes en ASC para usar de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde al menos una parte de la pluralidad de MDSC deficientes en ASC son deficientes en ASC por modificación genética mediante el uso de un shARN, siARN y/o CRISPR, cuya modificación genética hace que los MDSC resisten la activación del inflammasoma.
- 30 6. La pluralidad de MDSC deficientes en ASC para usar de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende, además, administrar al sujeto un agente que inhibe el inflammasoma en una cantidad efectiva para reducir el grado en que las MDSC están sujetas a la activación del inflammasoma.
7. La pluralidad de MDSC deficientes en ASC para usar de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la GvHD comprende enfermedad aguda de injerto contra huésped.

Figura 1

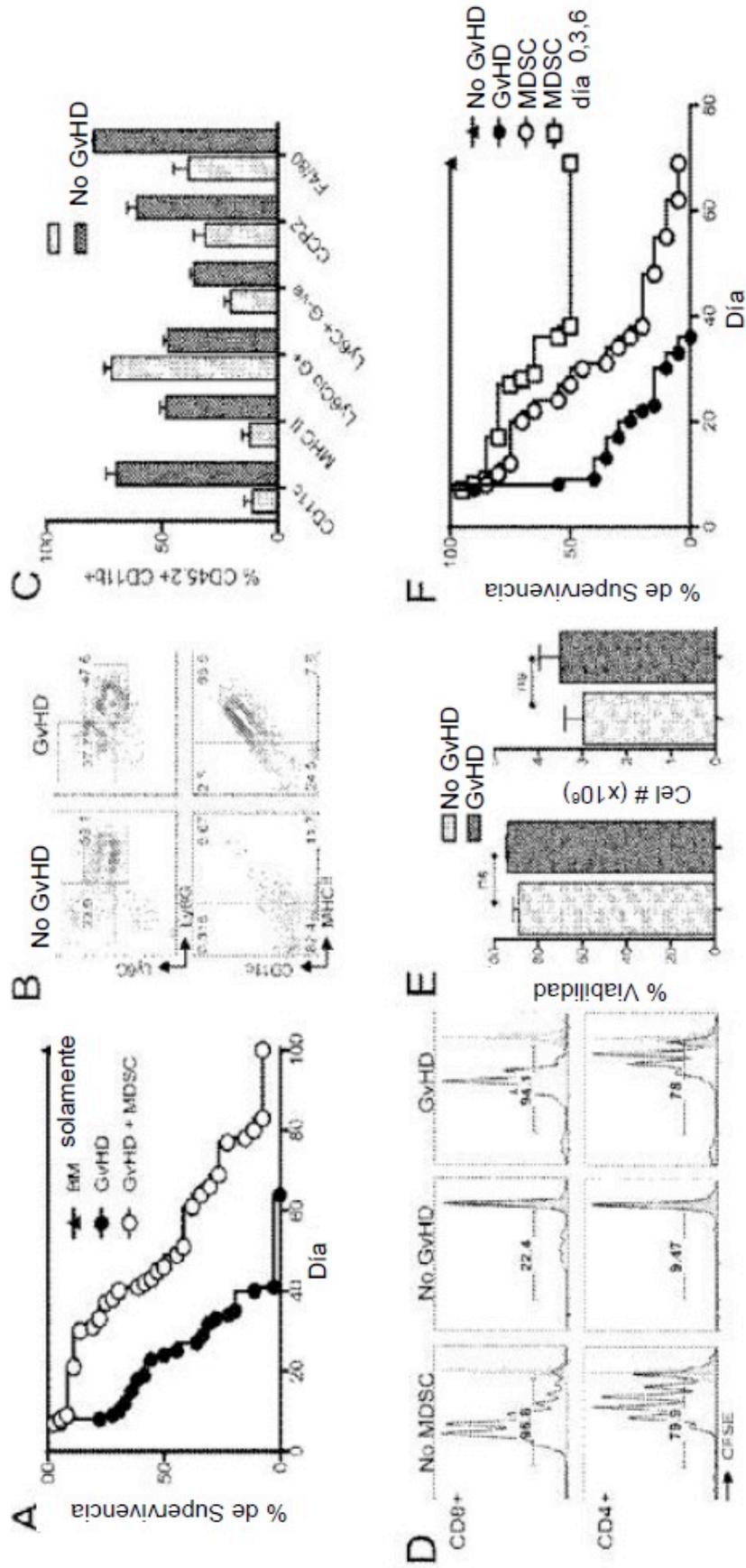


Figura 2

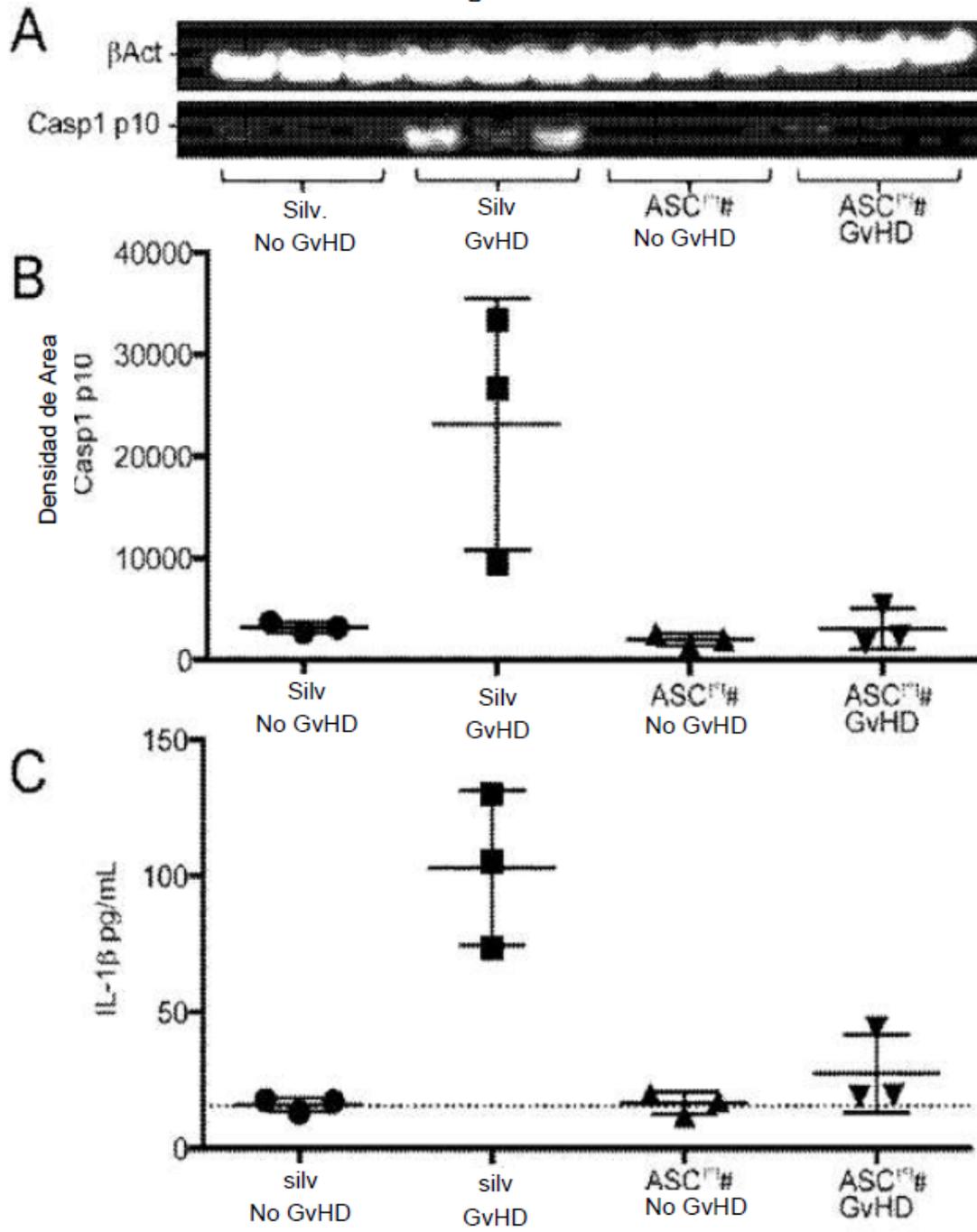


Figura 3

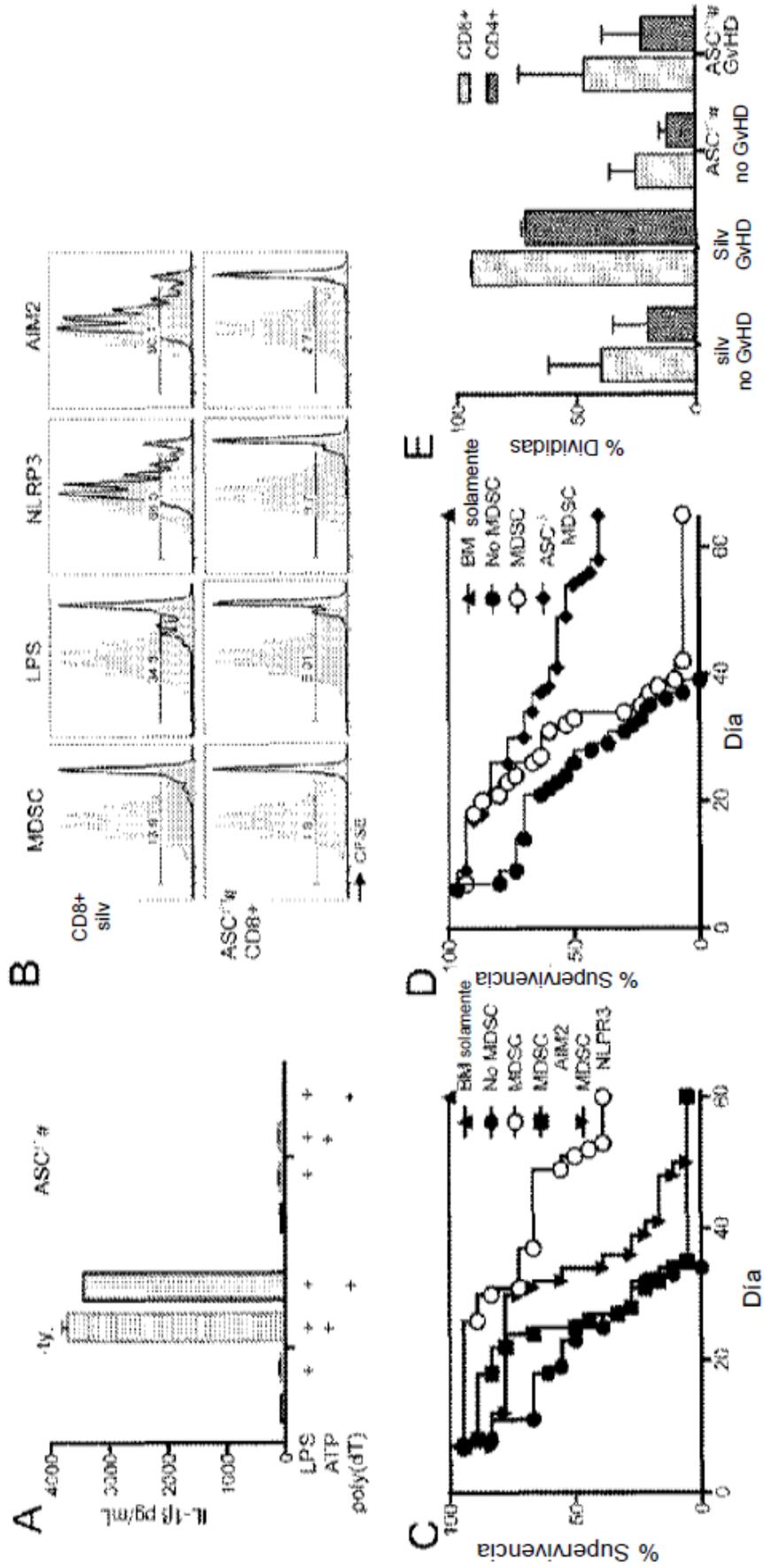
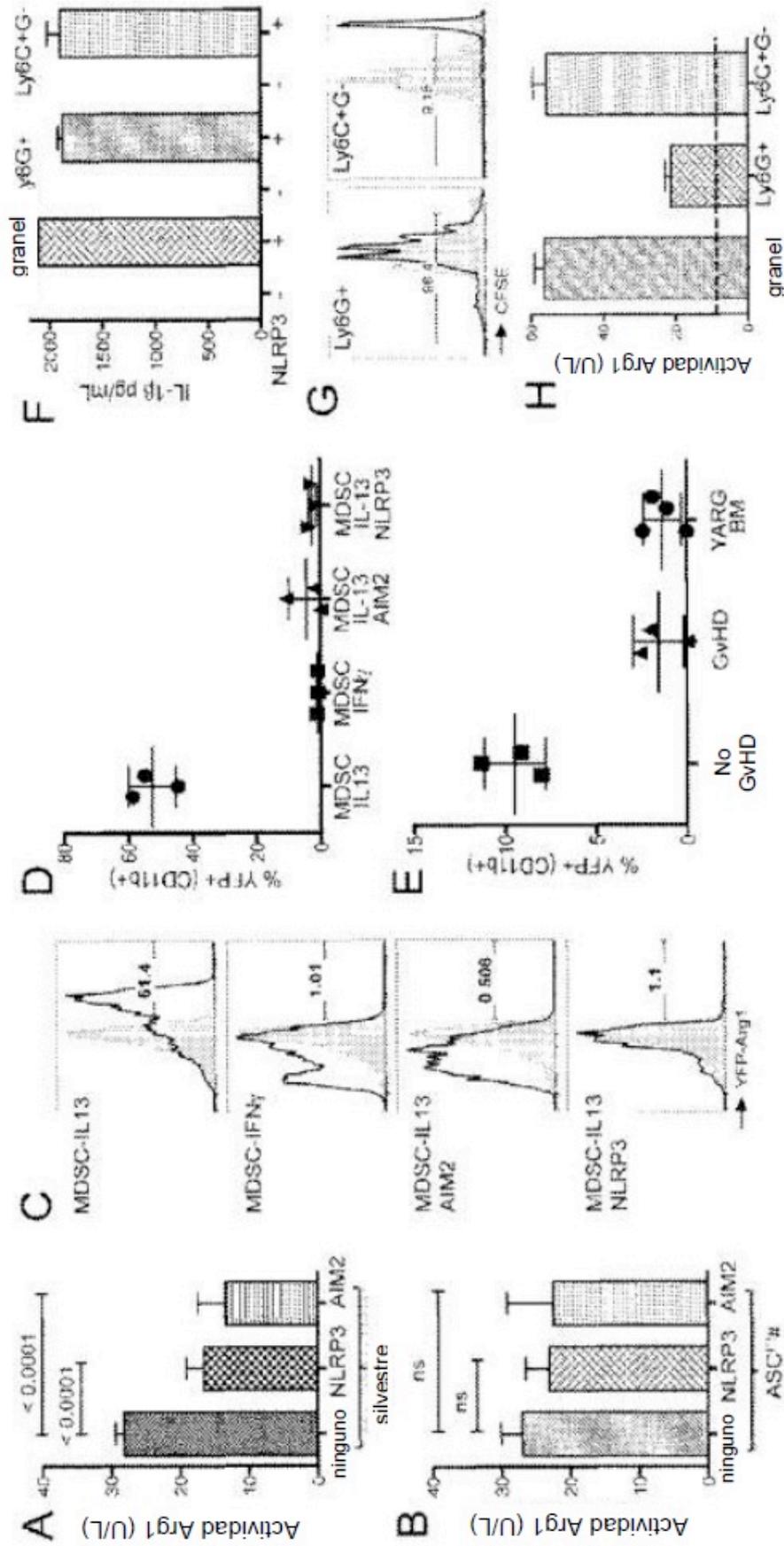


Figura 4



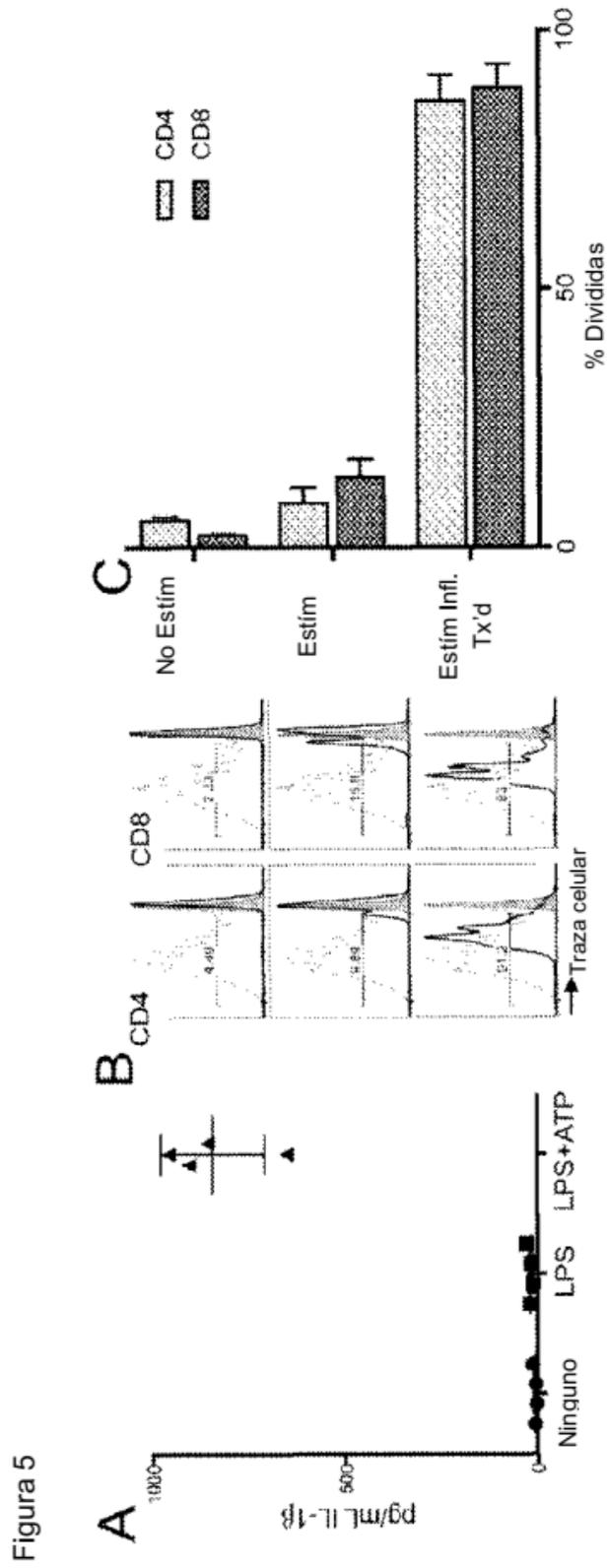


Figura 5

Figura 6

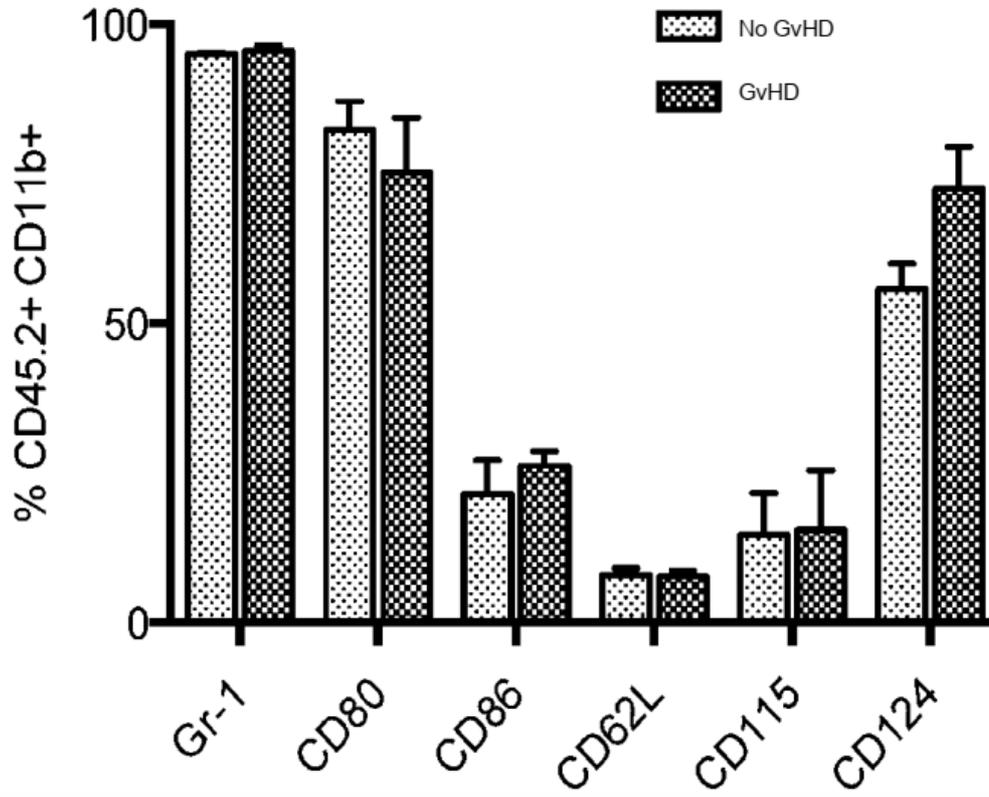


Figura 7

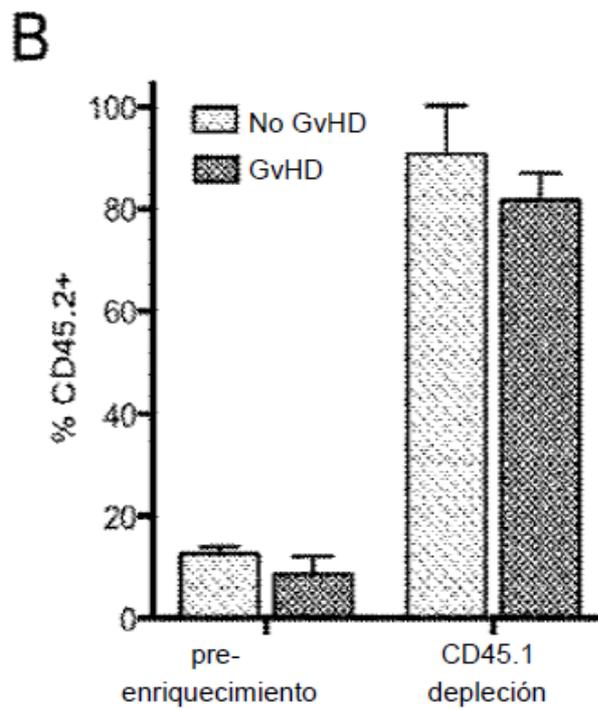
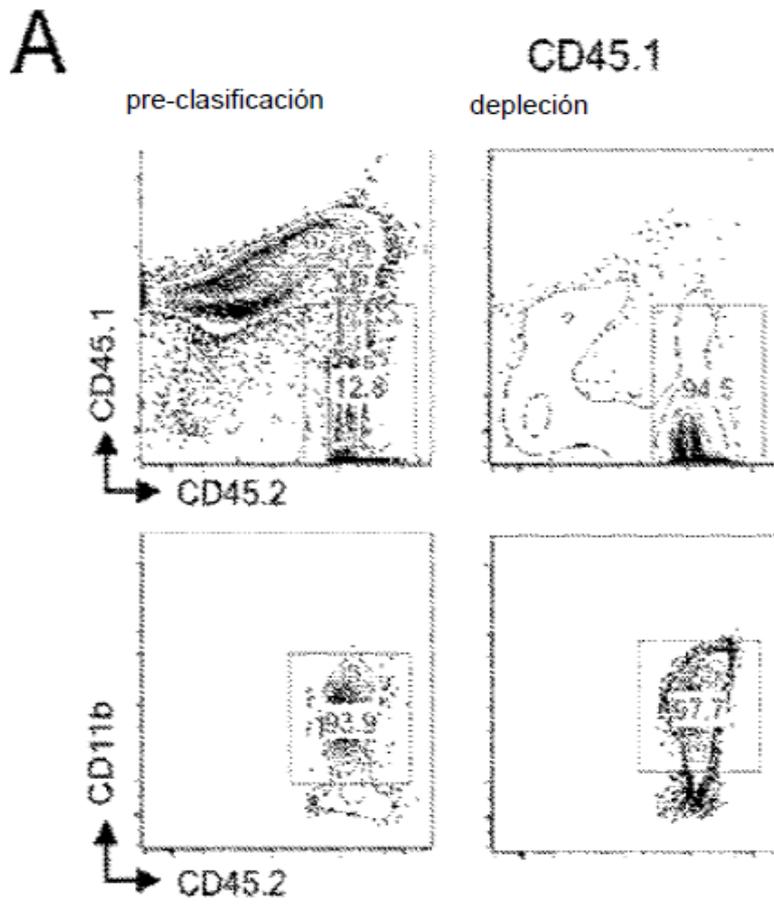


Figura 8

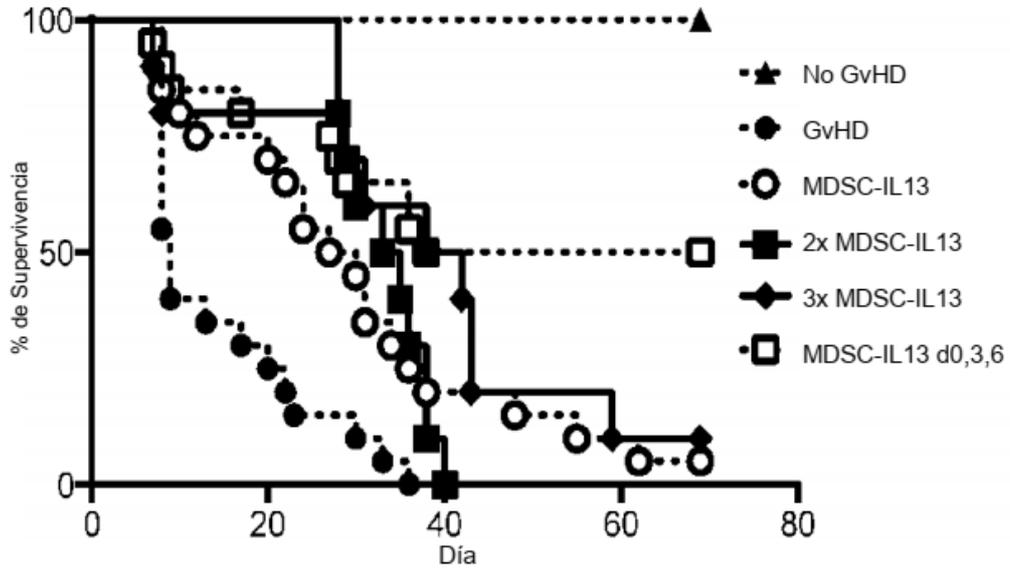


Figura 9

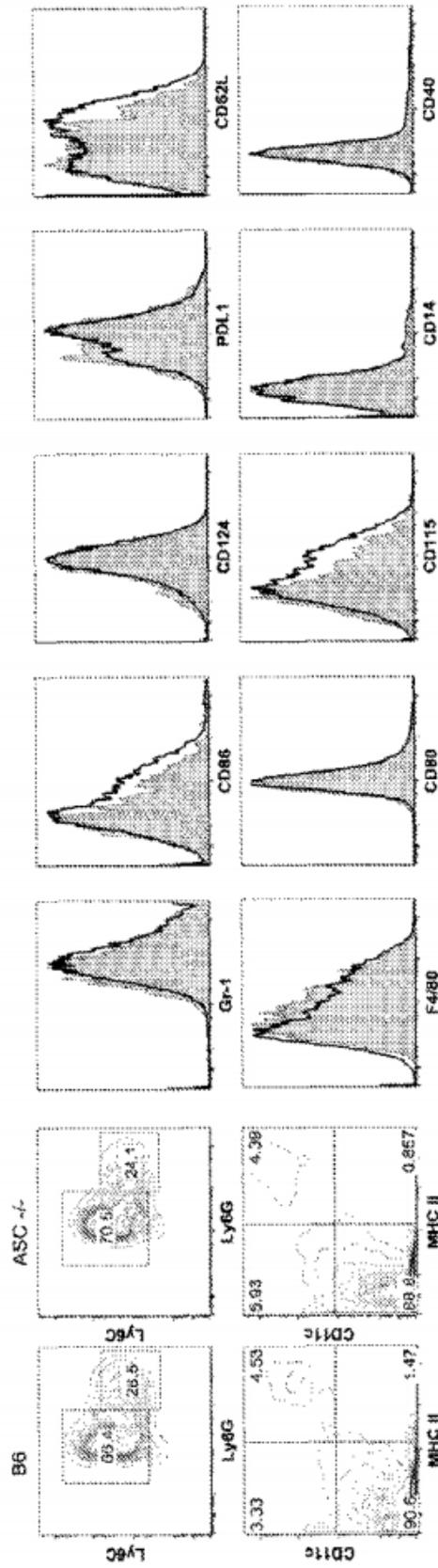


Figura 10

